

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão
com cafeína com ação na HDLG**

Thamires Batello Freire

Dissertação para obtenção do título
de Mestre

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a Dr.^a
Maria Valéria Robles Velasco

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

**Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão
com cafeína com ação na HDLG**

Thamires Batello Freire

Versão corrigida da Dissertação conforme resolução CoPGr 6018.

Dissertação para obtenção do título de
Mestre

Orientadora: Prof.^a Assoc.^a Dr.^a Maria
Valéria Robles Velasco

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Freire, Thamires Batello
F866d Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de
nanoemulsão com cafeína com ação na HDLG / Thamires Batello
Freire. -- São Paulo, 2017.
122p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador : Velasco, Maria Valéria Robles

1. Cosméticos : Tecnologia 2. Nanotecnologia I. T. II. Velasco,
Maria Valéria Robles, orientador.

668.55 CDD

Thamires Batello Freire

**Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão
com cafeína com ação na HDLG**

Comissão Julgadora

da

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof^a. Assoc.^a Dr.^a Maria Valéria Robles Velasco

Orientador/presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

3º. Examinador

São Paulo, _____ de 2017.

DEDICATÓRIA

*Aos meus avós,
Amandio Freire, Noemia Peralta (in memorian) e Ruth Batello (in memorian),*

*Ao meu pai,
Antonio Freire, que sempre me incentivou a estudar,*

*À minha mãe,
Janete Batello,*

*Aos meus irmãos,
Patrick, Daniel e Rafael,*

*À minha cunhada,
Denise Candido*

*Aos meus sobrinhos,
Heitor e Henry,*

*Ao meu namorado Lucas Ferreira Borge pelo companherismo e apoio,
À Sueli Pereira Fabbri e Reynaldo Fabbri por incentivarem meu ingresso no mestrado,*

Aos meus amigos e parentes mais próximos,

*À minha orientadora Prof^ª. Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco por sempre ter acreditado
em meu potencial.*



AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco.

Ao Prof. Dr. André Rolim Baby.

Às professoras Dr.^a Olga e Dr.^a Maria Thereza, pelas valiosas contribuições durante o exame de qualificação.

Aos professores Dr.^a Dalva Lucia Araújo de Faria, Dr.^a Vânia Rodrigues Leite e Silva, Dr.^a Nadia Bou-chacra, Dr.^a Marina Franco Maggi Tavares, Dr.^a Eunice Kazue Kano, Dr. Felipe Rebello Lourenço, pelas valiosas contribuições.

Às colegas Michelle Ferrera Dario, Camila Areias de Oliveira e Thalita Cândido pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos de laboratório pelo apoio, parceria e por compartilharem este momento: Alessandra, Alexandra, Andressa, André, Bruna, Camila Areias, Camila Foster, Daniela, Fernanda, Gabriela, Karina, Larissa, Maíra, Marcela, Michelle, Mirela, Mirla, Mayara, Nadia, Paulo, Priscila, Rafael, Raul, Rodrigo, Soraya, Otávio, Tércio, Thalita, Thayane, Victoria, Yasmin.

Aos funcionários da Universidade de São Paulo: Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Maria Inês de Almeida Gonçalves, Edgar Muniz Machado Junior, David Olimpio de Lima Filho, Alexandre Spitalare, Charles Doralice Rita de Jesus Santos e Sheila.

Ao CNPq pelos auxílios financeiros.

A todos que colaboraram para realização deste trabalho.

Epígrafe

Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo.

Paulo Freire

SUMÁRIO

	pg.
LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE EQUAÇÕES	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1.INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A Hidrolipodistrofia ginoide (HDLG).....	5
2.2. Justificativa de uso da cafeína.....	8
2.3. Obtenção de Nanoemulsões.....	10
2.4. Espectroscopia Raman.....	12
2.5. Ensaio HET-CAM – <i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane</i>	13
2.6. Ensaio de Permeação Cutânea <i>in vitro</i> em célula de Franz.....	14
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo geral.....	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Material.....	21
4.1.2. Solventes e Reagentes.....	21
4.1.3. Equipamentos e acessórios.....	22
4.2. Métodos.....	23
4.2.1. Obtenção da nanoemulsão contendo cafeína.....	23
4.2.2. Teste de Estabilidade Preliminar (TEP).....	24
4.2.3. Teste de estabilidade normal (TEN).....	25
4.2.4. Validação do método analítico e bioanalítico.....	28
4.2.5. Teor da cafeína por CLAE durante o TEN.....	30
4.2.6. Eficiência de Associação (EA%) da cafeína nas gotículas.....	31
4.2.7. Avaliação do potencial de irritação ocular.....	31
4.2.8. Permeação Cutânea.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Obtenção das nanoemulsões contendo cafeína.....	36
5.1.1. Equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL).....	36
5.1.2. Diagrama de fases pseudoternário.....	36
5.1.3. Temperatura de Inversão de Fases e da Tcb.....	37

5.1.4. Condutividade Elétrica.....	38
5.2. Teste de Estabilidade Preliminar (TEP).....	39
5.2.1. Teste de centrifugação.....	39
5.2.2. Estresse Térmico.....	39
5.3. Teste de Estabilidade normal (TEN).....	40
5.3.1. Caracterizações físicas, físico-químicas e química da nanoemulsão.....	40
5.4. Validação do método analítico e bioanalítico.....	57
5.4.1. Identificação e Quantificação da cafeína na nanoemulsão.....	
5.5. Teor da cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) durante o TEN.....	65
5.6. Eficiência de Associação (EA%) da cafeína nas gotículas.....	66
5.7. Avaliação do potencial de irritação ocular.....	66
5.8. Ensaio de Permeação Cutânea.....	67
6. CONCLUSÕES	71
7. BIBLIOGRAFIA	74
ANEXO A - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado.....	88
ANEXO B - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	90
ANEXO C – Ficha do aluno.....	94
ANEXO D - Currículo Lattes.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
CAF	cafeína
CAM	Membrana corioalantóica
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Micelar Crítica
DLS	Dynamic Light Scattering
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipofílico
HDLG	Hidrolipodistrofia ginoide
INCI name	International Nomenclature of cosmetic ingredients
IPD	Índice de Polidispersão
IS	Índice de irritação ocular
NECAF	Nanoemulsão com cafeína
NSCAF	Nanoemulsão sem cafeína
NTP	United States National Toxicology Program
P.A.	Pró Análise
pH	Potencial de hidrogênionico
PIT	Phase Inversion Temperature
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
Tcb	Temperatura <i>clearing-boundary</i>
TEN	Teste de Estabilidade Normal
TEP	Teste de Estabilidade Preliminar
TIF	Temperatura de Inversão de Fase

LISTA DE FIGURAS

	pg.
Figura 1 – Tecido com celulite (esquerda) e sem celulite (direita).....	4
Figura 2 – Disposição dos septos no homem (esquerda) e na mulher (direita).....	5
Figura 3 – Fórmula estrutural química da cafeína.....	8
Figura 4 – Vias da lipólise no adipócito.....	9
Figura 5 –Esquema da inversão de fase da micela.....	10
Figura 6 – Espalhamento elástico Rayleigh e inelástico Anti-Stokes e Stokes.....	12
Figura 7 – Imagem da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme).....	15
Figura 8 – Diagrama de fases pseudoternário das emulsões O/A.....	24
Figura 9 – Fotos dos controles negativos e positivos utilizados durante o ensaio.....	32
Figura 10 – Foto das emulsões e nanoemulsões descritas na Tabela	36
Figura 11 – Condutividade com indicação de temperatura de inversão de fase, nanoemulsão com cafeína 1% p/p formulação F3.....	38
Figura 12 – Valores de pH da nanoemulsão F3 nas condições: 25,0±2,0 °C e 5,0±2,0 °C, durante o Teste de Estabilidade Normal.....	41
Figura 13 – Correlação entre: tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (IPD) e valor de pH no Teste de Estabilidade Normal TEN a 25,0 ± 2,0 °C (ambiente) e 5,0 ± 2,0 °C (geladeira) da nanoemulsão.....	48
Figura 14 – : Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína anidra e em solução com diversos valores de pH, corrigido com ácido cítrico e trietanolamina, no intervalo de 400-1000 cm ⁻¹	52
Figura 15 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína anidra e em solução com diversos valores de pH, corrigido com ácido cítrico e trietanolamina, no intervalo de 1000-1800 cm ⁻¹	52
Figura 16 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução (pH 7) e anidra.....	53
Figura 17 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com a nanoemulsão F3 na presença e na ausência da mesma.....	53
Figura 18 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com a fase oleosa composta pelos triglicérides do ácido cáprico caprílico (TAAC) na presença e na ausência da mesma.....	54
Figura 19 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com o tensoativo Oleth-3 na presença e na ausência da mesma.....	54
Figura 20 – Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com o tensoativo Oleth-20 na presença e na ausência da mesma.....	55
Figura 21 – Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação F3 na condição de (25,0 ± 2,0 °C).....	56

Figura 22 – Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação F3 na condição de $(5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C})$	56
Figura 23 – Cromatograma da cafeína padrão de acordo com o método definido, leitura a 273nm, fluxo de 0.4ml/min, sem forno (25°C), pH 3,0 e fase móvel de acetonitrila: sol. Acidificada.....	58
Figura 24 – Cromatograma da cafeína padrão de acordo com o método definido, leitura a 273nm, não foi registrado impurezas com índice de pureza do pico de 0,99 ou	58
Figura 25 – Curva analítica da cafeína padrão de referência secundário (T=100%), detecção a 273nm.....	60
Figura 26 – Cromatograma da cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ solubilizada em PBS, detecção a 273nm nas mesmas condições do método definido, com índice de pureza do pico cafeína igual a 0,999 (Software LC solutions [®]).....	63
Figura 27 – Cromatograma do tampão PBS utilizado na curva de calibração e no líquido receptor, detecção a 273nm nas mesmas condições do método definido.....	63
Figura 28 – Cromatograma da nanoemulsão sem cafeína (NSCAF) utilizado na curva de calibração e no líquido receptor, detecção a 273nm nas mesmas condições do método definido.....	63
Figura 29 – Cromatograma da matriz biológica Epiderme aditivada com cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção a 273nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico cafeína igual a 1 (Software LC solutions [®]).....	64
Figura 30 – Cromatograma da matriz biológica Derme tratada com cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção de 273nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 (Software LC solutions [®]).....	64
Figura 31 – Cromatograma da matriz biológica Líquido Receptor tratada com cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção de 273nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 (Software LC solutions [®]).....	65
Figura 32 – Cromatograma da cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção de 273nm nas mesmas condições do método definido, com o índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 por meio do software LC solutions [®]	65
Figura 33 – Teor de cafeína ao longo do Teste de Estabilidade Normal (TEN), nas condições de $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (ambiente) e $5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (geladeira).	66
Figura 34 – Triplicata da formulação F3 para observação dos eventos.....	67
Figura 35 – Perfil de permeação cutânea da cafeína da nanoemulsão F3 e na solução de cafeína a 1% p/v na detecção de 273nm.....	69

LISTA DE TABELAS

	pg.
Tabela 1 – Composição quali e quantitativa (%p/p) das preparações avaliadas no método do Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) (1 a 6).....	23
Tabela 2 – Classificação do potencial de irritação ocular no método HET CAM.....	33
Tabela 3 – Características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH, percentual de variação do valor de pH e percentual de variação do teor de cafeína da nanoemulsão F3 submetida ao Teste de Estabilidade Normal (TEN) no decorrer dos 90 dias.....	42
Tabela 4 – Teste de Tukey para a comparação dos valores de pH da nanoemulsão com cafeína F3 nas condições: $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) e $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira) durante o TEN.....	45
Tabela 5 – Avaliação do tamanho da gotícula e índice de polidispersão da nanoemulsão F3 submetida ao (TEN) ao longo dos 90 dias.....	47
Tabela 6 – Espectro Raman e atribuições para a cafeína hidratada e anidra.....	51
Tabela 7 – Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação F3.....	56
Tabela 8 – Curva analítica com cafeína padrão (PD) de referência secundário (T=100%) detecção a 273 nm.....	59
Tabela 9 – Análise de regressão da linearidade da curva analítica da cafeína padrão de referência secundário (T=100%) detecção a 273 nm..	59
Tabela 10 – Precisão e Exatidão intradia e interdia das soluções com cafeína padrão de referência secundário (T=100%)	60
Tabela 11 – Exatidão intradia e interdia respectivamente das soluções com cafeína padrão de referência secundário (T=100%), detecção a 273nm por CLAE.....	62
Tabela 12 – Concentração da cafeína no tampão PBS determinação a 273nm.....	68
Tabela 13 – Concentração de cafeína presente nos outros compartimentos do experimento, comparando a nanoemulsão com cafeína 1%p/v F3 e a solução com cafeína 1 %p/v respectivamente.....	69

LISTA DE EQUAÇÕES

	pg.
Equação 1 – Cálculo do EHL final.....	22
Equação 2 – Desvio Padrão Relativo do método analítico.....	29
Equação 3 – Cálculo da Exatidão do método analítico.....	29
Equação 4 – Limite de Detecção do método analítico.....	30
Equação 5 – Equação de diluição.....	30
Equação 6 – EA – Eficiência de Associação (%) da cafeína nas gotículas...	31
Equação 7 – Cálculo do Índice de irritação ocular.....	33
Equação 8 – Coeficiente de permeabilidade aparente.....	35

RESUMO

FREIRE, T.B. **Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão com cafeína com ação na HDLG**, 2017. 122p (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A Hidrolipodistrofia Ginoide (HDLG), popularmente conhecida como celulite, ocorre em 80 a 90% da população feminina após o período da puberdade, provém de uma modificação metabólica no tecido adiposo cutâneo. A cafeína, por sua vez, promove uma ação lipolítica e é muito utilizada por formuladores. Este projeto buscou obter nanoemulsão contendo, como ingredientes principais, tensoativos (*Oleth-3*; *Oleth-20*) e cafeína pelo método de emulsificação por (TIF). Foram desenvolvidas emulsões, sendo a **F3**, a mais translúcida com Temperatura *clearing-boundary* (Tcb) de aproximadamente 80 °C e temperatura de inversão de fase (TIF) de 85 °C. No *Teste de Estabilidade Preliminar* (TEP), a nanoemulsão não apresentou modificações nas suas características organolépticas, exceto no teste de estresse térmico no qual ocorreu separação de fases acima de 70°C. No *Teste de Estabilidade Normal* (TEN) a condição de 45,0 ± 2,0 °C apresentou instabilidade, nos demais valores de temperatura as nanoemulsões foram classificadas como normal. Os valores de pH para as condições de 25,0 ± 2,0 °C e 5,0 ± 2,0 °C decaíram no decorrer dos 90 dias, 13,7 e 2% respectivamente. Estes valores foram avaliados por ANOVA, seguido do Teste de Tukey, sugerindo que o armazenamento da **F3** seja refrigerado. Os índices de polidispersão apresentaram desvio reduzido de 0,1. Indicando a presença de gotículas com alta polidispersibilidade e caráter monodisperso. O tamanho de gotícula na condição de 5,0 ± 2,0 °C teve tamanho e percentual de variação inferior em relação à condição 25,0 ± 2,0 °C. O potencial zeta no t0 foi de -3,9. O percentual de Transmitância no t0 e com t90 dias de TEN apresentou valores de 48,7 e 6,5% respectivamente, indicando uma perda da transparência no decorrer do tempo. A constante de Ostwald na condição de geladeira foi favorável para a estabilidade. No ensaio com a espectroscopia Raman foi comparado o espectro da cafeína em solução em diversos valores de pH e não foi observado o deslocamento de bandas e nem sua protonação. As bandas de cafeína encontradas na **F3** foram compatíveis com as encontradas na solução de cafeína (1337; 652,5 e 558,2 cm⁻¹). Não houve interação da cafeína anidra com o óleo *Caprylic/Capric Triglyceride* (TAAC) e nem com os tensoativos *Oleth-3* e *Oleth-20*. A validação analítica do método foi linear, precisa e exata. Houve redução da concentração de cafeína ao longo do tempo da TEN, na condição de 5,0 ± 2,0 °C (15,1%). A eficiência de associação da cafeína na gotícula foi 4,8%. No ensaio de segurança de uso de nanoemulsão *in vitro* HET CAM – *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*, o resultado de 1,4 classificou a nanoemulsão **F3** como levemente irritante. No ensaio de permeação cutânea em membrana natural (pele humana) as concentrações permeadas não ultrapassaram a concentração de saturação do tampão *Phosphate Saline* (PBS) (48,96 µg/3mL). A solução com cafeína permeou mais que a nanoemulsão com cafeína **F3**, porém a nanoemulsão melhorou visualmente e sensorialmente a precipitação da cafeína.

Palavras-chave: celulite, cafeína, hidrolipodistrofia ginoide, nanoemulsão, permeação

ABSTRACT

FREIRE, T.B. **Development and evaluation of the safety and efficacy of caffeine nanoemulsion with action in HDLG** 2017. 122p (Masters Dissertation). Faculty of Pharmacy Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2017.

Gynoid Hydrolipodystrophy (HDLG), commonly known as cellulite, occurs in 80-90% of the female population after the puberty period, comes from a metabolic modification in cutaneous adipose tissue. Caffeine, in turn, promotes a lipolytic action and is widely used by formulators. This project obtained nanoemulsion containing as main ingredients surfactants (*Oleth-3*; *Oleth-20*) and caffeine by emulsification method by (TIF). Emulsions were developed, with F3 being chosen, the most translucent with clearing-boundary Temperature (Tcb) of approximately 80 °C and phase inversion temperature (TIF) of 85 °C. In the *Preliminary Stability Test* (PET), the nanoemulsion showed no changes in its organoleptic characteristics, except in the thermal stress test in which phase separation occurred above 70 °C. In the *Normal Stability Test* (TEN) the condition of 45.0 ± 2.0 °C showed instability, in the other temperature values the nanoemulsions were classified as normal. The pH values for the conditions of 25.0 ± 2.0 °C and 5.0 ± 2.0 °C declined over the course of 90 days, 13.7 and 2.0% respectively. These values were evaluated by ANOVA, followed by Tukey's test, suggesting that **F3** storage should be refrigerated. The polydispersion indices showed reduced deviation of 0.1. Indicating the presence of droplets with high polydispersity and monodisperse character. The droplet size in the condition of 5.0 ± 2.0 °C had size and percentage of variation lower than the condition 25.0 ± 2.0 °C. The zeta potential at t0 was -3.9. The percentage of Transmittance at t0 and with t90 days of TEN presented values of 48.7 and 6.5% respectively, indicating a loss of transparency over time. Evaluated constant of Ostwald, in the refrigerator condition was the most favorable for stability. In the Raman spectroscopy assay the caffeine spectrum was compared in solution at various pH values and the band displacement and its protonation were not observed. The caffeine bands found in F3 were compatible with those found in the caffeine solution (1337, 652.5 and 558.2 cm⁻¹). There was no interaction of caffeine anhydrous with *Caprylic/Capric Triglyceride* oil (TAAC) nor with *Oleth-3* and *Oleth-20* surfactants. The analytical validation of the method was linear, precise and accurate. There was a reduction of the caffeine concentration over the TEN time, in the condition of 5.0 ± 2.0 °C (15.1%). The caffeine association efficiency in the droplet was 4.8%. In the safety assay of using nanoemulsion in vitro HET CAM - Hen's Egg Test - Chorioallantoic Membrane, the result of 1.4 ranked the nanoemulsion **F3** as slightly irritating. In the natural membrane cutaneous permeation test (human skin) permeate concentrations did not exceed the saturation concentration of the (PBS) *Phosphate Saline* (48.96 µg/3 mL). The caffeine solution permeated more than the nanoemulsion with caffeine **F3**, but the nanoemulsion visually and sensorially improved the caffeine precipitation.

Key words: cellulite, caffeine, gynoid hydrolipodystrophy, nanoemulsion, permeation.

1 - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A Hidrolipodistrofia ginoide (HDLG) é uma distrofia dos tecidos mesenquimais, sendo comumente conhecida como celulite (BORGES, 2010).

A alteração no relevo cutâneo é a principal característica da HDLG, sendo notada, com maior incidência nos membros inferiores, na cintura pélvica e no abdômen, atingindo cerca de 80 a 90% da população feminina após a puberdade (SANTOS *et al.*, 2011).

A cafeína tem sido veiculada em formulações para amenizar os efeitos da HDLG (BERTIN *et al.*, 2001; SAINIO *et al.*, 2000, KRUPEK & MAREZE-DA-COSTA, 2012) por inibir a enzima fosfodiesterase, resultando em um aumento da adenosina monofosfato cíclica (AMPC) a qual ativa a enzima lipase e provoca a lipólise dos triacilgliceróis (RAWLINGS, 2006; DUNCAN, 2007; RIBEIRO, 2010).

As formulações anticelulíticas devem respeitar o limite de concentração determinado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), a qual estipulou por meio do Parecer Técnico nº 1, de 29 de junho de 2002, que nos produtos cosméticos a cafeína deve ter limite de concentração de 8% (BRASIL, 2002).

O emprego da concentração máxima permitida da cafeína em formulações cosméticas não garante um incremento da permeação e/ou penetração cutânea, uma vez que diversos parâmetros estão envolvidos na difusão do componente ativo na pele (HADGRAFT, 1999).

A nanotecnologia representa uma alternativa tecnológica para componentes ativos de baixa solubilidade e tendência à precipitação por modificar as propriedades dos mesmos (NANOTECH, 2009). Nanoemulsões possuem tamanho de micela na escala nanométrica, variando de acordo com os autores: (entre 20-500 nm) (MEI *et al.*, 2011), (50-500 nm) (TADROS *et al.*, 2004) e (20-200 nm) (IZQUIERDO *et al.*, 2004), não havendo, portanto, parâmetro definitivo. Esta escala confere aspecto transparente ou translúcido e maior estabilidade quando comparado às macroemulsões (MARUNO & ROCHA-FILHO, 2009).

Diversos métodos são empregados na preparação, como os métodos que empregam alta energia, os quais de acordo com Anton e Vandamme (2009) envolvem o uso de dispositivos específicos como elevada agitação, homogeneizadores de alta pressão, geradores de ultrassom, onde um valor muito baixo de energia mecânica é utilizada para a emulsificação.

Os métodos que empregam baixa energia propiciam inversão de fase por variações na fração do volume (composição de inversão de fase, PIC) ou variações de temperatura conhecido por “método de emulsificação por temperatura de inversão de fase” (TIF) ou Phase Inversion Temperature (PIT) (SHINODA & SAITO, 1968).

Uma vez otimizado o processo de desenvolvimento de nanoemulsões, se faz necessário a verificação do grau de estabilidade do sistema, avaliando-se o índice de polidispersão, potencial zeta e tamanho de micela (SHAFIQ-UN-NABI *et al.*, 2007).

Além disso, outras técnicas são utilizadas para caracterizar a formulação, como a espectroscopia Raman, que fornece informações sobre a estrutura das transições vibracionais das moléculas, atribuindo um número de onda e bandas específicas, o que pode ser chamado de *impressão digital* das substâncias (ANDREEV *et al.*, 2001; PRATIWI *et al.*, 2002; TANDON *et al.*, 2000; GIL, 2015; VANKEIRSBILCK *et al.*, 2002).

Por outro lado, a segurança e eficácia dos produtos cosméticos devem ser garantidos pelos fabricantes, pois o consumidor possui livre acesso ao mesmo.

O ensaio avalia semi-quantitativamente o potencial irritante de um ingrediente (produtos solúveis, emulsões, géis e óleos), sobre a membrana *córioalantóide* (CAM) de ovo embrionado de galinha, baseado na observação dos efeitos irritantes (hiperemia, hemorragia e coagulação) (BRASIL, 2012).

Em outro contexto, a permeação/penetração cutânea é um processo essencial que permite ao ingrediente ativo atravessar os estratos da pele (IDSON, 1975; REIFENRATH *et al.*, 1991). Diversos métodos *in vitro* têm sido descritos para quantificar a passagem de ingredientes através da pele, estas técnicas permitem tomar amostras analíticas com grande precisão para a avaliação da permeação de um ingrediente ativo utilizando células de difusão, também chamadas de células de Franz (SMITH; HAIGH, 1989).

Assim, o propósito do presente trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão com cafeína para ação anticelulítica. Caracterizá-la quanto aos parâmetros físicos e físico-químicos, tais como estabilidade, espectroscopia Raman e índice de Ostwald, além de avaliar sua eficácia e segurança por meio dos ensaios de potencial de irritação ocular e permeação cutânea com célula de difusão de Franz.

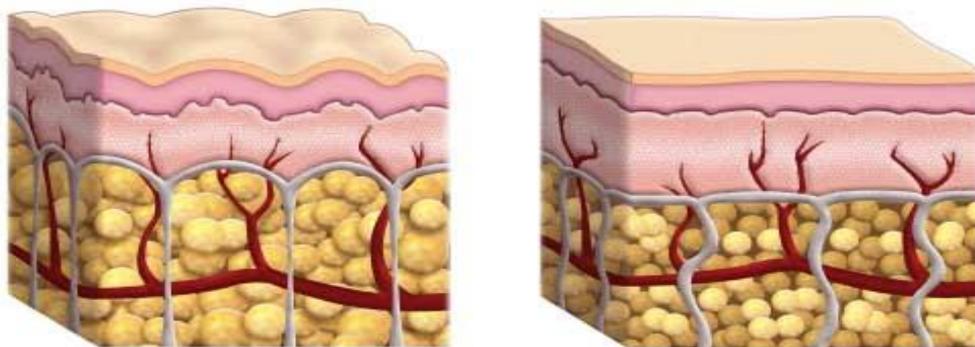
2 – REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Hidrolipodistrofia ginoide (HDLG)

Irregularidades na superfície da pele conhecidas como aspecto de “casca de laranja”, são oriundas de alterações dermohipodérmicas, ocorrendo aumento do tamanho e número de adipócitos (hipertrofia e hiperplasia, respectivamente), que se tornam mais pronunciados devido à fixação dos septos ao tecido conjuntivo fibroso e denso que revestem os vasos sanguíneos, nervos, ossos e músculos (fáscia profunda ou fáscia muscular). Além disso, ocorre a fixação desses septos com a derme reticular, unindo ambas (GUIRRO & GUIRRO, 2007). Estes fenômenos contribuem para a perda do equilíbrio histofisiológico local, conforme **Figura 1** (CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

Figura 1: Tecido com celulite (esquerda) e sem celulite (direita)



(Fonte: <http://www.canstockphoto.com.br/celulite-crucifixos-seção-3693773.html>)

A arquitetura tecidual também apresenta diferenças entre os sexos. Nos homens os septos têm conformação diagonal rígida e alojam adipócitos pequenos, enquanto que nas mulheres, são dispostos verticalmente, com estrutura frouxa alojando adipócitos maiores (TERRANOVA *et al.*, 2006; RIBEIRO, 2010). Estas diferenças se manifestam após a puberdade devido à secreção dos hormônios femininos, principalmente o estrogênio, que desfazem o cruzamento das fibras permitindo seu alargamento (**Figura 2**) (GOMES & DAMAZIO, 2009).

Figura 2: Disposição dos septos no homem (esquerda) e na mulher (direita)



Disposição dos septos fibrosos no homem e mulher respectivamente

(Esquema da diferença estrutural entre as células de gordura dos homens e das mulheres (adaptado de LUEDER *et al.*, 2004).

Os fatores que predisõem seu aparecimento são diversos e interferem nas proteoglicanas presentes na matriz. Fatores genéticos (variação topográfica), sexo (gravidez e estrógenos), idade, desequilíbrios hormonais (hipotireodismo, insulina), hábitos de vida, perturbações metabólicas, disfunções hepáticas e perturbações hemodinâmicas contribuem para o surgimento da HDLG. Outras teorias, também, tentam explicar o surgimento de tal disfunção, como as envolvendo alérgias, intoxicações e alterações bioquímicas (GUIRRO & GUIRRO, 2007; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

Na topografia do tecido adiposo temos duas camadas (*areolar* e *lamelar*). Entre ambas há um septo de tecido conjuntivo denominado fáscia superficial ou subcutânea. A camada *areolar* que é a mais externa e está mais unida à derme que a *lamelar*, mais profunda e que possui vasos de maior calibre. Na pele espessa, a camada *areolar* predomina sobre a *lamelar* e na pele fina ocorre o oposto. Mulheres e crianças possuem a camada *areolar* mais espessa (KNITTLE *et al.*, 1979; SJÖSTROM & WILLIAN-OLSON, 1981; AVELAR & ILLOUZ, 1986; GUIRRO & GUIRRO, 2007; ROSENBAUM, 1998). Em contrapartida, no indivíduo adulto há aumento de espessura da camada *lamelar* com o aumento de peso (BJÖRNTORP & SJÖSTROM, 1971).

Nas mulheres, os adipócitos das regiões femural, mamas, nádegas, epitrocantária (popularmente chamado de “culote”) e parte anterior das coxas são maiores e mais resistentes à lipólise, devido a ação estrogênica (BERLAN, GALITZKY & LAFONTAN, 1992; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992; BORGES, 2010). Em contrapartida, nos homens, as regiões da nuca, deltóide, tríceps, lombossacral e nádegas são afetadas pela HDLG (BORGES, 2010).

Segundo alguns autores, em nível histopatológico a evolução da HDLG possui três estágios (CURVELO & RAMALHO, 2006; BINAZZI & GRILLI-CICIONI, 1977; LAGÉSE, 1929):

- Alteração dos adipócitos (anisopoiquilocitose) associada à estase linfática, proliferação de fibroblastos e edema difuso intersticial.
- Fibroplasia, exsudação fibrinosa, colagênese, neoformação capilar, micro hemorragia local, hiperqueratose folicular e edema discreto da derme, correspondente ao aspecto “casca de laranja”.
- Esclerose dos septos fibrosos do tecido subcutâneo (hipoderme) e da derme profunda (atrofia cicatricial) correspondente ao aspecto “acolchoado”.

Diversos fatores estão envolvidos na etiologia da HDLG, dentre eles, características genéticas hormonais, hábitos alimentares e sedentarismo (CIPORKIN e PASCHOAL, 1992). Estes fatores parecem atuar em 4 unidades funcionais do tecido adiposo: interstício-matricial, microcirculatória, neuro-vegetativa e energética (adiposa).

a) *interstício-matricial*: fibroblastos sintetizam macromoléculas e são liberadas na matriz extracelular. A matriz extracelular é formada por fibras colágenas, elásticas e reticulares (responsável pela resistência e sustentação) e a substância fundamental (proteoglicanas, glicoproteínas e ácido hialurônico), responsável pela difusão entre o sistema circulatório e os tecidos.

b) *microcirculatória*: composta por arteríola, vênula, capilar, linfático e tecido intersticial. Há um equilíbrio capilar vênulo-arterial, longe deste pode ocasionar edema intercelular.

c) *neuro-vegetativa*: influência da inervação simpática no tecido dermo-hipodérmico, influenciando na proliferação dos fibroblastos e renovação do colágeno e glicosaminoglicanas, microcirculação e adipócitos.

d) *energética (adiposa)*: armazenamento de triglicérides, a partir de carboidratos e lipídeos circulantes, sendo o órgão de maior capacidade de variação de volume.

A HDLG pode também ser classificada, do ponto de vista clínico em:

a) *Dura, camada compacta e sem mobilidade*: No exame de palpação, a superfície está ligada aos planos mais profundos possibilitando a dor quando provocada e, quando se aperta entre os dedos, fica evidente o aspecto de “casca de laranja”. Padrão este, frequentemente associado com estrias e mais comum em adolescentes. Encontra-se em mulheres obesas,

falsas magras (com adiposidades localizadas) e magras verdadeiras (CURVELO & RAMALHO, 2006; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

b) Flácida (*Branda ou Difusa*): associada à hipotonia muscular e flacidez. Ocorre em mulheres sedentárias ou após perda de peso. A pele oscila com o movimento e muda de acordo com a posição (mole, fofa e trêmula). Problemas psicológicos acompanham o quadro devido as complicações estéticas. Apesar da pressão mínima deste tipo de HDLG, que não comprime os vasos sanguíneos, existe um acúmulo de sangue venoso nos espaços entre a pele e os músculos. A circulação fica letárgica, o retorno venoso fica dificultado e permite que as veias se dilatam, provocando o aparecimento de varizes, veias varicosas, ramificações de microvasos setoriais e, com maior frequência, manifestações de equimoses (hematomas e inchaços) regionais nos lugares de mais atrito. (ALQUIER, 1949; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

c) Edematosa, é a menos frequente porém mais comprometedora. Possui um infiltrado mais viscoso com sistema de drenagem precário. Manifesta-se com aumento de volume. Ocorre, também, depressão do tecido ao toque, que se mantém após a remoção, sendo a pele fina. Ocorre sensação de peso e dor nas pernas (CURVELO & RAMALHO, 2006; CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

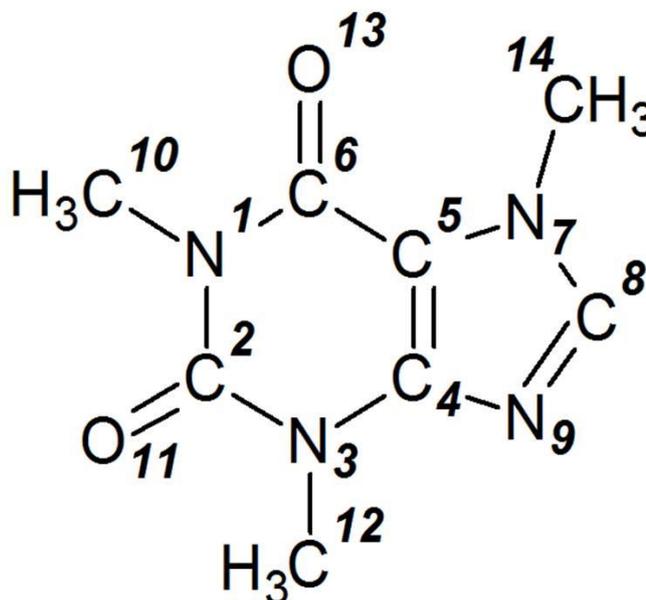
d) Mista, tem uma mescla das anteriores em uma mesma pessoa, mas em regiões anatómicas diferentes (BORGES, 2010).

A gordura localizada e a obesidade embora estejam presentes concomitantemente com a HDLG no mesmo indivíduo, nem sempre estão associadas. Na gordura localizada há a presença também de hipertrofia adipocitária, assim mesmo, estes adipócitos diferem em forma e tamanho, com aspectos desagregados e fundidos. Não há alterações dos capilares ou do tecido conjuntivo, em contrapartida a HLDG é uma angiopatia, ou seja, além da hipertrofia das células adiposas há microestase capilo-venular com excesso de permeabilidade vascular; estase linfática; acúmulo de líquido intersticial com albumina e globulina tissular; proliferação de fibras pericapilares, bloqueio endoarteriolar nas arteríolas do tecido adiposo; não coexistindo aumento de mucopolissacarídeos. (CIPORKIN & PASCHOAL, 1992).

2.2 Justificativa de uso da Cafeína

A cafeína ($C_8H_{10}N_4O_2$) é um alcaloide do grupo das xantinas, designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina (**Figura 3**) (SIMÕES *et al.*, 2003).

Figura 3: Fórmula estrutural química da cafeína



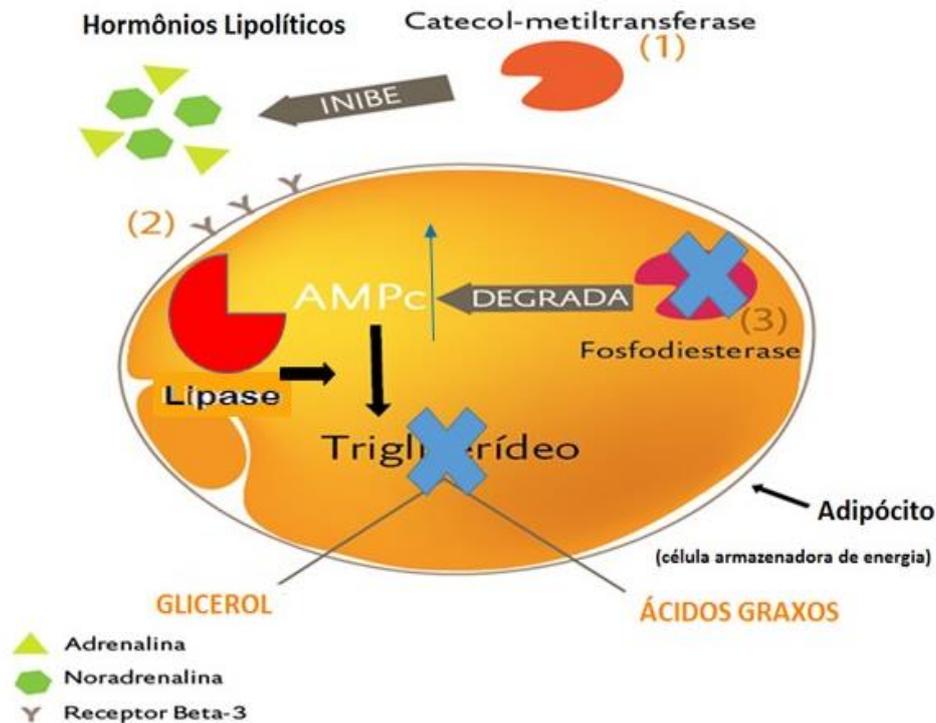
(Fonte: Do autor)

A cafeína possui caráter hidrofílico com log P -0,07 e pka de 8,3. (TAGLIARI, 2012; AMNON & GREENBERG, 2014; ABD *et al.*, 2016).

Fernandes e colaboradores (2015) observaram a precipitação de cafeína em géis aquosos e discutiram o fenômeno por ser ela uma substância levemente solúvel em água e que pode propiciar formação de grumos de difícil redispersão. Este fato compromete a eficácia, pois reduz sua concentração no sítio de ação.

De acordo com as teorias mais aceitas para a fisiopatologia da HDLG, os pesquisadores tendem a desenvolver formulações cosméticas tópicas que incorporem ingredientes ativos, com ação estimuladora do fluxo microvascular e linfático e que atuem diretamente nos movimentos reguladores da lipólise (**Figura 4**) (CURVELO & RAMALHO, 2006).

Figura 4: Vias da lipólise no adipócito



(Fonte: adaptado da página <http://menosgordura.com/site/weight-level/#2>)

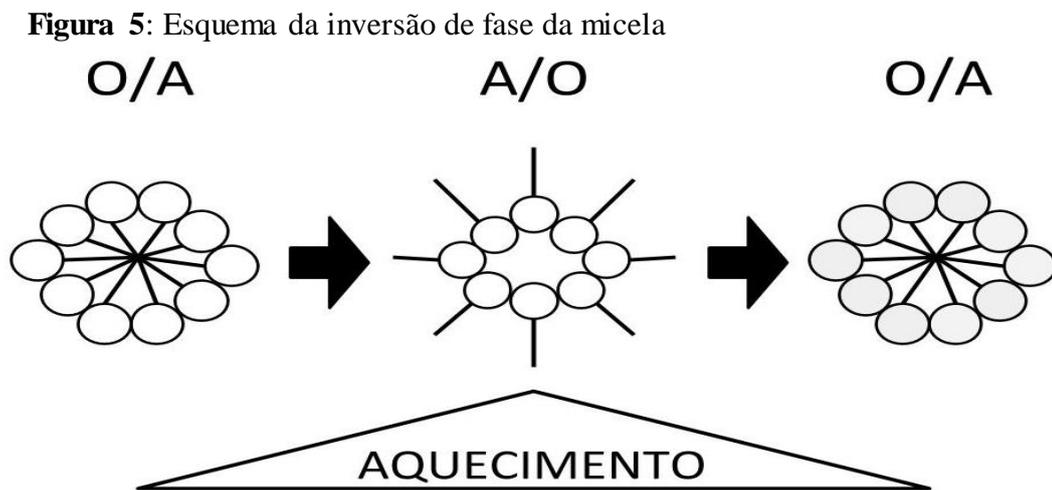
Em estudo realizado em modelo animal (ratas albinas/wistar), uma emulsão óleo em água contendo cafeína 4% p/p reduziu 17% do diâmetro dos adipócitos comparada com a emulsão controle, essa mensuração foi possível através da morfometria, reteirando a ação da cafeína como lipolítica e inferindo sua atuação na HLDG (TANO, 2003).

2.3. Obtenção de Nanoemulsões

Segundo Maruno e Rocha-Filho (2010) desde 1980 tem sido focado em emulsões com tamanho de gotícula na escala nanométrica (nanoemulsões). Por seu tamanho ser reduzido, possuem frequentemente estabilidade física superior frente as macroemulsões. Além disso, a procura por nanoemulsões se dá pela performace de entrega do ingrediente ativo através da pele, o que favorece a penetração e/ou permeação cutânea.

Para a obtenção de nanoemulsões pelo método de inversão de fases, o aumento na temperatura do sistema disperso promove alteração em ligações como interações (ligações de hidrogênio, dipolo-dipolo e dipolo induzidos) entre os tensoativos não iônicos etoxilados e a fase aquosa contínua. Estes tensoativos apresentam valores de Equilíbrio hidrófilo-lipofílico

(EHL) ≥ 10.0 , sendo moléculas anfifílicas com predominância evidente do aspecto hidrofílico. Acima da temperatura de EHL, ou de inversão de fases (TIF) a qual também é conhecida como *Phase Inversion Temperature* (PIT), a molécula do tensoativo torna-se predominantemente lipofílica (**Figura 5**) (SHINODA & FRIBERG, 1986; BECHER & SCHICK, 1987; MARSZALL, 1987; FRIBERG *et al.*, 1988).



(Fonte: Esquema elaborado pelo autor)

Este método de emulsificação produz emulsões com distribuição granulométrica abaixo de 1 μm e depende da temperatura de manipulação, quando o equilíbrio hidrofílico-lipofílico do par de tensoativo exibe algumas características próprias como forte poder solubilizante e tensão interfacial mínima (MARSZAL, 1987; ZERFA *et al.*, 2001; SALAGER *et al.*, 2004). Contudo, para que ocorra a inversão de fases transicional é necessário que a concentração de tensoativos empregados na formulação esteja acima da concentração micelar crítica (CMC) (SAJJADI *et al.* 2003a).

Roger *et al.*, (2010) identificou um estado transitório, onde o sistema coloidal torna-se translúcido e/ou azulado abaixo da TIF, denominado de “clearing boundary temperature” (Tcb). Na Tcb as micelas ficam dispersas na fase nanométrica. A formação de nanoemulsões se dá por aquecimento do sistema acima da Tcb e interrompem ao arrefecimento sob agitação constante.

Para sistemas constituídos por um único tensoativo não iônico, o valor da temperatura de EHL é fixa e independe de mudanças na composição da emulsão à pressão constante, contudo para emulsões contendo mais que um ingrediente ativo não iônico, a temperatura de

EHL é dependente da concentração de tensoativos, da razão de massas entre os tensoativos empregados e da fração volumétrica entre fase aquosa e oleosa. Isto ocorre, principalmente, devido a diferenças na distribuição de cada tensoativo em agregados ou na fase oleosa (KUNIEDA *et al.*, 1996).

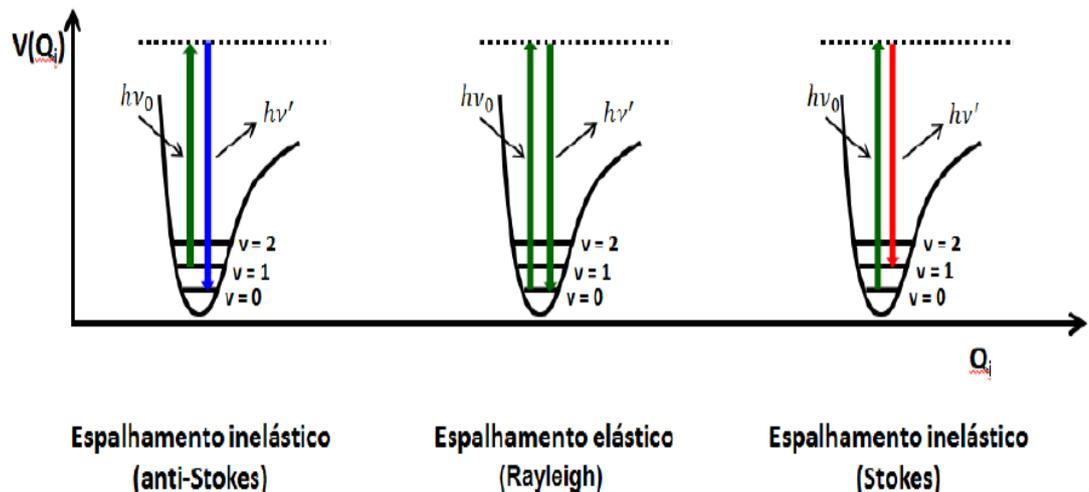
Emulsões são classificadas de acordo com a natureza da fase dispersa (interfacial entre a gotícula) e da fase contínua, sendo os tipos mais comuns óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O). Nas emulsões (O/A), a água envolve a micela com conteúdo oleoso possibilitando cosmética agradável. No caso das emulsões (A/O), a fase oleosa envolve a micela com conteúdo aquoso, apresentando sensação de pegajosidade e oleosidade sobre a pele. O conteúdo da fase interna, apresenta dimensões variadas, por isso, polidispersas (BEZERRA & REBELLO, 1996; DAVIS, 1977; FOX, 1994; PRISTA *et al.*, 1992). Emulsificantes com $EHL > 7$ tendem a formar emulsões O/A enquanto que $EHL < 7$ tendem a formar emulsões A/O (TADROS *et al.*, 2004).

É importante ressaltar que o ponto de turvação ou *cloud point* pode ocorrer para os tensoativos não iônicos etoxilados em solução aquosa. Quando ocorre aumento da temperatura da solução, esta pode alcançar um ponto crítico, onde a molécula de tensoativo torna-se insolúvel, fenômeno visualizado pela turvação da solução (BECKER & SCHICK, 1987; MARSZALL, 1987; FRIBERG *et al.*, 1988; LOCHHEAD, 1994; HIEMENZ & RAJAGOPALAN, 1997; HOLMBERG *et al.*, 2002).

2.4. Espectroscopia Raman

Segundo Gil (2015), a técnica baseia-se no fenômeno físico de espalhamento inelástico de radiação eletromagnética e para que haja atividade Raman a molécula deve apresentar variação na sua polarizabilidade, em relação à coordenada normal de vibração (Q_i), em torno da posição do equilíbrio. Quando uma radiação monocromática de energia ($E = h\nu_0$), geralmente com frequência ν_0 na região do espectro eletromagnético que abrange desde o UV (100 a 400 nm), passando pelo visível (400 a 780 nm) até a região do infravermelho próximo (780 a 2500 nm), incide sobre o sistema molecular, este fica perturbado e se transporta a um estado virtual de maior energia, a partir do qual são espalhados fótons, como na **Figura 6**.

Figura 6: Espalhamentos elástico Rayleigh e inelásticos Anti-Stokes e Stokes



Legenda: curvas de potencial (V) em função da coordenada normal (Q_i), v representa níveis vibracionais consecutivos (GIL, 2015).

O espalhamento elástico ou de Rayleigh, o fóton espalhado tem a mesma energia incidente sendo a diferença de energia observada nula. O espalhamento inelástico Anti-Stokes espalha um fóton de energia maior em relação ao fóton inicial, sendo a diferença de energia observada negativa. No espalhamento inelástico Stokes, considerado para este trabalho, é espalhado um fóton com energia menor do que o fóton incidente, sendo, portanto, essa diferença de energia observada como bandas em valores de número de onda positivos no espectro Raman.

2.5. Ensaio HET-CAM – *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

Segundo Rito e colaboradores (2012) os produtos cosméticos são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, que têm o objetivo principal de limpar, perfumar, alterar e/ou corrigir odores corporais e manter o corpo em bom estado. Por ter essas funções, esses produtos são utilizados diariamente por milhões de pessoas, sendo fundamental efetuar a vigilância da qualidade e segurança desses produtos.

Foi escolhido o método HET-CAM por ser acessível, possuir baixo custo e ser um método alternativo e preliminar de segurança.

O ensaio fornece informações sobre os efeitos que podem ocorrer na conjuntiva do olho humano após a exposição a uma substância teste. Este método foi uma extensão de modelos de embriões de galinha, tradicionalmente utilizados por toxicologistas e virologistas (LUEPKE & KEMPER 1986; PARISH, 1985), e baseou-se na observação de que a CAM de um ovo de galinha embrionado é semelhante ao tecido vascularizado da mucosa do olho humano ou de coelho.

Segundo Kalweit *et al.*, (1990) os resultados iniciais na década de 90, indicaram correlação da ordem de alto escalão entre os dados de testes em produtos químicos e formulações cosméticas comparados com resultados Draize *in vivo*. Estudos posteriores incluíram a classificação de várias classes de substâncias irritantes, variando de não irritante a grave, com alta correlação entre os sistemas. Este desenvolvimento foi encorajador, uma vez que sugeriu que modelos *in vitro* podem representar alternativa válida para prever a toxicidade ocular *in vivo*, teste de segurança facilmente aplicável à área cosmética. Assim, foi razoável concluir que efeitos adversos sobre a CAM poderiam ser correlacionados com a irritação ou corrosão *in vivo*. A metodologia HET-CAM é alternativa e necessita ser validada, porém, ela é sugerida por sua capacidade de prever efeitos corrosivos oculares graves ou irreversíveis, tal como definidos pela United States National Toxicology Program (NTP) (2010) e pelo Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (2003b).

2.6. Ensaio de Permeação Cutânea *in vitro* em célula de Franz

Existe considerável número de trabalhos que propõem avaliar e proporcionar penetração e/ou permeação cutânea com ativos que possuem características físico e químicas não favoráveis. Deste modo, estudos buscam desenvolver técnicas que modifiquem reversivelmente a função barreira do estrato córneo ou que otimizem a solubilidade, estabilidade e/ou tamanho de partícula do fármaco.

Os trabalhos envolvendo permeação e célula de difusão buscam referência nos trabalhos de Franz (FRANZ, 1975, 1978). A célula proposta por Franz é estática, com dose finita, onde a membrana natural, mais especificamente o estrato córneo, fica em contato com o compartimento doador da amostra e a derme em contato com o fluido no compartimento receptor, mimetizando as condições *in vivo* (BRONAUGH; STEWART, 1985).

A primeira Lei de Fick demonstrou que estratégias de promoção de permeação incluindo efeitos na difusão (coeficiente de difusão) ou na solubilidade, possuem potenciais multiplicativos (HANDGRAFT, 1999).

A segunda lei de Fick (equação de difusão) pode ser aplicada para descrever a natureza da permeação de compostos em solução sobre a pele. Sob as condições de uma concentração constante no compartimento doador, relação tempo-dependência da concentração da droga e área da membrana (UE, 2010). A membrana natural pode ser obtida a partir da pele da orelha do porco ou pele humana proveniente de cirurgia plástica (HAWKINS & REIFENRATH, 1986; WAGNER *et al.*, 2001). Como modelo experimental *in vitro* e *in vivo* de penetração/permeação para formulações cosméticas, os estudos devem ser realizados em modelo de pele íntegra (RIEGER, 1993; SCHAEFFER & REDELMEIER, 1996).

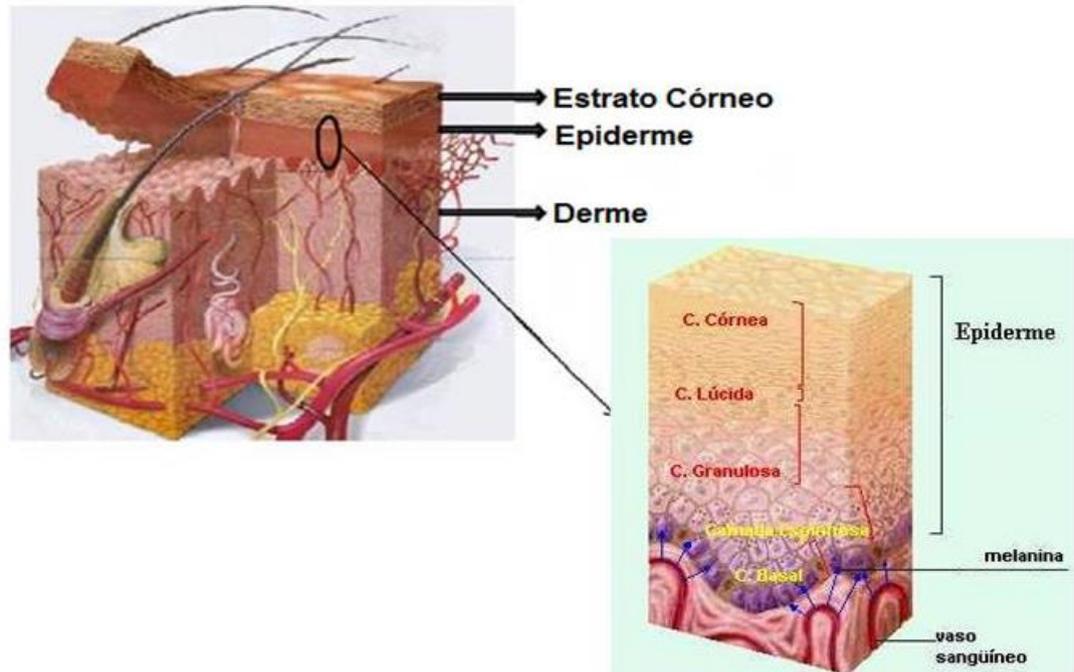
Zhang e Bozena (2011), concluíram em seu estudo que a permeação dos fármacos testados, entre eles a cafeína, foi maior em uma microemulsão O/A em relação à bicontínua e A/O. Ensaios utilizando pele de porco com microemulsões do tipo O/A apresentaram maior permeação cutânea em relação a pele humana (ZANG & MICHNIAK-KOHN, 2011).

Nos cosméticos, a cafeína tem demonstrado: atividade anticelulítica; efeito inibitório de carcinogênese na pele devido sua ação de proteção solar e efeito estimulatório da apoptose na epiderme de camundongos tratados com radiação ultravioleta B (UVB) (LU *et al.*, 2008; CONNEY, *et al.*, 2013); estímulo de crescimento capilar após sua aplicação (FISHER *et al.*, 2007) e potentes propriedades antioxidantes e aumento da microcirculação do sangue na pele (HERMAN & HERMAN, 2013).

Em contrapartida, a cafeína possui dificuldade em permear a barreira cutânea, estudos *in vitro* concluíram que 95% de cafeína pura não transpõe a pele (RUBIO *et al.*, 2011), sendo assim, a passagem transfolicular é um mecanismo notório de permeação deste ativo (TRAUER *et al.*, 2009). Otberg e colaboradores (2008) relataram que numerosos produtos transdérmicos utilizaram cafeína independente de seu caráter hidrofílico.

O estrato córneo proporciona barreira a ativos com dificuldades em o transpor, devido às características intrínsecas ao fármaco, como coeficiente de partição, lipofilicidade, tamanho de partícula, atividade termodinâmica, entre outros (**Figura 7**) (WILLIAMS, 2003), (GUY & HANDGRAFT, 1992; BODDÉ *et al.*, 1991).

FIGURA 7: Imagem da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme)



(Fonte: adaptado de Ciencia Cosmética Bases Fisiológicas y Criterios Prácticos - Lorenzo Pons Gimier e Juez Ponz, página <http://www.infoescuela.com/anatomia-humana/epiderme/>)

Um estudo envolvendo radioisótopos na permeação cutânea *in vitro* com pele de ratos, evidenciou que a cafeína não apresenta biotransformação durante a permeação na pele (BRONAUGH, 1989). Conforme preconizado no Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos da ANVISA, a predição de penetração das substâncias é, também, uma importante avaliação toxicológica depois da exposição tópica. Os resultados obtidos podem ser considerados para o estudo dos mecanismos de alergia e irritação cutânea. Do mesmo modo, efeitos toxicológicos sistêmicos estão intimamente ligados ao grau de penetração/permeação cutânea.

Bouwstra e colaboradores (1989), citaram uma característica molecular típica do promotor de permeação, que consiste em possuir uma cabeça polar com uma longa cadeia alquílica ideal entre 10 a 14 carbonos. Esta característica desestabiliza os lipídeos da pele, presentes em alguns compostos como tensoativos não iônicos e alguns ácidos graxos (WALTERS, 1988; ONGPIPATTANAKUL *et al.*, 1991). O óleo adicionado na nanoemulsão, triglicérides do ácido cáprico e caprílico (TAAC), é promotor de permeação por possuir

cadeia média e ser constituído principalmente por ésteres de ácidos caprílicos (C8) e cápricos (C10) (MARTEN; PFEUFFER; SCHREZENMEIR, 2006). Os tensoativos utilizados assim como suas concentrações não possuem restrições pelo Comitê Científico de Consumo seguro (Scientific Committee on Consumer Safety- SCCS), sendo portanto seguros (SCCS, 2014).

Desta forma, a elaboração de nanoemulsão com cafeína, adequada ao uso tópico, com capacidade de promover a permeação e liberar o fármaco na derme e/ou tecido adiposo em níveis terapêuticos relevantes representa perspectivas na elaboração de formulações anticelulíticas.

3 - OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver e avaliar nanoemulsões com cafeína com finalidade anticelulítica quanto às suas características físicas, físico-químicas, químicas, durante os estudos de estabilidade, segurança de uso e eficácia (permeação cutânea).

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver e caracterização da nanoemulsão contendo cafeína seguindo a metodologia de emulsificação por Temperatura de Inversão de Fase (TIF), hidrófilo-lipofílico (EHL), diagrama de fases pseudo ternário e condutividade;
- Analisar a preparação quanto ao Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) e Normal (TEN) e o teor de cafeína na nanoemulsão ao longo da TEN;
- Caracterizar física e química da nanoemulsão com cafeína: valor do pH, tamanho de micela, índice de polidispersão, potencial zeta, percentual de Transmitância e calcular o índice de Ostwald;
- Avaliar o comportamento da cafeína isoladamente ou associada aos ingredientes da nanoemulsão em diferentes valores de pH (Espectroscopia Raman);
- Validar método cromatográfico de doseamento da cafeína na nanoemulsão e na permeação cutânea;
- Determinar o teor da cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) durante o TEN;
- Avaliar a eficiência de associação da cafeína na micela;
- Avaliar a segurança de uso da nanoemulsão pelo HET-CAM – *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*;
- Avaliar o potencial de permeação cutânea em membrana natural (pele humana) utilizando células de Franz, quantificando a cafeína na superfície, epiderme, derme e líquido receptor através de método bioanalítico validado.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias primas International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (I.N.C.I.) e nome comum

Grau de pureza farmacêutico

- Caffeine Anhydrous – Henrifarma[®] de pureza de 99%
- Caffeine Anhydrous – Sigma Aldrich[®] padrão de referência de pureza de 100%
- Citric acid - Biovital[®]
- Oleyl ether (BRIJ 03 LQ[®]) – Croda[®]
- Phenoxyethanol (and) metil (and) etil (and) butil (and) propil (and) isobutil parabenos (Phenonip[®]) – Pharma Special[®]
- Polyoxyethylene (20) oleyl ether (BRIJ 020 SS[®]) – Croda[®]
- Sodium Chloride (cloreto de sódio 0,9% p/v) – Pharma Special[®]
- Triglyceride capric/Caprylic (Crodamol GTC[®]) - Mapric[®]
- Triethanolamine – Mapric[®]

Outros

- Ovos fecundados de fornecedor padronizado (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP)
- Aqua MILLIQ[®]

4.1.2. Solventes e reagentes

Reagentes grau de pureza cromatográfico

- Acetonitrila - Merck[®]

Reagentes grau de pureza analítica (P.A.)

- ◆ Ácido acético Glacial – Synth[®]
- ◆ Cloreto de potássio – Alpha Galvano[®]
- ◆ Fosfato de potásio monobásico – QM[®]
- ◆ Fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado – Acofarma[®]
- ◆ Hidróxido de sódio – Synth[®]

- ◆ Dodecyl sulfato de sódio (SDS) - Synth[®]

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- Agitador de tubos – Marca IKA[®], Modelo Vortex Genius 3
- Agitador magnético - Marca Marte[®], Modelo Mag-Multi
- Agitador magnético com chapa de aquecimento - Marca Ika[®], Modelo C-MAG HS7
- Aquário – Marca P.G - Aquários[®]
- Balança analítica – Marca Shimadzu[®], Modelo AUX220
- Balança semi-analítica – Marca Mettler[®], Modelo P – 120
- Banho termostatzado - Marca Nova Ética[®], Modelo 11103/01
- Bomba de vácuo - Marca Fischer Scientific[®], Modelo Maximadry
- Câmera microscópio – Marca Dino-Lite[®], Modelo AM-211
- Células de Difusão vertical, área de difusão do compartimento doador de 2,2 cm² e volume do compartimento receptor de 3ml, Fornecedor: Unividros
- Centrífuga – Marca HITACHI[®], Modelo Himac CF-RN series
- Chocadeira – Marca Chocmaster Network[®], Modelo Y39UQ
- Condutivímetro – Marca Digimed[®], Modelo DM-31
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência–Marca:Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Desgaseificador - Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Bomba- Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Módulo de Comunicação - Marca Shimadzu[®], Modelo LC-20AD/T
- Amostrador - Marca Shimadzu[®], Modelo SIL-20AHT
- Detector de fluorescência - Marca Shimadzu[®], Modelo JPD-M20A
- Detector DAD - Marca Shimadzu[®], Modelo JPD-M20A
- Forno de Coluna - Marca Shimadzu[®], Modelo CTO-20^a
- Coluna C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm) – Shimadzu[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS – Marca: Thermo Scientific[™], Modelo Evolution 300, com cubetas de quartzo caminho ótico de 1cm.
- Espectrômetro Raman de Marca Renishaw inVia Reflex[®]
- equipado com câmera CCD (Renishaw[®] 600x400 pixels), acoplado a um microscópio e objetiva Leica[®], Modelo DM2500M e laser de diodo Renishaw[®]

- Estufa – Marca Ethiktechnology[®], Modelo 402/3N
- Filtros para centrífuga com membrana de 10 kDa – Marca: Merck[®], Modelo Amicon Ultra-0,5
- Filtro MF-Millipore 0,45µm – Marca Merck[®]
- Geladeira – Marca Consul
- Paquímetro – Marca: Kingtools-Vernier Caliper[®] 150x0,005 mm/6"
- pHmetro digital de bancada - Marca Quimis[®], Modelo Q400AS
- Purificador de água – Marca Gehaka[®], Modelo OS10LX
- Sistema de Purificação de Água MilliQ[®] - Marca: Simplicity[®], Modelo Ultrapure Water Type 1
- Softwares
 - LC Solutions
 - Malvern[®]
 - Minitab[®] 17 version
 - Origin[®]
- Tewameter TM300[®]
- Termômetro de infravermelho (-38° C a +365 °C) – Marca: Scan Temp
- Termostato 33 °C – Marca Roxin, Modelo Ht-1300
- Marca: Tewameter Courage Kazako[®], Modelo TM 300
- Zetasizer Nano ZS90 - Marca: Malvern Instruments, Malvern, UK[®]

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção da nanoemulsão contendo cafeína

Os componentes das formulações foram pesados e adicionados em béquer de vidro. A mistura foi aquecida e agitada com agitador magnético de maneira controlada até atingir a temperatura de $(80,0 \pm 5,0 \text{ } ^\circ\text{C})$. Posteriormente, a formulação foi resfriada sob agitação constante, à temperatura ambiente $(22,0 \pm 2,0 \text{ } ^\circ\text{C})$ e foi corrigido o pH para valor mais conveniente para a pele. As formulações foram caracterizadas conforme os **itens 4.2.2.; 4.2.3. e 4.2.4.**

4.2.1.1 Cálculo do equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL)

O EHL da nanoemulsão foi dado de acordo com a **Equação 1**.

$$\mathbf{EHL}_{\text{final}} = (\mathbf{EHL}_A \times 0,01 \times A + \mathbf{EHL}_B \times 0,01 \times B)$$

Equação 1: Cálculo do EHL final.

Legenda: EHL final é a soma dos tensoativos, sendo *A* a porcentagem do tensoativo hidrofílico e *B* a porcentagem do lipofílico. $A+B=100$ (GRIFFIN, 1949).

O valor do EHL *A* corresponde ao valor do EHL do éter oleílico de polioxietileno (20) (15,3) e o EHL *B* corresponde ao EHL do Oleth-3r (6,6) (CRODA, 2006).

Uma emulsão típica necessita considerar o EHL necessário para o óleo ser incorporado na formulação. O EHL requerido para emulsionar o óleo Triglyceride capric/Caprylic (Crodamol GTC[®]) adicionado a formulação é 10,81 (MAPRIC, 2007).

Os ingredientes das formulações quali e quantitativamente se encontram na **Tabela 1**.

4.2.1.2 Obtenção do diagrama de fases pseudoternário

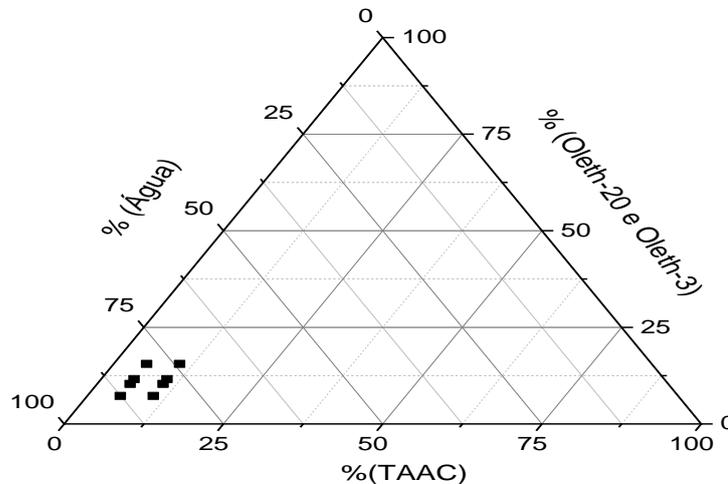
O diagrama de fases pseudoternário foi obtido pelo software Origin[®] 2016. A região do diagrama de fases onde se localizam os pontos quadrados negros, correspondem à região do sistema onde se encontram as emulsões. Essa condição ocorre devido à maior quantidade de água e menor concentração de óleo e tensoativo. Representados como triângulos equiláteros, os diagramas de fase construídos mostram a proporção de cada componente utilizado (quadrados negros), bem como as regiões dos diferentes sistemas encontrados (diagrama de linhas). Cada vértice do triângulo corresponde a 100% de cada fase, estando representados no vértice superior o óleo (TAAC), no vértice esquerdo a fase aquosa e, no direito, os tensoativos. Para a leitura das concentrações, em porcentagem, de cada componente em qualquer ponto do diagrama de fases, deve-se seguir a orientação horária, sendo que no eixo oposto ao vértice superior está representada a fase oleosa, no eixo oposto ao vértice esquerdo, o tensoativo, e no eixo oposto ao vértice direito, a fase aquosa. Os pontos no diagrama representam as emulsões. Conforme visualizado na **Figura 8**.

Tabela 1. Composição quali e quantitativa (%p/p) das preparações avaliadas na metodologia de Teste de Estabilidade Preliminar (TEP) (1 a 6).

Componentes/INCI Name	F1	F2	F3	F4	F5	F6
1. Triglicérides de ácido cáprico e caprílico (<i>CAPRYLIC/CAPRIC TRIGLYCERIDE*</i>)	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
2. (<i>OLETH-3*</i>) (<i>OLEHYL ETHER</i>)	9,4	6,7	5,6	0,6	6,2	4,2
3. Álcool oleílico etoxilado (<i>OLETH-20*</i>)	1,8	4,5	5,6	10,6	5,0	7,0
4. Cloreto de sódio (<i>SODIUM CHLORIDE*</i>)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
5. Fenoxietanol (e) metilparabeno (e) etilparabeno (e) butilparabeno (<i>PHENOXYETHANOL (AND) METHYLPARABEN (AND) ETHYLPARABEN (AND) BUTYLPARABEN (AND) PROPYLPARABEN (AND) ISOBUTYLPARABEN*</i>)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
6. Cafeína anidra (<i>CAFFEINE*</i>)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
7. Água MilliQ® (<i>ACQUA*</i>) q.s.p. 50ml	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0

Legenda: (*) = INCI Name - International Nomenclature of Cosmetic Ingredient (BRANDÃO, 2009).

Figura 8: Diagrama de fases pseudoternário das emulsões O/A.



4.2.1.3 Temperatura de Inversão de Fases e da Tcb

A temperatura de inversão de fases foi determinada a partir de $40,0 \pm 5,0$ °C inserindo diretamente o eletrodo na amostra com o auxílio de um condutímetro (Digimed) aferido com solução padrão KCl de condutividade $1412 \mu\text{s}/\text{cm}$ a 25 °C (Digimed DM 56A), durante o aquecimento da amostra em agitador magnético com chapa de aquecimento, sob temperatura controlada e agitação constante.

As leituras foram realizadas a partir de $40,0 \pm 5,0$ °C, permitindo que o eletrodo do condutímetro e o termômetro estivessem em contato com a formulação até atingir 85,0 °C. A inversão da emulsão O/A para A/O foi determinada quando ocorreu redução brusca no valor da condutividade elétrica (FERNANDEZ *et al.*; 2004). A temperatura de *clearing boundary* (Tcb) foi percebida visualmente e ocorre alguns graus abaixo da temperatura de inversão de fases. O aspecto visual notado é azulado e transparente ou opalescente (MEI *et al.*, 2011).

4.2.1.4 Condutividade Elétrica

Foi determinada a partir de $40,0 \pm 5,0$ °C inserindo diretamente o eletrodo na amostra. O aparelho (Digimed® – Modelo DM-31) foi aferido com solução padrão KCl de condutividade $1412 \mu\text{s}/\text{cm}$ a 25 °C (Digimed® DM 56A).

4.2.2. Teste de Estabilidade Preliminar (TEP)

Após 48 h do preparo, a nanoemulsão escolhida por sua transparência foi submetida ao *Teste de centrifugação* e do *Estresse térmico*, com o objetivo de verificar o comportamento na estabilidade preliminar para ser utilizada nas próximas etapas do projeto (BRASIL, 2004).

4.2.2.1 Teste de centrifugação

Em tubo de ensaio foram adicionadas quantidades de amostra, de tal forma que, o conjunto pesou em balança semi-analítica, o equivalente a 15,0 g e, posteriormente, foram submetidas em centrífuga à velocidade de rotação de 3000 rpm por 30 minutos, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) (PIANOVSKI *et al.*, 2008).

Após o ensaio, a formulação foi analisada macroscopicamente quanto ao aspecto (como separação de fases) e classificadas como segue:

- i. (M) para modificada;
- ii. (N) para normal, sem alteração quanto ao aspecto (BABY *et al.*; 2007).

4.2.2.2 Estresse térmico

Aproximadamente 10,0 g da formulação escolhida foi submetida ao aquecimento em banho termostático no intervalo de temperatura controlada entre 40,0–70,0 °C; com progressão de elevação de 10,0 °C a cada 30 min. Após seu arrefecimento à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), as formulações foram avaliadas quanto às possíveis modificações do aspecto e classificadas conforme **item 4.2.2. a)** (PIANOVSKI *et al.*, 2008).

4.2.3. Teste de Estabilidade Normal (TEN)

A formulação aprovada na *Avaliação de Estabilidade Preliminar* foi submetida à *Avaliação de Estabilidade Normal*, em diferentes valores de temperaturas como geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C); estufa ($45,0 \pm 2,0$ °C) pelo período de 90 dias, sendo avaliada nos dias: 1°, 7°, 15°, 30°, 60° e 90° (BRASIL, 2004). O tempo inicial (t_0) de análise correspondeu a 48h do preparo da formulação e serviu como referência comparativa.

Foram avaliados os seguintes parâmetros: classificadas, como normal (N) e modificadas (M). Das 6 formulações avaliadas escolheu-se a de melhor desempenho.

4.2.3.1 Caracterizações físicas, físico-químicas e química da nanoemulsão

a) Propriedades organolépticas

Foram avaliados: aspecto (modificado ou normal), cor e odor.

b) Valor de pH

O valor do pH foi determinado em pHmetro (Quimis[®]) por imersão direta do eletrodo (específico para emulsão) na nanoemulsão, à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C).

c) Análise Estatística dos Resultados

O tratamento estatístico dos resultados foi realizado no TEN pelo programa Minitab[®], versão 17 utilizando a ferramenta de análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

d) Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e Potencial Zeta

d₁) Tamanho de gotícula e índice de polidispersão

O diâmetro médio foi avaliado por método de espalhamento de luz dinâmico ou *Dynamic Light Scattering* (DLS). A água é o meio dispersante observando-se a luz espalhada em ângulo de 90 °C. Os resultados correspondem à média de três determinações à temperatura de 25 °C. Foi empregado o equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK[®]). Essa etapa é fundamental para determinar se as formulações contendo cafeína mantêm-se como nanoemulsão ao longo do tempo de análise nas diversas condições de temperatura e se são classificadas como monodispersas ou polidispersas (SPINELLI *et al.*, 2010).

Para esta análise, a nanoemulsão foi diluída em água ultrapura MilliQ[®] na proporção de 1:5, sendo 1 parte da nanoemulsão (1000 µl) para 4 ml (4.000 µl) partes de água ultrapura MilliQ[®].

d₂) Potencial zeta

A carga da superfície da partícula foi avaliada por medição do potencial zeta usando o método de mobilidade eletroforética no Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK[®]). A força do campo aplicado foi de 20 V/cm. A mobilidade electroforética da partícula foi convertida em potencial zeta em unidade de mV utilizando a equação Helmholtz-Smoluchowski (do aparelho).

A diluição da amostra foi a mesma empregada na avaliação do item a).

e) Transmitância da nanoemulsão no TEN

O percentual de transmitância da nanoemulsão foi mensurado por espalhamento e absorção das nanogotículas, utilizando espectrofotômetro no UV-visível com feixe duplo, cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e água destilada como branco. Foi escolhido comprimento de onda (540 nm) dentro da faixa de espalhamento correspondente ao visível (350-750 nm) (ALMEIDA *et al.*, 2005). Adaptado da literatura científica (SRILATHA *et al.*, 2013).

f) Espectroscopia Raman

Utilizou-se um espectrômetro Renishaw inVia Reflex[®], equipado com câmera CCD (Renishaw[®] 600x400 pixels) refrigerado termoeletricamente e acoplado a um microscópio Leica[®], modelo: DM2500M; a linha laser em 785 nm (laser de diodo, Renishaw[®]) foi focalizada na amostra por uma objetiva Leica[®] com aumento de 50x (abertura numérica de 0,75). As amostras foram alocadas em um suporte para amostras líquidas e os espectros foram registrados no intervalo de 400-1800 cm⁻¹ com a potência do laser em aproximadamente 10 mW na amostra. Foram comparados os espectros da cafeína anidra e soluções com cafeína em diversos pHs para verificar a possível protonação, assim como a comparação deste ingrediente ativo com outros ingredientes orgânicos da nanoemulsão.

g) Constante de instabilidade de Ostwald

A teoria de Lifshitz, Slesov e Wagner (LSW) menciona que a estabilidade da emulsão depende da solubilidade do óleo na fase aquosa. Essa teoria contribuiu para a constante de instabilidade de Ostwald. O ensaio de TEN propiciou o cálculo da constante de instabilidade de Ostwald. Sendo assim, caso o aumento do diâmetro das gotículas ocorra pela difusão de moléculas de óleo das gotículas menores para as maiores, uma relação linear entre a média do raio da gotícula ao cubo (r_N^3) e tempo (t), é normalmente observada. Neste caso, a constante de instabilidade de Ostwald (ω_3), foi obtida pela inclinação da curva (dr_N^3/dt). No entanto, quando o mecanismo envolve o transporte de moléculas de óleo dentro de gotículas, a relação linear depende do tempo e envolve o raio quadrado da gotícula (r_N^2). Neste caso, a constante de instabilidade de Ostwald (ω_2), é definida pela inclinação da curva dr_N^2/dt (WEISS *et al.*,

2000; WEISS *et al.*, 1997). Para a aplicação da teoria LSW é exigido o valor de raio médio (r_N), no entanto, as medições de espalhamento de luz dinâmica fornecem raio médio baseado em intensidade (r_I). Este valor foi dividido por 1,18 para obter r_N (WOOSTER *et al.*, 2008; DARIO *et al.*, 2016).

4.2.4. Validação do método analítico e bioanalítico

4.2.4.1 Identificação e quantificação da cafeína na nanoemulsão

As condições cromatográficas para o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram utilizadas na determinação e identificação da concentração de cafeína.

A fase móvel foi composta por acetonitrila: solução de 1% de ácido acético glacial em água ultrapura (MilliQ-Millipore) (15:85), filtrada em membrana de celulose de 0,45 μm . O fluxo foi de 0,4 ml/min, volume de injeção de 10 μl , detecção a 273 nm, temperatura de 25 °C, equipamento da Shimadzu®, Detector DAD UV, coluna C18 Shimadzu®, (150 mm x 4,6 mm x 3 μm) (FERREIRA, *et al.*, 2008).

4.2.4.2 Linearidade

A linearidade de um método consiste na proporcionalidade direta dos resultados obtidos com a concentração do analito presente na amostra a ser analisada, dentro dos limites de variação (ICH, 2005; USP, 2013, BRASIL, 2003a).

A linearidade foi avaliada no intervalo de concentração de 4,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de cafeína e o solvente utilizado foi o tampão fosfato (PBS) cuja composição foi baseada na Farmacopéia Brasileira (BRASIL, 2010). Foram avaliadas seis concentrações em triplicada. A obtenção do cálculo da equação da reta se deu por regressão linear (BRASIL, 2003a; BABY, 2007; ICH, 2005; USP, 2013)

4.2.4.3 Precisão e Exatidão

A precisão avalia o grau de concordância dos resultados obtidos quando tomadas várias amostragens de uma mesma amostra. Considera-se a repetibilidade intra-dia, curto período de tempo com o mesmo analista e mesmo laboratório e a repetibilidade inter-dia (precisão intermediária), que representou a variabilidade dos resultados em dias diferentes de análise (USP, 2013).

A precisão e a exatidão foram avaliadas por meio da repetibilidade intradia e interdias. Expressas como desvio padrão relativo (DPR) na **Equação 2**. Três concentrações foram avaliadas em triplicata: 4,0; 20,0 e 100,0 mg/ml. As amostras foram analisadas no mesmo dia para repetibilidade intradia e em três dias diferentes para a repetibilidade interdias.

$$\text{DPR}(\%) = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

Equação 2: Desvio Padrão Relativo do método analítico.

Legenda: *DP* - desvio padrão; *CMD* - concentração média determinada = média das 3 determinações; *DPR* - desvio padrão relativo.

A exatidão de um método analítico representa a proximidade dos valores experimentais com os considerados verdadeiros. O resultado deve ser o mais próximo de 100% calculado por meio da **Equação 3** (BRASIL, 2003a, USP, 2013, RIBANI *et al.*, 2004).

$$\text{E}(\%) = \frac{\text{CME}}{\text{CT}} \times 100$$

Equação 3: Cálculo da Exatidão do método analítico

Legenda: *E* - Exatidão; *CME* - Concentração Média Experimental; *CT* - Concentração Teórica.

Alíquotas de 500 µl de concentrações conhecidas (10,0; 20,0 e 100,0 µl/ml) de solução de cafeína em PBS, padrão de referência secundário, foram adicionadas em 500 µl das matrizes biológicas (EPI.; DERM.; EPI.+DERM.+PBS), onde as concentrações teóricas foram (4,0; 20,0 e 100,0 µl/ml) correspondentes ao Controle de Qualidade baixo (CQB), Controle de Qualidade médio (CQM) e Controle de Qualidade alto (CQA), respectivamente. A mistura foi filtrada em membrana de 0,45 µm (*Milipore*®) e o volume injetado foi 10 µl no cromatógrafo.

4.2.4.4 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação simultânea foi avaliado por meio da análise de diferentes concentrações da cafeína até o valor onde a amostra apresentou valores de precisão e exatidão adequados.

4.2.4.5 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção e o limite de quantificação correspondem a menor concentração de uma amostra a ser detectada (BRASIL, 2003a; USP 2013).

O limite de detecção do método foi estimado baseado nos resultados dos cálculos de regressão linear de três curvas de calibração que foram construídas com as concentrações próximas ao limite de quantificação, sendo expresso pela **Equação 4** (BRASIL, 2003a):

$$LD = \frac{DP}{IC} \times 3$$

Equação 4: Limite de Detecção do método analítico.

Legenda: DP - Desvio padrão do intercepto com o eixo y das 3 curvas de calibração; IC - Inclinação da curva de calibração.

4.2.4.6 Especificidade e pesquisa de interferentes

A especificidade é a capacidade de avaliar de forma inequívoca um composto em presença de outros, os quais possam interferir na avaliação, como uma matriz complexa (RIBANI *et al.*, 2004; USP, 2013; BRASIL, 2003a).

Com o intuito de pesquisar possíveis interferentes como produtos de degradação, outros ingredientes da formulação, solvente utilizado no líquido receptor e substâncias presentes na pele humana, foi avaliada a pureza do pico do padrão da cafeína por meio do software LC solutions[®] no HPLC e do ensaio de recuperação do padrão nas amostras biológicas (EPI.; DERM.; EPI.+DERM.+PBS) aditivadas com cafeína para verificar possíveis sobreposições de picos da matriz.

4.2.5. Teor da cafeína por CLAE durante o TEN

De acordo com o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos é indicado a avaliação do teor do ingrediente ativo durante a estabilidade (BRASIL, 2004).

Conhecendo a concentração teórica de cafeína na nanoemulsão **F3** (10,0 mg/ml), foi feita diluição da mesma em PBS de modo que a concentração final fosse de 100 µg/ml, por meio da **Equação 5**.

$$C_1.V_1=C_2.V_2$$

Equação 5: Equação de diluição

Legenda: C_1 : concentração inicial conhecida antes da diluição, V_1 : volume inicial, C_2 : concentração desejada, V_2 : volume para diluição.

Foi retirada a alíquota de 100 μ l da nanoemulsão **F3** e transferida para um balão de 10ml, completou-se o volume com PBS, homogeneizou-se manualmente e em seguida retirou-se a alíquota de 1000 μ l do balão e filtrou-se em membrana de 0,45 μ m e transferiu-se para o vial de vidro de 1,5 ml. Foi injetado 10 μ l da amostra de acordo com as condições cromatográficas validadas para a detecção de 273 nm. Por meio das áreas dos picos foram obtidas as concentrações, conforme a **Tabela 9**.

4.2.6. Eficiência de Associação (EA%) da cafeína nas gotículas

A eficiência de associação da cafeína nas gotículas da nanoemulsão (NECAF) foi determinada por cálculo da diferença entre a concentração total de cafeína e a livre na nanoemulsão. Para quantificar a cafeína livre foi utilizado o método por CLAE, com coluna C18 (150 \times 4,6 mm, 3 μ m de tamanho de partícula) (Shimadzu, Japão), precedida por uma coluna guarda (10 \times 4,6 mm). A fase móvel foi composta de acetonitrila: solução de ácido acético glacial (pH 3,0) (15:85) com taxa de fluxo de 0,4 mL/min à temperatura ambiente. A detecção foi a 273 nm, utilizando um arranjo de diodos com detecção no UV (Shimadzu, Japão). O tempo de retenção foi de 17,8 min. Para calcular a concentração de cafeína livre, 300 μ l da nanoemulsão foi adicionada em uma unidade de filtração (10 kDa Amicon; Millipore®, USA) e centrifugada a 21,400 g por 30 min a 25,0 \pm 1,0 °C. O sobrenadante foi quantificado por metodologia descrita anteriormente. Eficiência de Encapsulamento da cafeína na gotícula foi calculado conforme **Equação 6**.

$$EA\% = \frac{C(T) - C(L)}{C(L)} \times 100$$

Equação 6: EA - Eficiência de Associação (%) da cafeína nas gotículas.

Legenda: $C(T)$: concentração total de cafeína na nanoemulsão; $C(L)$: concentração de cafeína livre na nanoemulsão.

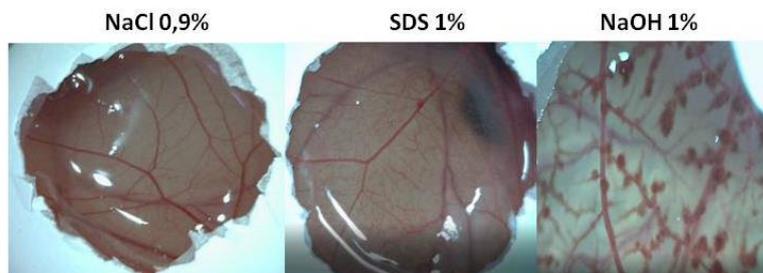
4.2.7. Avaliação do potencial de irritação ocular

No intuito de reduzir ou substituir os coelhos que são submetidos ao Teste de Draize, o método HET-CAM – Hen’s Egg Test – *Chorioallantoic Membrane* foi escolhido por ser um teste *in vitro* comparável ao ensaio mencionado anteriormente, além de apresentar alta viabilidade em seu emprego e se tratar de uma alternativa para testes envolvendo substâncias corrosivas e/ou fortemente irritantes que provocariam extremo *stress* às cobaias (ALLTOX, 2016). Esse ensaio é um dos empregados para avaliação da segurança, não sendo portanto conclusivo.

Os ovos de galinhas do tipo legorne branca, galados fecundados (também denominados galados) foram incubados por 10 dias a 37 °C e 65% de umidade relativa na incubadora de ovos Chocmaster[®]. Após o período de incubação, foram abertos com auxílio de uma pinça e a membrana da casca foi hidratada com 300 µL de solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v), sendo retirada delicadamente com a pinça. Posteriormente, o mesmo de volume de amostra da nanoemulsão com cafeína foi depositada sobre a membrana *corioalantóide*. Os controles positivos do teste foram realizados com dispersão de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,0% (p/v), dispersão do hidróxido de sódio (NaOH) a 1,0% (p/v) e o controle negativo com solução fisiológica, a qual constitui cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% (p/v), conforme apresentado na **Figura 9** (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2006).

O ovo foi acomodado em um suporte e a câmera posicionada de maneira a registrar as alterações da membrana *corioalantóide* com nitidez. A imagem capturada contemplou a gema do ovo ou saco vitelino de cor amarela ao fundo e vasos sanguíneos em destaque. Os eventos vasculares (hemorragia, lise ou coagulação) foram gravados por 5 min (câmera Dino-Lite[®], Modelo AM-211) e analisados posteriormente. O ensaio foi realizado em triplicata. O índice de irritação ocular (IS) foi calculado de acordo com a **Equação 7** (KALWEIT *et al.*, 1990; NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2006).

Figura 9: Fotos dos controles negativos e positivos utilizados durante o ensaio.



$$IS = \frac{(301 - H)}{300} \times 5 + \frac{(301 - L)}{300} \times 7 + \frac{(301 - C)}{300} \times 9$$

Equação 7: Cálculo do Índice de irritação ocular.

Legenda: *IS*– índice de irritação ocular; *H*– tempo (s) para iniciar um evento hemorrágico; *L* - tempo (s) para iniciar uma lise vascular; *C* - tempo (s) para iniciar uma coagulação.

De acordo com a **Equação 7**, os produtos podem ser classificados de acordo com a **Tabela 2**.

Tabela 2: Classificação do potencial de irritação ocular no método HET-CAM (KALWEIT *et al.*, 1990)

Índice de irritação ocular (IS)	Classificação
0 – 0,9	Não irritante
1 – 4,9	Levemente irritante
5 – 8,9	Moderadamente irritante
9 – 21	Fortemente irritante

4.2.8. Permeação cutânea

Inicialmente foi realizado estudo de solubilidade da cafeína em tampão PBS pH 7,4. Segundo Budavari *et al.* (1996), a cafeína apresenta solubilidade em água de cerca de 21,74 mg/ml. Desse modo, soluções saturadas de cafeína foram preparadas adicionando-se excesso dessa substância (30,76 mg/ml) em tampão PBS pH 7,4. As soluções foram agitadas durante 24 horas à temperatura de 25 °C. Após, efetuou-se a separação da cafeína não solubilizada centrifugando a 3000 rpm utilizando rotor 36 por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,45 µm e transferido para um vial de 1 ml, em seguida, a leitura no cromatógrafo foi de acordo com o método 4.2.8., onde o volume de injeção foi de 10 µl. O experimento foi realizado em triplicata.

Foram realizados ensaios para avaliar a liberação *in vitro* da cafeína. Estes em células de difusão vertical de dois compartimentos (células de Franz), de acordo com procedimento

recomendado pela Farmacopéia Americana (*United States Pharmacopeia*) e formulário nacional NF31, conforme descrito em *Pharmacopeia Forum* (2009) para produtos tópicos (semi-sólidos) e transdérmicos com modificações.

Para esse estudo, foi utilizada a pele humana retirada de cirurgia plástica abdominal, limpa e com a gordura subcutânea removida, doador do gênero masculino e com 19 anos de idade. O experimento foi aprovado pelos Comitês de ética da UNIFESP e da USP, número processo 516508.15.0.3001.0067. A pele humana foi congelada a -5 °C e utilizada uma semana depois. Após serem reidratadas com PBS, o mesmo utilizado no líquido receptor, a integridade da pele foi avaliada pelo método físico de perda de água transepidermica (TEWL) com sonda e base do equipamento Tewameter®. (GIOIA & CELLENO, 2002, PAEPE *et al.*, 2002).

A relação dose/área aplicada na pele corresponde a 2 mg/cm², de acordo com a literatura (SCHALKA, 2011). Alíquota de 150 µl (10 mg/mL) da nanoemulsão contendo cafeína foi aplicada na superfície da pele. Foram recolhidas amostras nos tempos: t0, t1 h, t2 h, t3 h, t4 h, t22 h e t24 h. O líquido receptor utilizado foi PBS de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^aed. e colocado em banho aquecido a 32,0 °C, sob constante agitação mecânica. A solubilidade das substâncias no fluído receptor foi verificado antes do experimento.

A concentração da cafeína foi identificada e quantificada em 4 diferentes regiões da pele: Superfície da pele (*SP*), Epiderme (*E*), Derme (*D*) e Fluído Receptor (*FR*) por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Concentração de cafeína acumulada na pele foi plotada em função do tempo (t). O coeficiente de permeabilidade aparente (**P_{app}**) foi determinada pela **Equação 8**, baseada na literatura (SINTOV & GREENBERG, 2014):

$$P_{app} = \frac{\Delta Q}{\Delta t} \times \frac{1}{A} \times \frac{1}{C_0}$$

Equação 8: Coeficiente de permeabilidade aparente.

Legenda: **P_{app}**: coeficiente de permeabilidade aparente, **ΔQ**: concentração de cafeína acumulada, **Δt**: variação do tempo em horas, **A**: área de difusão no compartimento doador e **C₀**: concentração inicial da cafeína na nanoemulsão adicionada no compartimento doador.

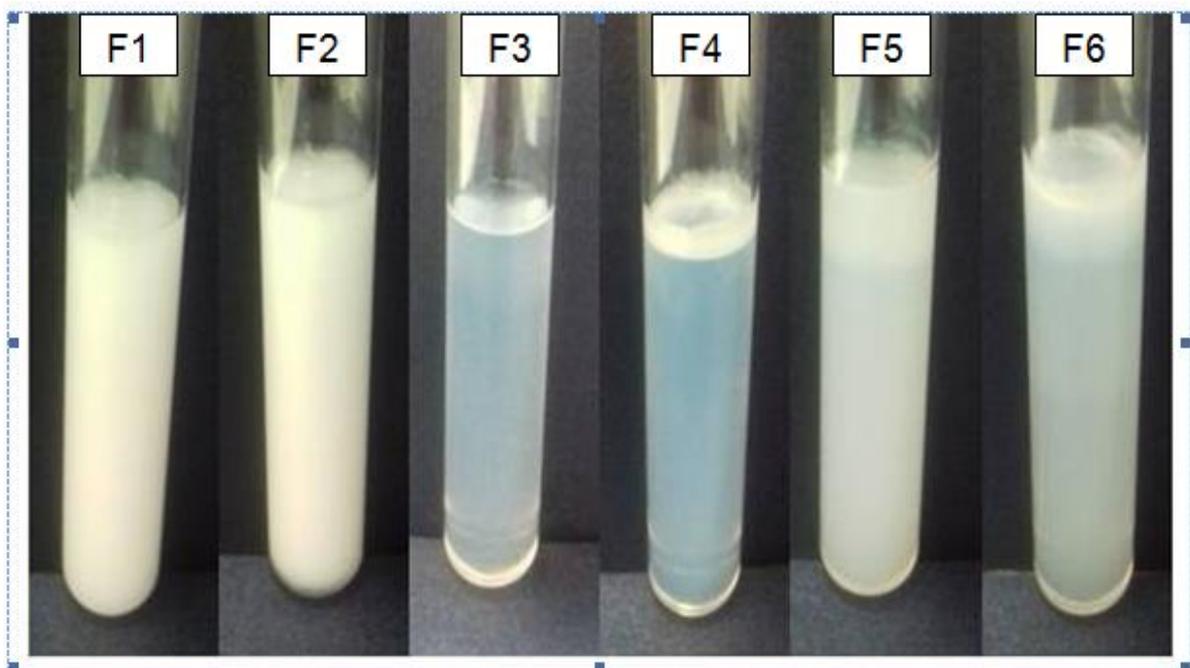
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção das nanoemulsões contendo cafeína

As nanoemulsões foram desenvolvidas pela metodologia sub-PIT ou abaixo da TIF, variando-se a proporção dos dois tensoativos não-iônicos necessários à formação da nanoemulsão (*Oleth-20* e *Oleth-3*), mantendo-se constante a soma da proporção deles na formulação (11,2% p/p), com EHL final de 11,1; o EHL foi calculado de acordo com a **Equação 1**, conforme metodologia adaptada (DARIO, 2016). A **Figura 10** apresenta o resultado final das nanoemulsões que estão descritas na **Tabela 1**.

Figura 10: Foto das emulsões e nanoemulsões descritas na **Tabela 1**.



Legenda: F: formulações descritas na **Tabela 1**.

5.1.1. Equilíbrio hidrófilo-lipofílico (EHL)

O EHL final foi calculado de acordo com a **Equação 1** referente ao item **4.2.1.a**. A nanoemulsão escolhida número **F3** apresentou valor de EHL final de 11,1.

5.1.2. Diagrama de fases pseudoternário

Conforme item **4.2.1.2**. e a **Tabela 1**, obtêve-se diagrama pseudoternário, alterando a proporção entre os tensoativos e mantendo a soma entre eles de 11,2% p/p e variando a

proporção do óleo entre 5 ou 10% p/p. A concentração de água foi quantidade suficiente para (q.s.p) 50 ml.

Após a elaboração das emulsões de acordo com o item **4.2.1.1** e **4.2.1.2**, a formulação **F3** foi escolhida por ser mais translúcida, indicando provável tamanho de partícula nanométrico devido à alta espalhabilidade da luz. A confirmação do tamanho da gotícula foi dada conforme descrita no item **4.2.4.c**.

5.1.3. Temperatura de Inversão de Fases e da Tcb

Durante o processo de inversão de fases da emulsão, um sistema O/ A é modificado para A/ O ou vice-versa e a curvatura da interface O/ A se altera gradualmente. A tensão interfacial do sistema vai decrescendo para valores mínimos, sendo que a obtenção de emulsões depende de gasto energético mínimo (BECHER & SCHICK, 1987; BROOCKS *et al.*, 1998; HOLMBERG *et al.*, 2002; MORRISON & ROSS, 2002, SAJJADI *et al.*, 2003a e b; SALLAGER *et al.*, 2004).

A temperatura de *clearing-boundary* (Tcb) obtida na nanoemulsão **F3** foi aproximadamente 80 °C e a formulação adquiriu aspecto opalescente e levemente azulado. A literatura registra que tal aspecto pode ser obtido durante o aquecimento, entretanto, nas formulações desenvolvidas neste trabalho, a melhor transparência foi obtida durante o resfriamento rápido por imersão em banho de gelo. Mei e colaboradores (2011) obtiveram formulações opalescentes azuladas aquecendo acima da Tcb, estratégia semelhante à adotada neste estudo. A formulação pode ser determinada, aproximadamente, pelo conhecimento da temperatura de inversão de fases ou visualmente.

A temperatura de inversão de fases (TIF) dos sistemas pode ser acelerada por *salting-out*. Assim, com a adição de sal no sistema, a temperatura de Tcb na qual a nanoemulsão fica transparente, translúcida ou opaca é menor, não sendo necessário fornecer mais energia para o sistema. A Tcb ocorre a poucos graus abaixo da TIF (MEI *et al.*, 2011). Neste trabalho foi adicionado à formulação o sal cloreto de sódio (NaCl) para se obter o efeito de *salting-out*.

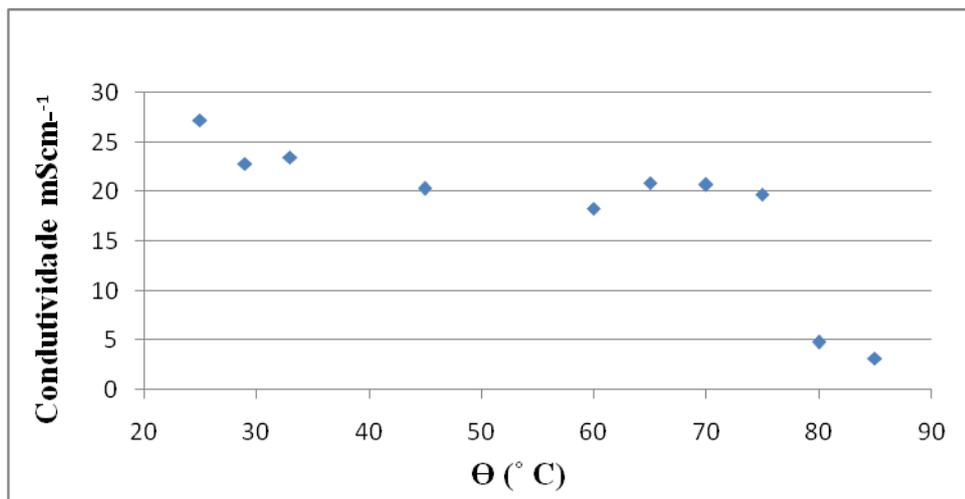
5.1.4. Condutividade Elétrica

Zhang e Michniak-kon (2011), relataram que a entidade condutiva da microemulsão O/A é a fase contínua aquosa. Partindo deste princípio, na inversão de fases onde a fase oleosa se torna a fase contínua, a condutividade cai bruscamente, sendo assim, a condutividade elétrica pode ser um indicativo de inversão de fases. Pelo exposto, a mensuração de tal

parâmetro se tornou o método comumente utilizado para caracterizar microemulsões, em vários estudos preconizados na literatura.

A temperatura que iniciou a inversão de fases na nanoemulsão com cafeína **F3** foi de 82 °C, sendo que a 85 °C ocorreu o menor valor de condutividade, conforme visto na **Figura 11**. À medida que a formulação foi resfriada em banho de gelo, a condutividade apresentou valores ascendentes próximos aos iniciais, indicando a volta do estado de nanoemulsão O/A.

Figura 11 – Condutividade com indicação de temperatura de inversão de fase, nanoemulsão com cafeína 1% p/p formulação **F3**.



Perfil de condutividade similar ao encontrado na literatura (MEI *et al.*, 2011).

5.2. Teste de Estabilidade Preliminar (TEP)

De acordo com MEI *et al.* (2011), a avaliação da estabilidade de longa duração de emulsões é essencial para assegurar maior prazo de validade de vários produtos de consumo, como medicamentos, cosméticos e alimentos, dentre outros. Devido sua instabilidade termodinâmica, as emulsões tendem a reduzir a sua energia livre total e de área interfacial por meio de alguns processos de degradação, tais como cremagem/sedimentação, agregação, floculação, coalescência e instabilidade de Ostwald.

Segundo Júnior e colaboradores (1999) diferentes fenômenos ocorrem durante a vida útil da emulsão como sinal de instabilidade, tais como: formação de ‘nata’ (*creaming*), que resulta da flutuação das gotas dispersas na superfície da emulsão; coagulação das gotas, que causa a formação de agregados constituídos de gotas individuais; coalescência das gotas

individuais, que se juntam e formam gotas maiores até estender a fase dispersa, a ponto de desestabilizar o sistema emulsionante.

Dentre os testes preconizados na avaliação da Estabilidade Preliminar, temos:

5.2.1. Teste de centrifugação

A nanoemulsão com cafeína 1% p/p **F3** foi classificada como normal (**N**) sem alteração quanto ao aspecto.

5.2.2. Estresse térmico

Neste ensaio, a nanoemulsão com cafeína 1% p/p **F3** não apresentou separação de fases até a temperatura de 70°C o que a classificou como predisposição a ser estável. No trabalho de Martini (2005), resultados indicaram que a energia térmica transferida durante o aquecimento pode induzir processo de aumento do diâmetro das gotículas por coalescência ou pelo processo convencionalizado *Ostwald ripening* (instabilidade). O aumento de temperatura para algumas emulsões promove a quebra do filme interfacial das gotículas, permitindo a transferência de massa entre elas.

A possível explicação a esse fenômeno encontra-se no fato de que as nanoemulsões possuem maior capacidade de solubilização em relação às dispersões micelares simples, oferecendo vantagens sobre a estabilidade de dispersões instáveis, tais como emulsões e suspensões, ao passo que estas, são produzidas utilizando pouca energia (calor). Contudo, a menor demanda de energia para sua formação não implica, necessariamente, em sua instabilidade (MALVERN INSTRUMENTS, 2016).

5.3. Teste de Estabilidade Normal (TEN)

5.3.1. Caracterizações físicas, físico-químicas e química da nanoemulsão

5.3.1.1 Propriedades organolépticas

O TEN não apontou modificação das propriedades organolépticas (aspecto, cor e odor) durante os 90 dias de teste em relação à formulação do início do experimento, para as condições de 25,0 ± 2,0 °C (ambiente) e 5,0 ± 2,0 °C (geladeira), no entanto, a condição de estufa (45,0 ± 2,0 °C) apresentou aspecto esbranquiçado opaco e separação de fases com 7 dias, conforme indicado na **Tabela 3**. A condição de temperatura elevada normalmente

acarreta maior instabilidade nas formulações (BABY, 2007; DARIO, 2016; PIANOVSKI, 2008).

Neste teste não houve formação de ‘nata’, agregação, coalescência e instabilidade de Ostwald nas condições de $25,0 \pm 2,0$ °C e $5,0 \pm 2,0$ °C, sugere estabilidade no aspecto das formulações desenvolvidas nestas condições (MEI *et al.*, 2011). Esta resposta orienta que a condição de armazenamento ideal deve evitar temperaturas elevadas.

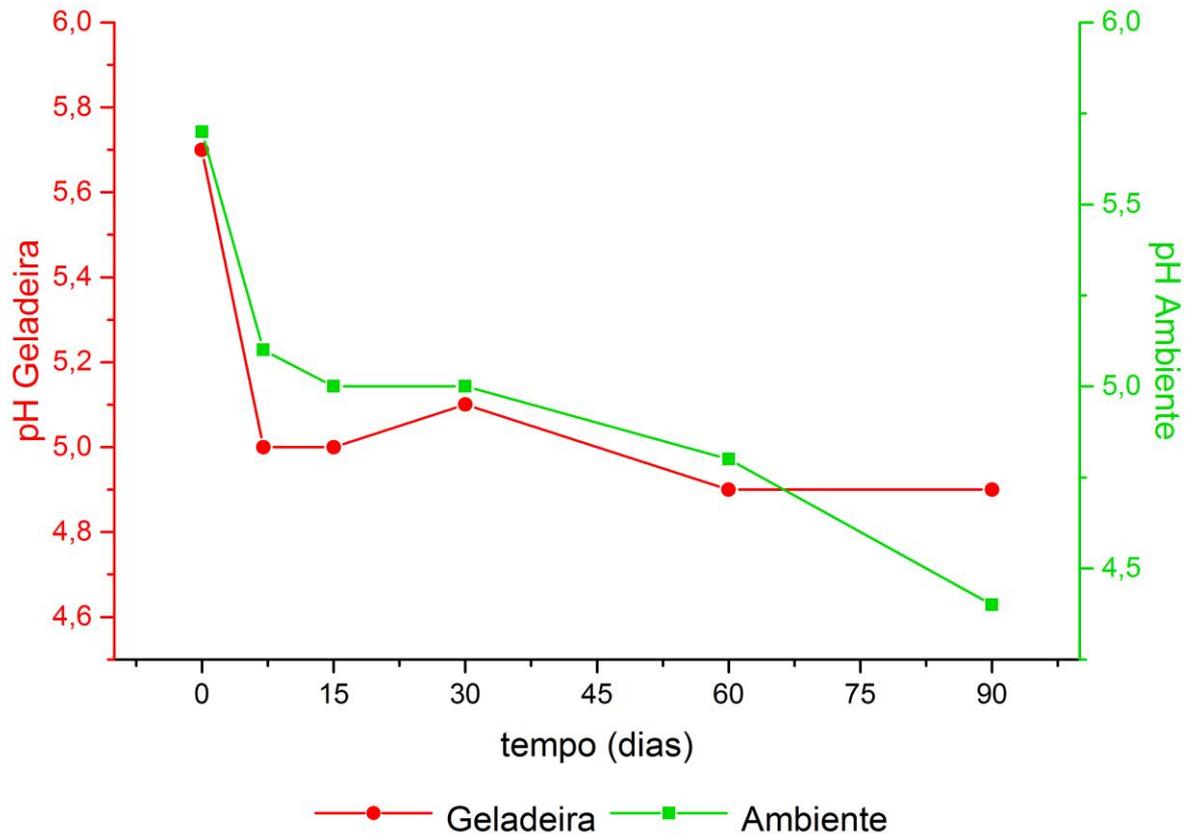
A nanoemulsão **F3** com cafeína permaneceu estável durante os 90 dias da TEN, nas temperaturas ambiente e de geladeira, o que pode ser explicado porque a cafeína de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5^a ed. é levemente solúvel em água. Segundo Kabalnov *et al.*, (1987) e Bergenstahl & Welin-berger (2000) quando o fármaco ou princípio ativo é pouco solúvel na fase contínua a estabilidade da emulsão é favorecida, permanecendo na fase dispersiva.

5.3.1.2 Valor de pH

Este é um importante parâmetro de monitoramento da estabilidade das emulsões, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final e seu prazo de validade. O pH determina a conformação de moléculas e sua estabilidade. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, a diminuição do seu valor pode ser decorrente da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos que geram ácidos graxos livres (MARTINI, 2005).

Segundo Martini (2005) os ácidos graxos livres reduzem o valor de pH das formulações, sendo utilizados como indicadores de estabilidade das nanoemulsões nas diferentes condições de armazenamento. Além disso, o pH final das nanoemulsões pode exercer influência na extensão de ionização dos componentes da interface. O óleo utilizado na nanoemulsão é derivado de óleo vegetal o que corroborou com a literatura. A seguir, apresentam-se os resultados dos valores de pH durante o (TEN) nas condições $25,0 \pm 2,0$ °C e $5,0 \pm 2,0$ °C, durante 90 dias, conforme **Figuras 12 e 13**.

Figura 12 – Valores de pH da nanoemulsão **F3** nas condições: $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) e $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira), durante o Teste de Estabilidade Normal.



Foi calculada a concentração molar dos íons $[H^+]$, porque os valores de pH são exponenciais e foi desejado verificar sua praticidade nos estudos de estabilidade (TORRES & MARZZOCO, 2007). Foi observado o decréscimo ou acréscimo dos valores com o decorrer do tempo, além do percentual de variação do valor de pH. Os valores para as condições de $25,0 \pm 2,0$ °C e $5,0 \pm 2,0$ °C decaíram no decorrer dos 90 dias do TEN.

Tabela 3. Características organolépticas (aspecto, cor e odor), valor de pH, percentual de variação do valor de pH e percentual de variação do teor de cafeína da nanoemulsão **F3** submetida ao Teste de Estabilidade Normal (TEN) no decorrer dos 90 dias.

Temperatura de Armazenamento																
Teste	25,0 ± 2,0 °C						5,0 ± 2,0 °C					45,0 ± 2,0 °C				
	tempo (dias)															
F3	0	7	15	30	60	90	7	15	30	60	90	7	15	30	60	90
Cor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	-	-	-	-
Aspecto	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	-	-	-	-
Odor	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	M	-	-	-	-
pH	5,7	5,1	5,0	5,0	4,8	4,4	5,0	5,0	5,1	4,9	4,9	-	-	-	-	-
(δ) do pH	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
(%) pH	*	*	2	2	6	13,7	*	*	2	2	2	-	-	-	-	-
(%) Teor de CAF	0	-5	-4,6	-5,6	-5,4	-9,4	-4,8	-4,7	-3,6	-11	-15					

Legenda: N: normal; M: modificada; **t0**: tempo de repouso (48 horas após preparo); (**δ**): desvio padrão do pH; (-): não avaliado devido separação de fases ou ser não aplicável; **t0**: tempo de repouso (48 horas após preparo); (*): tempo de estabilização do pH da nanoemulsão. A nanoemulsão **t0** foi considerada como referência para comparação com as demais formulações.

Conforme exemplificado a seguir:

Escala de pH

1-----7-----14

O pH zero é o mesmo que 1 mol/L^{H+} e pH 14 é o mesmo que 10⁻¹⁴.

Quanto menor a [H⁺] maior o valor de pH:

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]}$$

→ Por exemplo: [H⁺] = 0,1 mol/L

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[0,1]}$$

→ log 10 = 1, portanto 0,1M=pH=1

→ Por exemplo: [H⁺] = 0,01 mol/L

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[0,01]}$$

→ log 100 = log 10²=2, portanto 0,01 mol/L = pH 2

$$\text{pH} = \log \frac{1}{[1 \times 10^{-7}]}$$

→ log 10⁻⁷ = pH=7

O período entre t0-t7 dias, pressupõe tempo de estabilização do valor de pH, provavelmente porque as nanoemulsões são termodinamicamente instáveis (DARIO, 2016). No intervalo de 7 a 67 dias o valor de pH ficou estável e próximo do valor 5,0 em ambas condições de temperatura (ambiente e geladeira). Este valor está dentro do pH fisiológico, que na pele varia de acordo com o sítio anatômico, compreendido entre 4,5 a 5,5 (PIRES & PSCHEIDT, 2014).

Os valores de pH e suas respectivas concentrações molares de íons hidrogênio e o percentual de variação dos valores de pH, para a condição de 25,0± 2,0 °C foram: 5,7 (19,95.10⁻⁵ mol/L); 5,1 (79.10⁻⁵ mol/L); 5,0 (1.10⁻⁵ mol/L); 5,0 (1.10⁻⁵ mol/L); 4,8 (1,5.10⁻⁵ mol/L) e 4,4 (3,9.10⁻⁵ mol/L) com percentual de variação em relação ao t7 de 2%, 2%, 6% e 13,7% durante 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente. Foram considerados adequados em relação ao desvio padrão (0,1) e adequado até 30 dias, conforme percentual de variação adotada na literatura de ± 5% (RIEGER, 1996).

Os valores de pH e suas respectivas concentrações molares de íons hidrogênio e o percentual de variação dos valores de pH, para a condição de $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ foram respectivamente: 5,7 ($19,95 \cdot 10^{-5}$ mol/L); 5,0 ($1 \cdot 10^{-5}$ mol/L); 5,0 ($1 \cdot 10^{-5}$ mol/L); 5,1 ($7,9 \cdot 10^{-6}$ mol/L); 4,9 ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L) e 4,9 ($1,2 \cdot 10^{-5}$ mol/L) com percentual de variação em relação ao t7 de 0; -2,0; 2,0% e 2,0% durante 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente. Foram considerados adequados em relação ao desvio padrão (0,1) e adequado até 90 dias, conforme percentual de variação preconizada por (RIEGER, 1996).

Foi verificado que as variações de pH representam consideráveis alterações nas concentrações molares de $[\text{H}^+]$, porém, convém avaliarmos a variação pelo percentual de variação do valor de pH embora os valores de pH sejam exponenciais.

A condição de $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ apresentou maior percentual de variação em relação a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Em temperaturas mais elevadas de armazenamento, alterações significativas são esperadas para o parâmetro físico-químico analisado (valor de pH), pois a elevação da temperatura possui influência direta na estabilidade física, físico-química e química de diversas formas cosméticas e dos princípios ativos (BABY, 2007; PIANOVSKI, 2008). O exposto corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

5.3.1.3. Avaliação Estatística

A avaliação estatística foi realizada no programa Minitab[®] 17 utilizando a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Turkey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas ao nível de $p < 0,05$. Apresentada na **Tabela 4**.

Tabela 4 – Teste de Tukey para a comparação dos valores de pH da nanoemulsão com cafeína **F3** nas condições: $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) e $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira) durante o TEN.

Fator pH	Temperatura	
Tempo (dias)	$25,0 \pm 2,0$ °C	$5,0 \pm 2,0$ °C
t0	A	A
t7	B	B C D
t15	B C	B C D
t30	B C	B
t60	E	D E
t90	F	C D E

Legenda: t: tempo (dias). Letras iguais são estatisticamente iguais e diferentes o inverso.

A comparação dos valores de pH da nanoemulsão com cafeína **F3** pelo do Teste de Tukey permitiu notar que a condição de $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) com 60 e 90 dias não compartilhou letras iguais aos demais tempos da TEN, o que significou que houve diferença estatística de pH nesta condição ambiental neste período. Este comportamento era esperado devido à tendência de diminuição do valor de pH em temperaturas mais elevadas.

Em relação a condição de $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira) o t60 e t90 não compartilharam letra igual com o t30, porém compartilharam com o t7 e t15, o que significa que a estabilidade na condição de geladeira foi mais uniforme em relação à da condição ambiente, o que corroborou com a tendência gráfica da **Figura 12**.

O t0 de ambas condições de temperatura compartilharam a mesma letra o que equivale ao tempo de estabilização da nanoemulsão entre o período de t0 a t7 dias, o que também pode ser notado na **Figura 12**.

5.3.1.4 Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

O grau de estabilidade do sistema, o tamanho médio das gotículas da emulsão, o índice de polidispersão e o potencial zeta são parâmetros que variam em função da composição e da razão entre os tensoativos utilizados, sendo fundamental a otimização do processo de desenvolvimento de nanoemulsões com acompanhamento desses parâmetros (SHAFIQ-UN-NABI *et al.*, 2007). Ver **Figura 14** e **Tabela 5**.

a) Tamanho de gotícula e índice de polidispersão

É importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das nanopartículas dispersas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (SCHAFFAZICK & GUTERRES, 2003). Assim é importante o monitoramento de tamanho de partículas no decorrer do tempo e durante o Teste de Estabilidade Normal (TEN), conforme **Figura 14**.

Índice de polidispersão superior a 1 no software Zetasizer[®], indica que a distribuição é muito polidispersa, não sendo adequada para mensurar por espalhamento de luz dinâmico. Assim, amostras com índice de polidispersão próximos a zero representam distribuição de partículas com caráter monomodal (ANTON *et al.*, 2007; JAFARI & BRANDARI, 2007; MALVERN INSTRUMENTS, 2015).

O índice de polidispersão e tamanho de gotícula foram obtidos conforme o item **4.2.4.c**.

No caso da nanoemulsão **F3**, os índices de polidispersão apresentaram desvio reduzido de 0,1 e valores de 0,1 e 0,2 dependendo da condição da temperatura e tempo, o que é conveniente para a nanoemulsão indicando a presença de gotículas com alta polidispersibilidade e caráter monodisperso, conforme **Tabela 5**.

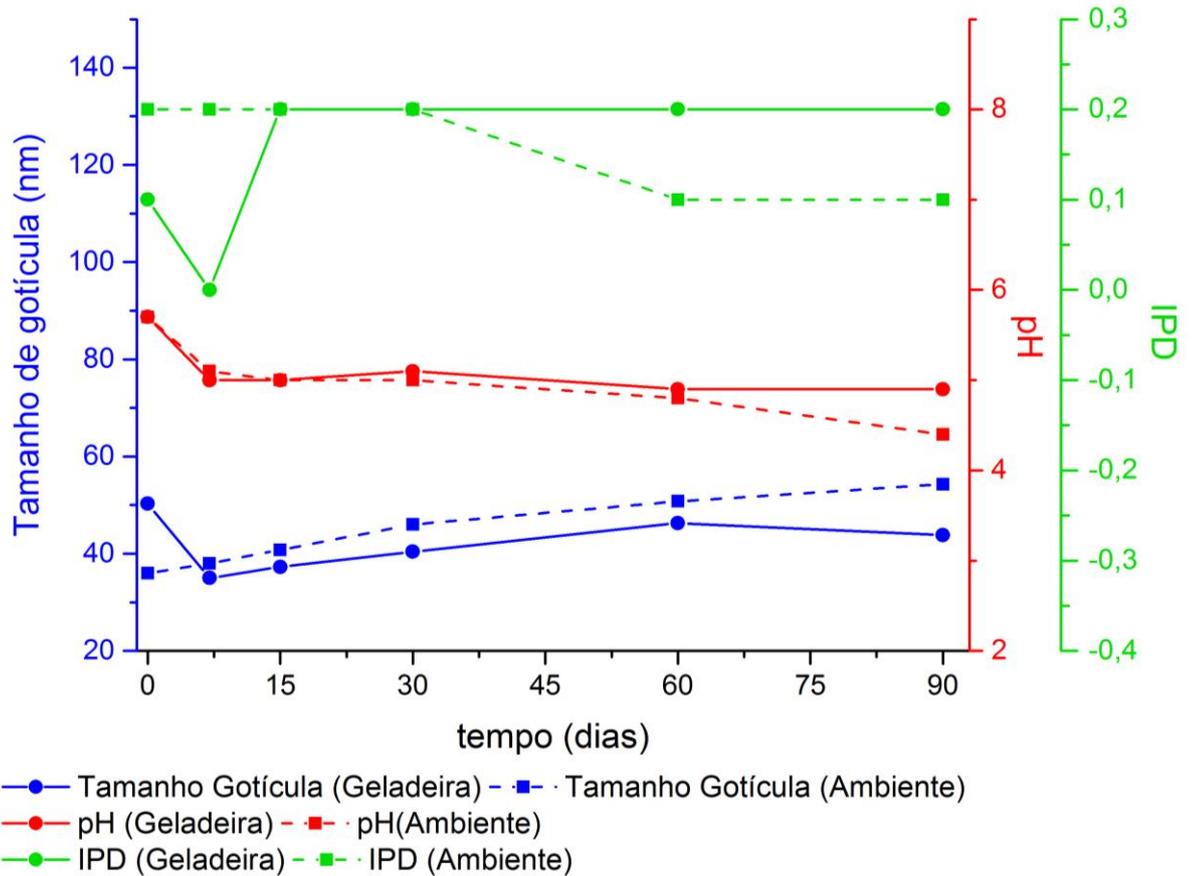
Indicado na **Figura 14** e explicados em detalhes posteriormente.

Tabela 5. Avaliação do tamanho da gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e percentual de variação da concentração de cafeína da nanoemulsão **F3** submetida ao (TEN) ao longo dos 90 dias.

Teste	25,0 ± 2,0 °C						5,0 ± 2,0 °C					45,0 ± 2,0 °C				
	0	7	15	30	60	90	7	15	30	60	90	7	15	30	60	90
F3																
Tamanho de partícula (nm)	36,0	38,0	40,8	46,0	50,8	54,3	35,0	37,3	40,4	43,6	43,8	-	-	-	-	-
± (δ) nm	0,8	0,6	0,8	0,7	0,4	0,1	0,5	0,6	0,7	0,9	0,1	-	-	-	-	-
Índice de Polidispersão	0,2	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-	-	-	-
± (δ)	0	0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-	-
Potencial Zeta negativo ± (-mv)	3,9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
± (δ) (-mv)	0,2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Ccaf (%)	0	5	4,6	5,6	5,4	9,3	4,8	4,7	3,6	11,1	15	-	-	-	-	-
± (δ) (%)	0,4	0,6	0,4	0,1	0,5	0,6	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3					

Legenda: (-): não avaliado devido separação de fases; (*): não houve a necessidade de avaliar porque o tensoativo é não iônico; (δ): desvio padrão; **t0**: tempo de repouso (48 horas após preparo); **Ccaf (%)**: percentual de variação da concentração de cafeína na nanoemulsão. A nanoemulsão **t0** foi considerada como referência para comparação com as demais formulações. Os resultados na tabela correspondem à média das três leituras realizadas pelo equipamento Zetasizer Nano ZS90[®]. Concentração teórica=100 µg/mL.

Figura 13: Correlação entre: tamanho de gotícula, Índice de Polidispersão (IPD) e valor de pH no Teste de Estabilidade Normal TEN a $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) e $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira) da nanoemulsão **F3**.



O valor de IPD permaneceu constante em 0,2 na temperatura de geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C) enquanto que o valor de IPD na condição ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C) de 0,2 caiu para 0,1 e se manteve constante, neste parâmetro os valores de IPD foram adequados para ambas condições ambientais pois se afastam de 1.

O valor de pH decresceu durante o TEN em ambas condições ambientais, porém a condição de geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C) decresceu menos, valor de 4,9 com 90 dias, permanecendo dentro da faixa de valor de pH fisiológico durante os 90 dias da TEN. Em contrapartida a condição ambiente ($25,0 \pm 2,0$ °C), decresceu até o valor de 4,4 com 90 dias, porém manteve-se praticamente na faixa de valor de pH fisiológica.

O tamanho de gotícula apresentou acréscimo no valor ao longo da TEN, sendo o da condição de geladeira ($5,0 \pm 2,0$ °C), o que apresentou menor variação do valor de tamanho de gotícula.

Os valores de tamanho de gotícula para a condição de $25,0 \pm 2,0$ °C elevaram-se no decorrer do tempo com desvio de maior valor de 0,8 nm e percentual de variação de 5,6; 13,3;

27,8; 41,1 e 50,8% durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente, comparado com o tamanho de gotícula no t₀ dias de TEN. No entanto na condição de $5,0 \pm 2,0$ °C apresentou decaimento e elevação ao longo do tempo, com desvio de maior valor de 0,9 nm e percentual de variação de -2,8; 3,6; 12,2; 21,1 e 21,7% durante 7, 15, 30, 60 e 90 dias respectivamente, comparado com o tamanho de gotícula com t₀ durante o TEN.

A condição de $5,0 \pm 2,0$ °C apresentou tamanho de gotícula (43,8 nm) e percentual de variação (21,7%) inferior em relação a condição de $25,0 \pm 2,0$ °C. Indicando ser esta a melhor condição de armazenamento. Em função da instabilidade na condição de $45,0 \pm 2,0$ °C, os dados vinculados a esta condição não foram computados.

Uma provável explicação para a instabilidade de emulsões é a maturação de Ostwald, conhecida como Ostwald *ripening*. Quando se menciona este fenômeno para emulsões se correlaciona com a teoria de LSW. Esta está relacionada com a taxa de instabilidade do componente da fase dispersa e pode ser descrita usando certos parâmetros que são conhecidos como coeficiente de solubilidade, difusão da fase dispersa e tensão interfacial entre as gotículas e a fase contínua. Ou seja, os monômeros dos tensoativos abaixo da concentração micelar crítica (CMC) podem migrar para outras micelas aumentando o tamanho das existentes. Entretanto, concentrações acima da CMC não impactam tanto na estabilidade já que a maior concentração de micelas possível foi formada, estabilizando o meio (RINALDO *et al.*, 2012).

A formação de uma emulsão está relacionada com o seu conteúdo e composição da fase oleosa, especialmente a proporção tensoativo/fase oleosa que determina o tamanho das gotículas da emulsão (MEI *et al.*, 2011).

b) Potencial zeta

Segundo Martini (2005) o potencial zeta é definido como a diferença de potencial entre os íons fortemente ligados à superfície da partícula e uma região neutra não carregada da solução, ocorrendo diferença relevante de viscoelasticidade quando comparada à solução adjacente às gotículas. Quando o potencial zeta é de 30mV (em módulo) ou maior, a força repulsiva da dupla camada é maior do que a força atrativa de van der waals evitando assim, possível floculação. Um valor elevado e negativo do potencial zeta é importante para a estabilidade físico-química da emulsão, pois as forças repulsivas entre as gotículas evitam a floculação. Alterações na atmosfera iônica, como a provocada pela adição de eletrólitos, tensoativos iônicos e alterações no valor do pH da solução, podem afetar diretamente a carga do glóbulo.

Neste experimento, o potencial zeta no t 0 foi de -3.9 mv, devido aos tensoativos utilizados na nanoemulsão serem de natureza não iônica, conforme **Tabela 5**. A provável explicação de acordo com a literatura científica deve-se à teoria da influência das ligações de hidrogênio, sendo que os autores propuseram que a carga superficial negativa foi derivada da adsorção específica de íons hidroxila, diretamente da formação de ligações de hidrogênio entre os íons hidroxila e moléculas de água na camada limite (MEI *et al.*, 2011). Uma vez que a nanoemulsão **F3** possui ingrediente com triacilgliceróis em sua composição, a interface negativa atrai íons H⁺ os quais protonam os ácidos graxos e amenizam a carga negativa resultando em um valor baixo de potencial zeta.

Por outro lado, os tensoativos não iônicos, como os utilizados na nanoemulsão **F3**, propiciam estabilidade estérica na fase dispersa, retardando a maturação de Ostwald e coalescência (KOURNIATIS *et al.*, 2010). Os grupos hidrofílicos oriundos dos tensoativo não iônicos atraem a água ao seu redor originando barreira protetora que previne a coagulação (OLIVEIRA & MEI, 2009).

5.3.1.5 Transmitância da formulação escolhida no decorrer da estabilidade normal

A transmitância relaciona a incidência da luz inicial e a luz que atravessou a cubeta de quartzo; a luz não absorvida é lida no detector. Como a transmitância é maior quando diminui a concentração ou opacidade da substância, valores próximos de 100% indicam que houve menor absorção de luz e espalhamento indicando a transparência do sistema. A faixa do visível é entre 350 -750nm (ALMEIDA *et al.*, 2005).

O experimento foi realizado de acordo com o item **4.2.3.1e**. O percentual de Transmitância no t0 e com t90 dias de TEN apresentou valores de 48,7% e 6,5% respectivamente, indicando redução da transparência no decorrer do tempo devido ao provável aumento no tamanho das gotículas. Na literatura Srilatha e colaboradores mensuraram o percentual de transmitância de todas as formulações a 560 nm e com água destilada como branco. Encontraram os valores em duas formulações distintas de 93,4% e 93,2%, os quais revelaram formulações quase transparentes.

5.3.1.6 Espectroscopia Raman

Os espectros de Raman da cafeína anidra estão presentes nas **Figuras 14-20**, e os valores foram registrados no intervalo de 400-1800 cm⁻¹. Os números de onda das bandas estão na **Tabela 6** e as atribuições vibracionais são fornecidas para a cafeína a partir dos

dados publicados por Pavel *et al.*, (2003) e Matas *et al.*, (1998). O experimento foi realizado de acordo com o item **4.2.3.1f**.

Edwards & Munshi (2004) apud Matas *et al.*, (1998) mencionaram que a água é facilmente perdida a partir da malha cristalina da cafeína e alterações significativas são observadas nos estiramentos $\nu(\text{C}=\text{O})$ e na região da estrutura vibracional pela diminuição da atração intermolecular $\text{CH}\cdots\text{OH}_2$.

Pavel *et al.*, (2003) rotulou algumas características estruturais específicas da molécula da cafeína anidra: O átomo N^7 metilado no estiramento $\nu(\text{CN})$ ocorre em 1408 cm^{-1} , numerados na estrutura molecular da cafeína como $\text{N}^7\text{-C}^{14}$ (**Figura 3**); O estiramento $\nu(\text{CN})$ em $\text{C}^2\text{-N}^3$ ocorre a 1284 cm^{-1} ; O estiramento $\nu(\text{CN})$ em $\text{C}^8\text{-N}^7$ ocorre a 1554 cm^{-1} ; A deformação (CNC) em $\text{C}^{14}\text{-N}^7\text{-C}^8$ ocorre a 556 cm^{-1} ; A deformação $\delta(\text{HC}=\text{N})$ em $\text{C}^8\text{-N}^9$ ocorre a 1073 cm^{-1} . Além disto, as atribuições moleculares menos específicas foram feitas para os modos $\nu(\text{CN}, \text{C}=\text{C})$ e $\nu(\text{CN})$ em 1600 e 1360 cm^{-1} , respectivamente.

Tabela 6. Espectro Raman e atribuições para a cafeína hidratada e anidra.

cafeína hidratada	cafeína anidra	Atribuição
pH 7		
1643 m	1657 m	$\nu(\text{C}=\text{O})$ fora de fase + $\nu(\text{C}=\text{C})$
1337 s	1328 s	ν (anel imidazole)
1296 m	1284 m	$\nu(\text{C}-\text{N})$ + $\rho(\text{CH}_3)$
651,5 m	642,9 m	$\delta(\text{OCN})$ + δ (anel imidazole pirimidina)
556,2 s	555,4 s	δ (anel pirimidina) + $\delta(\text{CNC})$ + $\rho(\text{CH}_3)$

Legenda: ν =estiramento, δ =deformação angular; m =medio, s =forte, ρ =modo translacional. Atribuições baseadas em Edwards & Munchi (2004) apud Pavel *et al.*, (2003)

A diferença na posição das bandas foi usada para evidenciar em qual fase a cafeína se encontra majoritariamente. Compararam-se os espectros da cafeína nos pHs estudados para verificar o possível deslocamento de bandas, o que sugeriria a sua protonação, fato que não ocorreu nas **Figuras 14 e 15**, o que indicou que a cafeína não teve influência sobre o pH medido.

Figura 14: Comparação dos espectros Raman de cafeína anidra e em solução com diversos valores de pH, corrigido com ácido cítrico e trietanolamina, no intervalo de 400-1000 cm^{-1} .

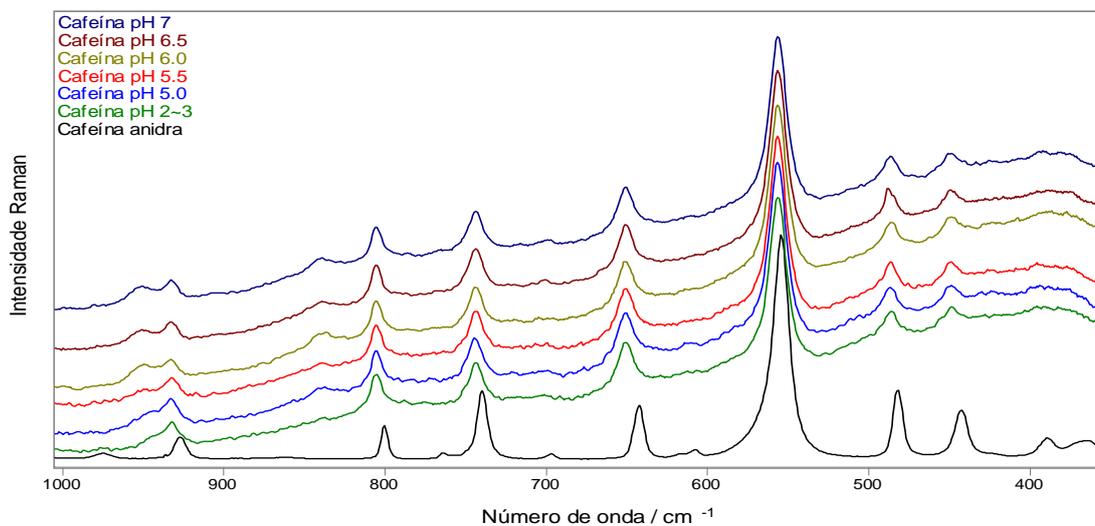


Figura 15: Comparação dos espectros Raman de cafeína anidra e em solução com diversos valores de pH, corrigido com ácido cítrico e trietanolamina, no intervalo de 1000-1800 cm^{-1} .

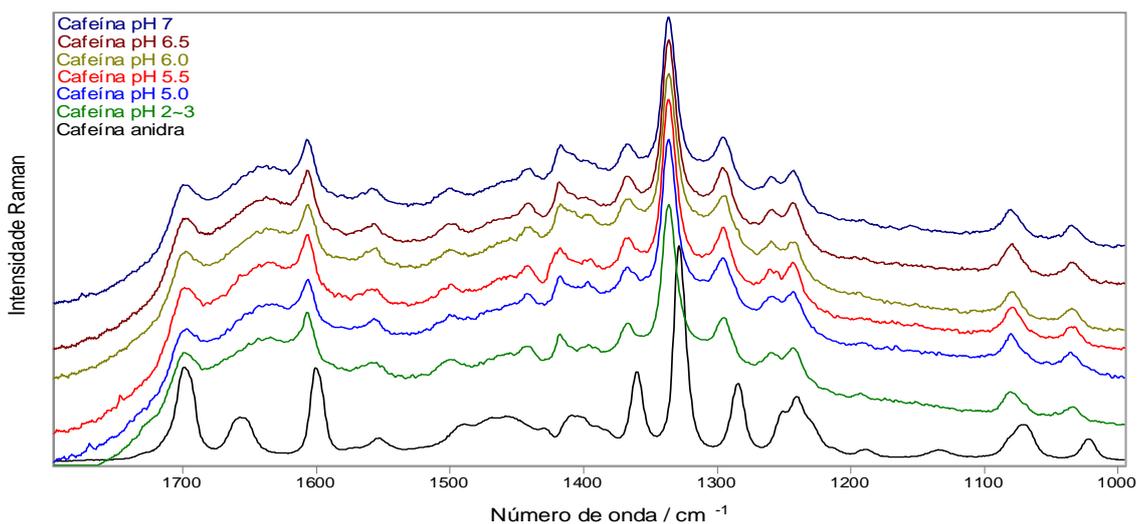
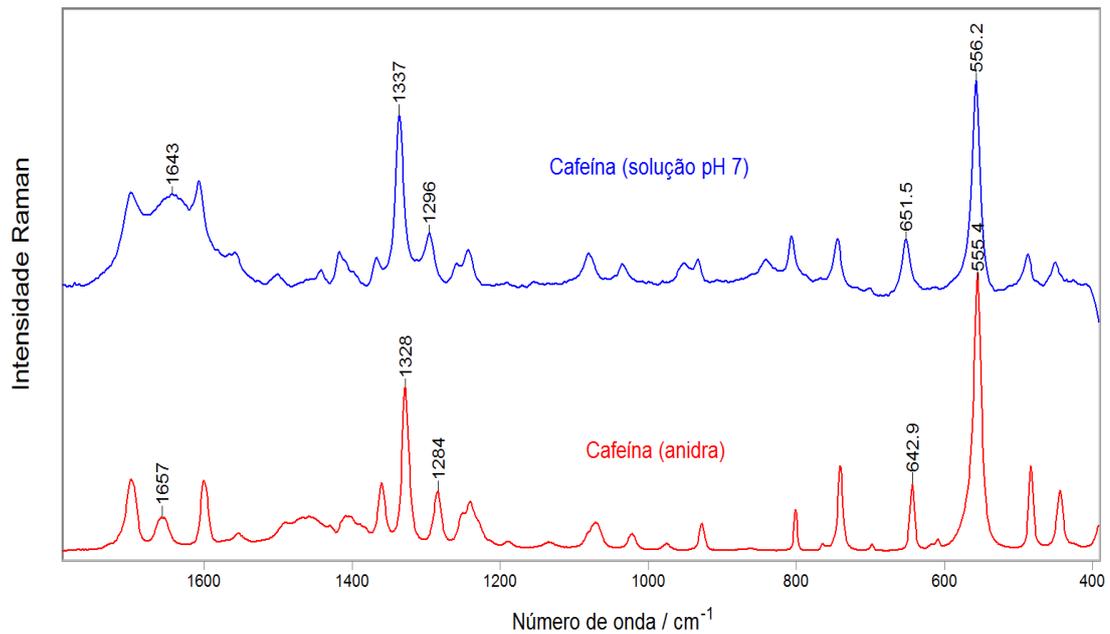
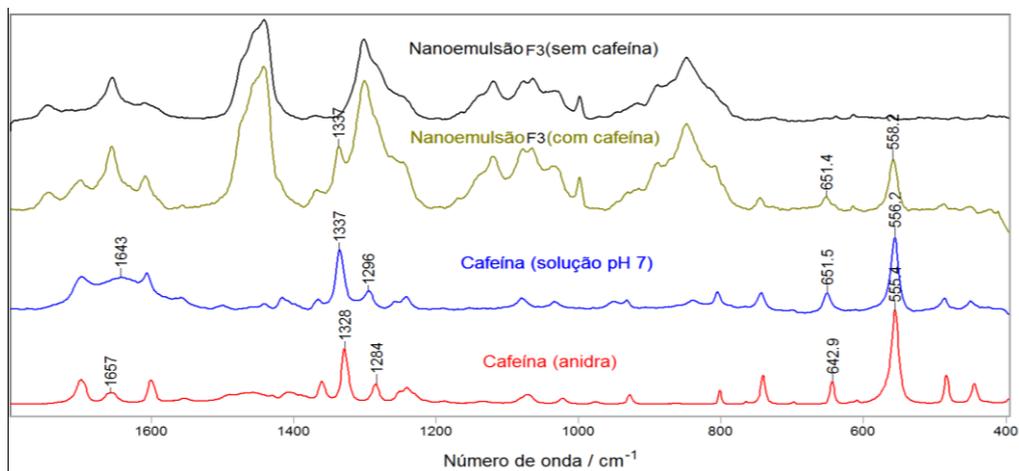


Figura 16: Comparação dos espectros Raman de cafeína em solução (pH 7) e anidra sólida.



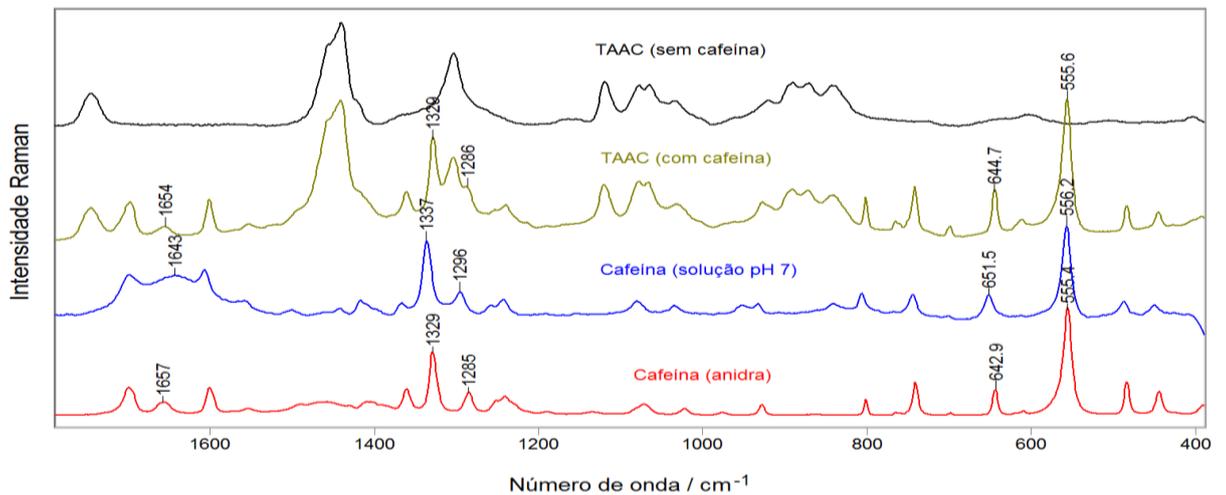
A diferença da cafeína anidra comparada à solução é expressa por bandas mais intensas deslocadas para o menor número de onda, **Figura 16**. A atribuição das bandas se encontra na **Tabela 6**. Deslocamentos superiores a 2 cm⁻¹, são indicativos de interações (GIL, 2015). Ou seja, de acordo com a **Tabela 6** houve interação da cafeína com a fase aquosa, provavelmente, por sua natureza hidrofílica, exceto pela atribuição correspondente ao δ (anel pirimidina) + δ (CNC) + ρ (CH₃) que possui caráter lipofílico.

Figura 17: Comparação dos espectros Raman de cafeína em solução e anidra com a nanoemulsão F3 na presença e na ausência da mesma.



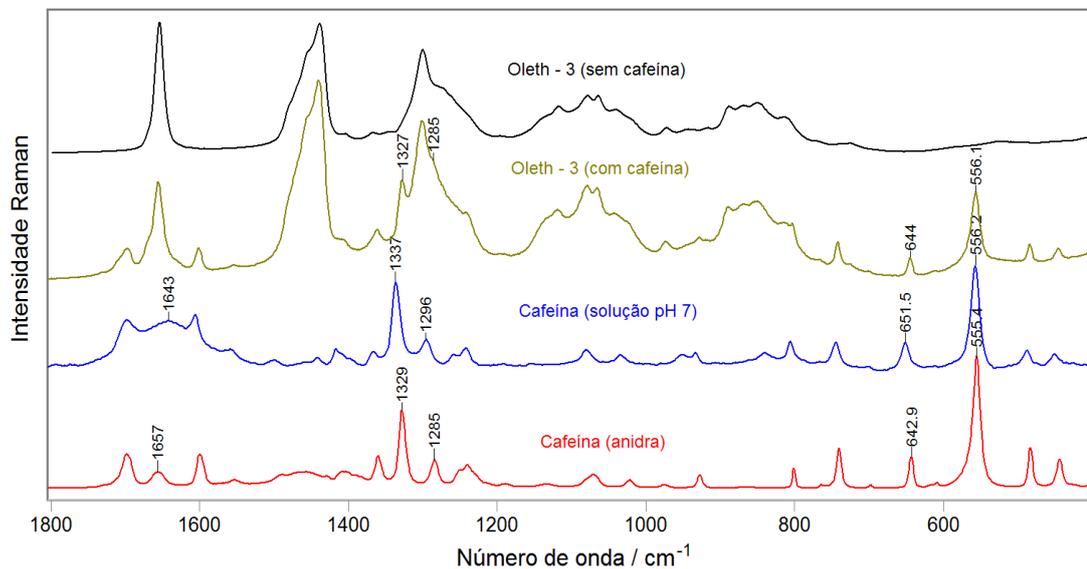
As bandas de cafeína encontradas na nanoemulsão **F3** são compatíveis com as encontradas na solução de cafeína (bandas 1337; 652,5 e 558,2 cm^{-1}), provavelmente devido à sua hidrofília e por estar na forma hidratada na nanoemulsão.

Figura 18: Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com a fase oleosa composta pelos triglicérides do ácido cáprico caprílico (TAAC) na presença e na ausência da mesma.



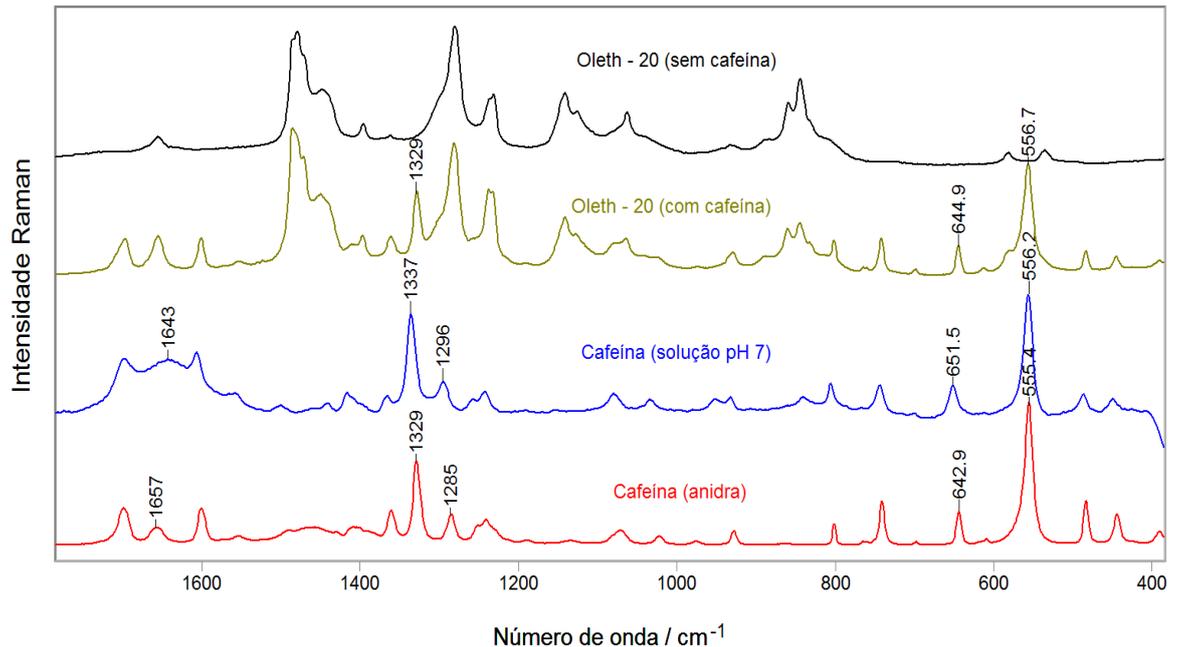
Não houve deslocamento relevante ($>2 \text{ cm}^{-1}$) da posição das bandas da cafeína anidra em relação à mistura de TAAC mais cafeína anidra (1654; 1329; 1286; 644,7 e 555,6 cm^{-1}), indicando que não houve interação entre estes ingredientes.

Figura 19: Comparação dos espectros Raman de cafeína em solução e anidra com o tensoativo Oleth-3 na presença e na ausência da mesma.



Não houve deslocamento significativo da posição das bandas do Oleth-3 com cafeína em relação à cafeína anidra (1327; 1285; 644 e 556,1 cm^{-1}), indicando que não houve interação da cafeína anidra com o tensoativo Oleth-3.

Figura 20: Comparação das bandas do espectro Raman da cafeína em solução e anidra com o tensoativo Oleth-20 na presença e na ausência da mesma.



Não houve deslocamento relevante da posição das bandas do Oleth-20 com cafeína em relação a cafeína anidra (1329; 644,9 e 556,7 cm^{-1}), indicando que não houve interação da cafeína anidra com o tensoativo Oleth-20.

Estes valores sugerem que a cafeína está na fase contínua da nanoemulsão.

5.3.1.7 Constante de instabilidade de Ostwald

Emulsões e nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, assim tendem a se desestabilizar durante o armazenamento por variados mecanismos como a separação gravitacional, floculação, coalescência e maturação de Ostwald. Sistemas emulsionados devem inibir estes mecanismos e prover estabilidade cinética suficiente para manter a validade do produto (PIORKOWSKI & MCCLEMENTS, 2014). O ensaio foi realizado de acordo com o item **4.2.3.1g**.

Os valores das constantes de Ostwald e de coeficiente de correlação obtidos neste trabalho foram registrados na **Tabela 7** e podem ser visualizados através das **Figuras 21 e 22**.

Tabela 7: Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação **F3**.

Condição	ω_2	ω_3	$R^2 \omega_2$	$R^2 \omega_3$
$(25,0 \pm 2,0^\circ\text{C})$	3,81556E-05	0,01043	0,969	0,984
$(5,0 \pm 2,0^\circ\text{C})$	6,17641E-06	0,0001	0,9024	0,9078

Figura 21: Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação **F3** na condição de $(25,0 \pm 2,0^\circ\text{C})$.

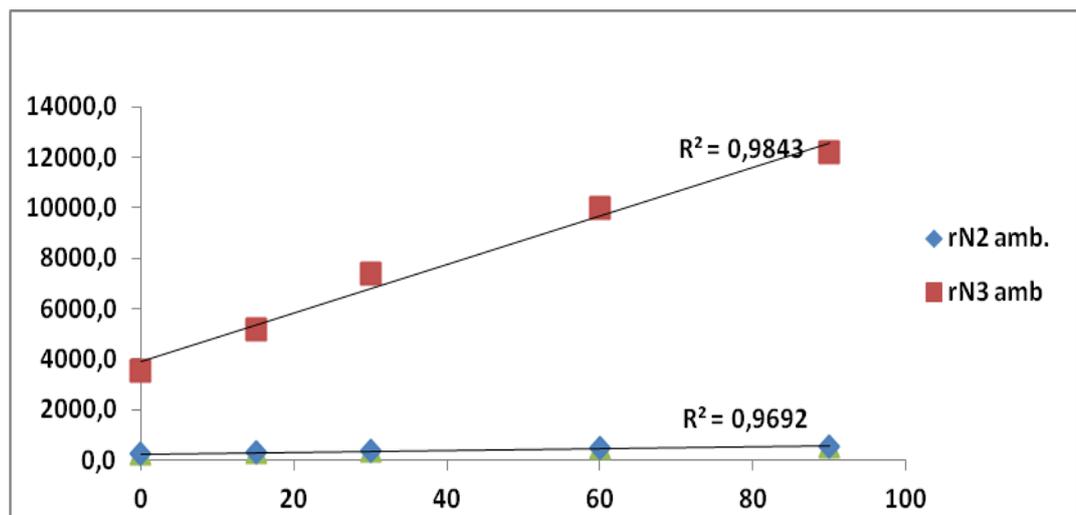
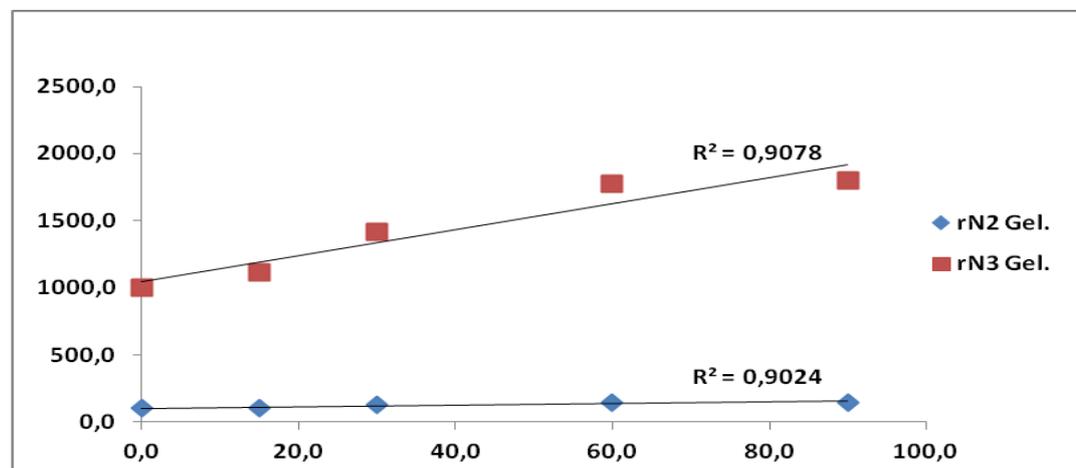


Figura 22: Valores das constantes de Ostwald e seus respectivos coeficientes de correlação durante o TEN da formulação **F3** na condição de $(5,0 \pm 2,0^\circ\text{C})$.



Na condição $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ houve uma correlação linear um pouco melhor para o parâmetro ω_3 ($r^2=0,984$) em relação ao parâmetro ω_2 ($r^2=0,969$), sugerindo que a difusão de

moléculas de óleo foi o primeiro mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro da gota nesta condição de temperatura. Os valores da constante de Ostwald na condição ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) ($\omega_2 = 3,81556 \cdot 10^{-5} \text{ nm}^2\text{s}^{-1}$ e $\omega_3 = 0,01043 \text{ nm}^3\text{s}^{-1}$) foram menores que o valor mencionado no trabalho de Wooster e colaboradores (2008) que utilizou, também, triglicerídeos do ácido cáprico caprílico, o mesmo da formulação **F3**, sugerindo que esta foi mais estável que a mencionada na literatura.

Na condição de $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ os valores de ω_2 ($r^2=0,9024$) e de ω_3 ($r^2=0,9078$), sugeriram que o mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro da gota nesta condição de temperatura foi uma relação sutil entre a difusão de gotículas de óleo isoladas e a de óleo transportados por micelas. Os valores da constante de Ostwald na condição geladeira $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ($\omega_2 = 6,17641 \cdot 10^{-6} \text{ nm}^2\text{s}^{-1}$ e $\omega_3 = 0,0001 \text{ nm}^3\text{s}^{-1}$) foram menores que os valores da condição de $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, o que indicou que a estabilidade na condição de geladeira foi melhor em comparação à ambiente segundo a relação de instabilidade de Ostwald, corroborando com outros resultados. Este fenômeno era esperado, uma vez que condições de temperaturas mais elevadas como a de estufa, permitem que o óleo fique mais solúvel na fase aquosa promovendo a instabilidade do sistema (DARIO, 2016).

5.4 Validação do método analítico e bioanalítico

5.4.1 Identificação e Quantificação da cafeína na nanoemulsão

A identificação e quantificação da cafeína feita de acordo com o método **4.2.8**. Foi obtido no início da pesquisa do método a ser utilizado, ótimo tempo de retenção para a cafeína (6,7min), porém foi necessário alterar o fluxo e a temperatura do método para o tempo de retenção não coincidir com os interferentes das amostras biológicas, onde o fluxo de 1 ml/min com forno (30°C) foi para 0.4 ml/min e sem forno (25°C). A validação bioanalítica foi preliminar ao ensaio de permeação cutânea. Seguem os cromatogramas da cafeína padrão de acordo com o método definido, conforme **Figuras 23 e 24**.

Figura 23: Cromatograma da cafeína padrão de acordo com o metodologia definida, leitura a 273 nm, fluxo de 0.4 ml/min, sem forno (25 °C), pH 3,0 e fase móvel de acetonitrila: sol. acidificada (15:85)

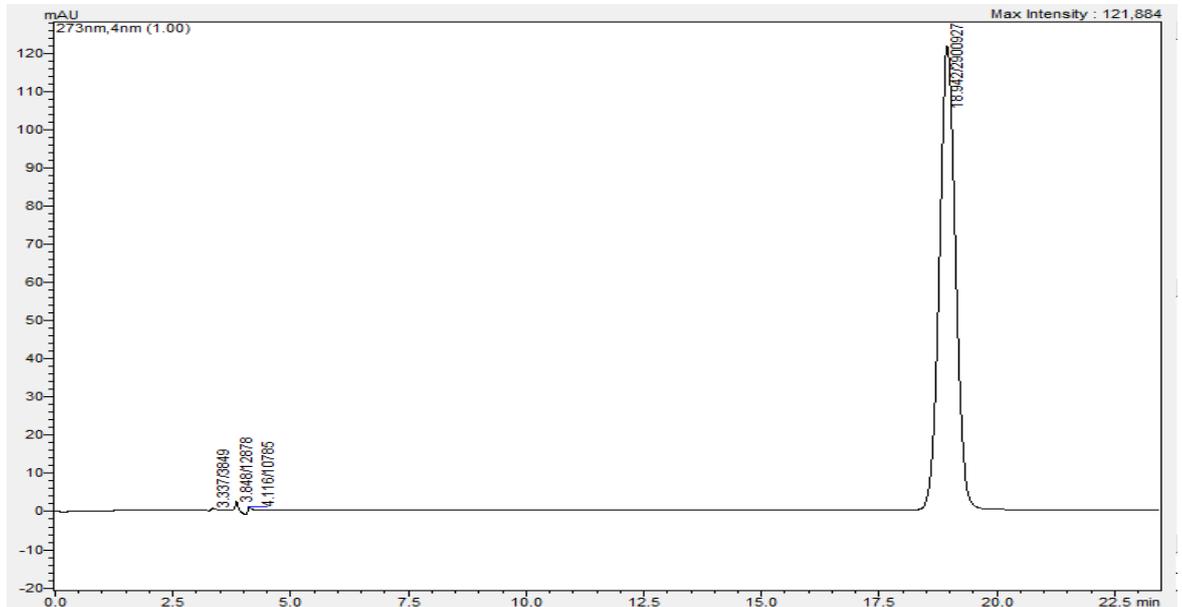
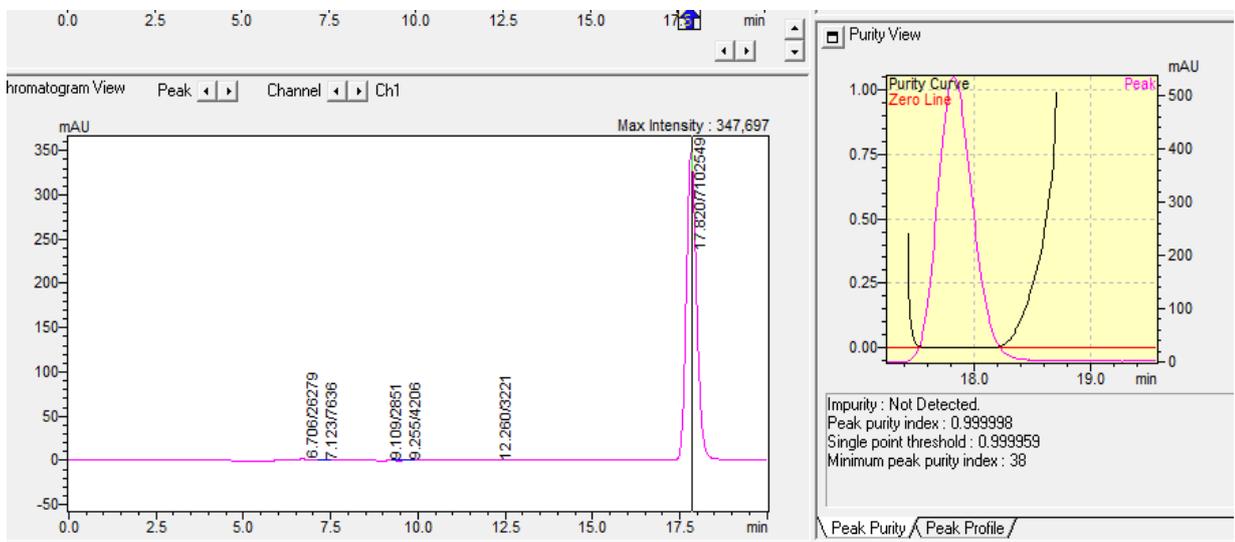


Figura 24: Cromatograma da cafeína padrão de acordo com o metodologia definida, leitura a 273 nm, não foram registrados impurezas com índice de pureza do pico de 0,99 ou 99%.



a) **Linearidade**

A linearidade foi obtida de acordo com o item 4.2.4.2, conforme a **Figura 25** e **Tabelas 8 e 9**.

Tabela 8: Curva analítica com cafeína padrão (PD) de referência secundário (Teor = 100%) detecção a 273nm

Ctcaf PD (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)			
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média±dp}
4,0	4,1	4,1	4,1	4,1±0,00
10,0	9,9	9,94	9,94	9,9±0,02
20,0	19,9	19,93	19,96	19,9±0,03
40,0	40,3	40,33	40,39	40,3±0,05
80,0	81,2	81,23	81,18	81,2±0,03
100,0	99,7	99,68	99,7	99,7±0,01

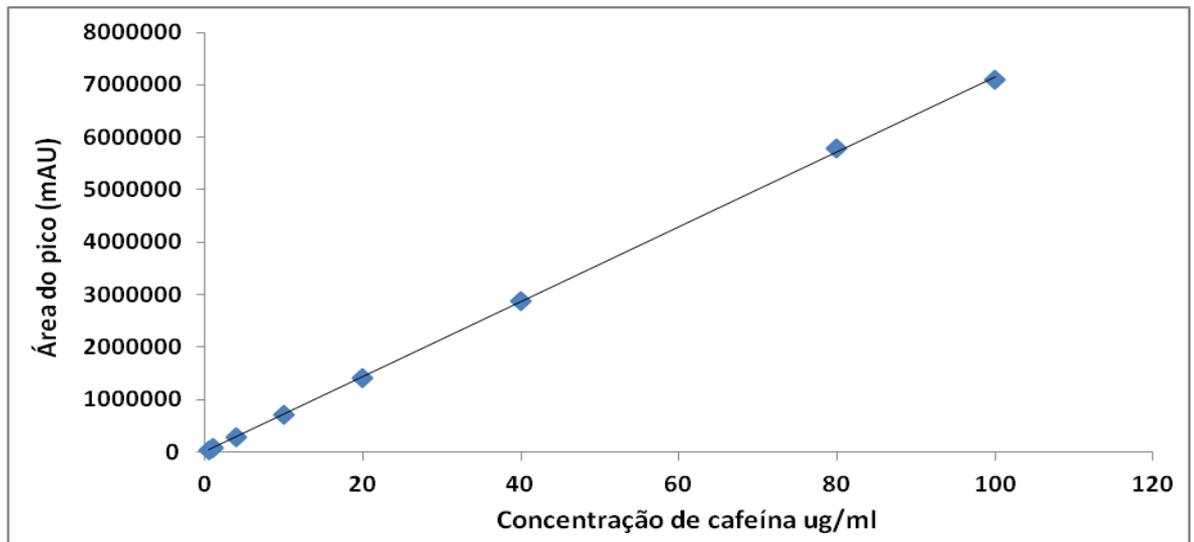
Legenda: Ctcaf PD: concentração teórica de cafeína padrão; C¹ a C³: concentração experimental; C_{média±dp} da concentração experimental, (n=3).

Tabela 9: Análise de regressão da linearidade da curva analítica de cafeína padrão de referência secundário (Teor = 100%) detecção a 273 nm

Análise da regressão linear	
Equação da reta:	$y = 71353,33x - 10607,2$
y = Área do pico	
x = conc. cafeína (µg/ml)	
a = 71353,33	
b = - 10607,2	
Coefficiente de correlação angular (R ²)	0,9999

O método com detecção a 273 nm foi linear e com coeficiente de correlação adequado, próximo a 1,0.

Figura 25: Curva analítica de cafeína padrão de referência secundário (Teor = 100%), detecção a 273 nm



b) Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram obtidas de acordo com o item 4.2.4.3.

A Tabela 10 contém os cálculos da precisão intra e interdias, desvio padrão relativo para (DPR%) e exatidão para as concentrações de 4,0; 20,0 e 100,0 µg/ml da cafeína padrão secundário. Os valores de desvio padrão foram inferiores a 5% na análise de precisão intra e interdia. E a exatidão apresentou valores próximos a 100%, logo, estão de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2003a).

Tabela 10: Precisão e exatidão intradia e interdia, respectivamente, das soluções com cafeína padrão de referência secundário (Teor = 100%).

Ctcaf PD (µg/ml)	Concentração Experimental (µg/ml) 273nm					
	Intradia			Interdia		
	$C_{\text{média}} \pm dp$	DPR% _{médio}	E%	$C_{\text{média}} \pm dp$	DPR% _{médio}	E%
4,0	4,10±0,1	0,0	102,39	4,1±0,02	0,0	102,03
20,0	19,94±0,02	0,0	99,72	19,9±0,04	0,0	99,5
100,0	99,72±0,04	0,0	99,72	99,7±0,04	0,0	99,7

Legenda: Ctcaf PD: concentração teórica de cafeína do padrão; $C_{\text{média}} \pm dp$: concentrações experimentais; DPR%_{médio}: Desvio Padrão Relativo médio; E%: Exatidão.

O método analítico foi preciso nas repetibilidades intradia e interdia ($DPR\%_{\text{médio}}=0$). Houve concordância dos resultados obtidos com as amostragens de uma mesma amostra.

Na **Tabela 11** constam os valores de recuperação do padrão nas matrizes biológicas, (EPI.; DERM.; EPI.+DERM.+PBS), conforme item **4.2.4.6**. Foram obtidos valores entre 85 e 115% para as soluções com padrão cafeína e para a recuperação do padrão nas matrizes biológicas, confirmando a exatidão do método conforme Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 27 de 17 de maio de 2012 (BRASIL, 2012).

c) Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação do método foi estimado de acordo com o item **4.2.4.4**. O LQ estimado para a detecção 273 nm foi de 1,40 µg/ml para a cafeína padrão secundário, assim, foi considerado que concentrações superiores a este valor são quantificados com precisão e exatidão relacionando com sua sensibilidade (BRASIL, 2003a; USP 2013).

d) Limite de detecção (LD)

O limite de detecção do método foi estimado de acordo com o item **4.2.4.5**. O LD estimado para a detecção 273 nm foi de 0,46 µg/ml para a cafeína padrão secundário, assim, foi considerado que concentrações superiores a este valor são detectados com precisão e exatidão relacionando com a sensibilidade do método (BRASIL, 2003a; USP 2013).

e) Especificidade e pesquisa de interferentes

A pesquisa de interferentes e especificidade foi realizada de acordo com o **item 4.2.4.6**, onde, foram comparados o cromatograma da cafeína padrão secundário (T=100%) com o cromatograma com o tampão PBS, com o qual foi construída a curva de calibração e o que faz parte também do líquido receptor no ensaio de permeação cutânea. Uma pesquisa de interferentes com a nanoemulsão sem cafeína (NSCAF) também foi realizada. Em relação ao PBS e as matrizes biológicas, estas foram tratadas com concentração e volume conhecido do padrão cafeína, posteriormente foi calculado sua exatidão e a pureza do pico através do software LC solutions[®], para analisar a possível interferência de sobreposição dos picos. Conforme apresentado nas **Figuras 26-31**.

Tabela 11: Exatidão intradia e interdia respectivamente das soluções com cafeína padrão de referência secundário (Teor = 100%), detecção a 273 nm por CLAE.

Ctcaf PD ($\mu\text{g/mL}$)	Epiderme					Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$) Derme					Epiderme+Derme+PBS													
	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média}	E(%)	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média}	E(%)	C ₁	C ₂	C ₃	C _{média}	E(%)									
4,0	3,6	3,3	3,6	3,5	87,5	4,3	4,3	3,3	4,0	100,0	4,0	3,6	3,7	3,8	95,0									
20,0	18,4	21	21,1	20,2	101	18,8	19,9	18,7	19,0	95,0	18,5	20,7	20,6	19,9	99,5									
100,0	98,6	98,7	98,3	98,5	98,5	87,7	88,06	88,1	88,0	88,0	104,9	94,5	98,6	99,3	99,3									
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C _{média}	E(%)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C _{média}	E(%)	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C _{média}	E(%)
4,0	3,6	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7	92,5	4,3	4,1	3,8	3,3	4,1	4,3	4,0	100,0	4,0	3,6	3,7	3,6	3,7	3,7	3,7	92,5
20,0	18,5	20,7	20,6	20,7	20,6	20,6	20,6	103	18,8	20,2	20,3	20,2	20,2	20,2	20,0	100,0	18,5	18,6	20,2	21,0	20,7	20,7	19,9	99,5
100,0	98,3	97,4	98,6	98,1	98,1	97,6	97,5	97,5	107,3	87,7	88,1	88,1	88,1	88,1	91,2	91,2	104,9	104,0	103,6	102,8	102,6	102,6	103,4	103,4

Legenda: Ctcaf: concentração teórica de cafeína; C₁ a C₆: concentrações experimentais; C_{média} das concentrações experimentais, E(%): Exatidão, PD: padrão..

Figura 26: Cromatograma de cafeína padrão secundário 100 µg/ml solubilizada em PBS, detecção a 273 nm nas mesmas condições do método definido, com índice de pureza do pico cafeína igual a 0,999 (Software LC solutions®).

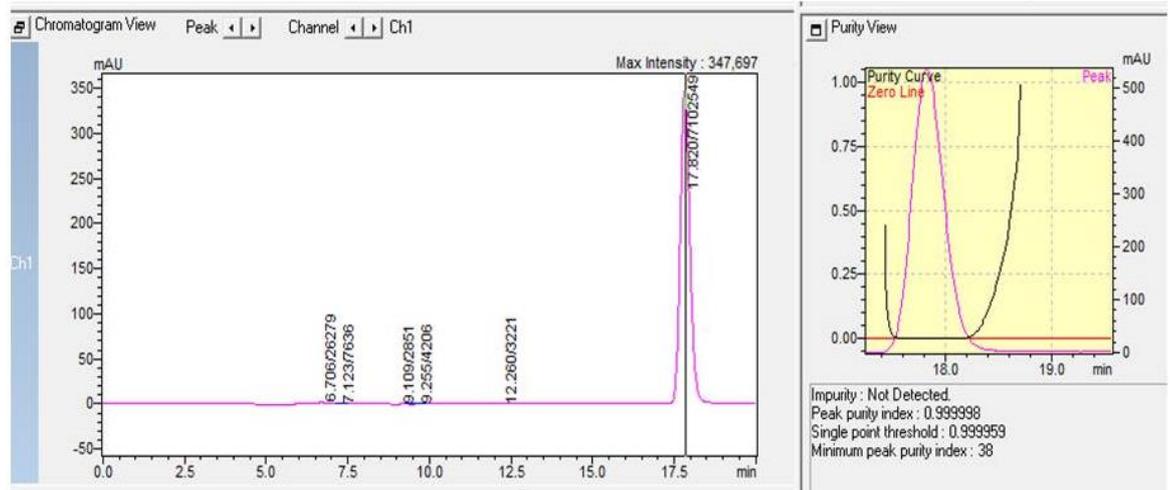


Figura 27: Cromatograma do tampão PBS utilizado na curva de calibração e no líquido receptor, detecção a 273 nm nas mesmas condições do método definido.

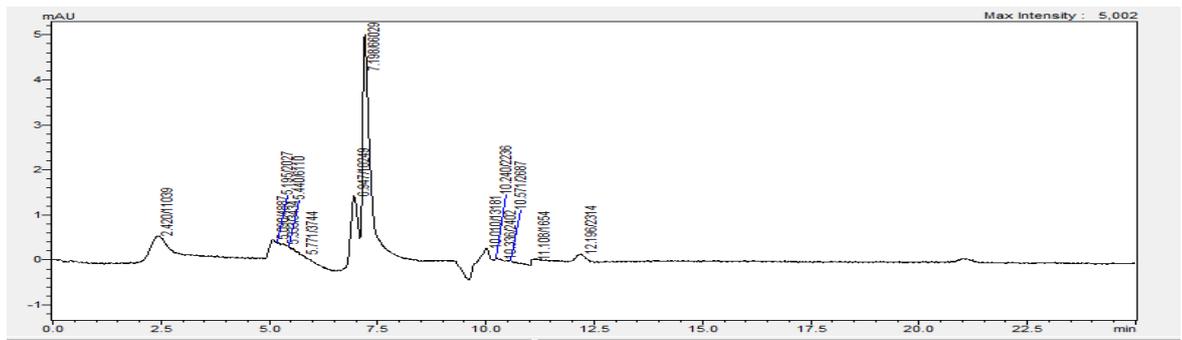
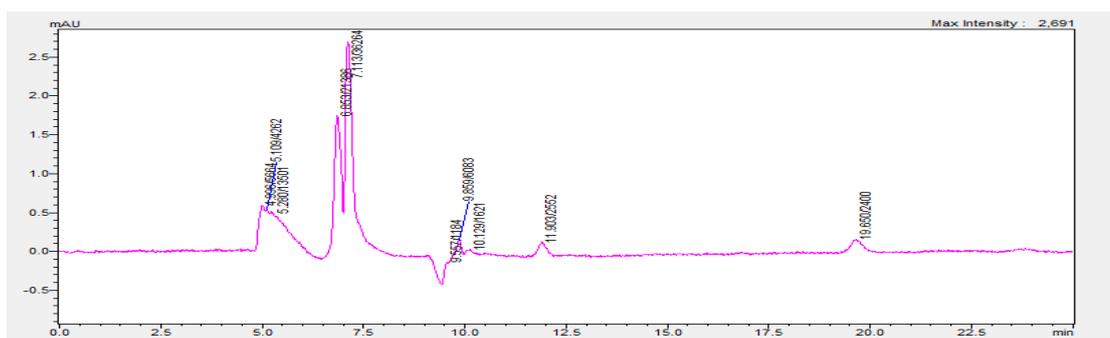


Figura 28: Cromatograma da nanoemulsão sem cafeína (NSCAF) utilizado na curva de calibração e no líquido receptor, detecção a 273 nm nas mesmas condições do método definido.



Foi visualizado um pico a 19,6 min e área de 2400 correspondente a 0,18 μg , concentração abaixo do limite de detecção e de quantificação, por esse motivo, pico foi desconsiderado.

Figura 29: Cromatograma da matriz biológica Epiderme tratada com cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção a 273 nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico cafeína igual a 1 (Software LC solutions[®]).

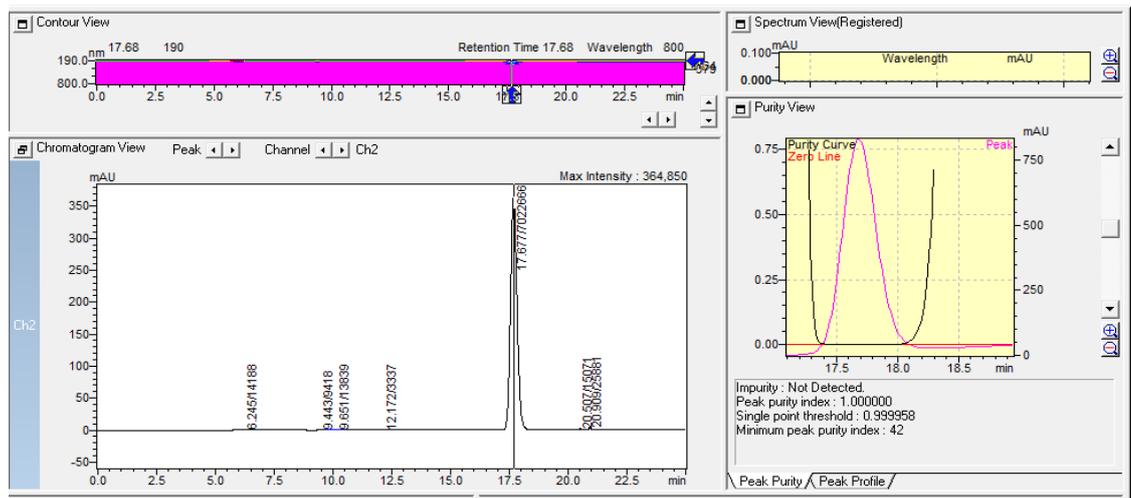


Figura 30: Cromatograma da matriz biológica Derme tratada com cafeína padrão secundário 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, detecção de 273 nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 (Software LC solutions[®]).

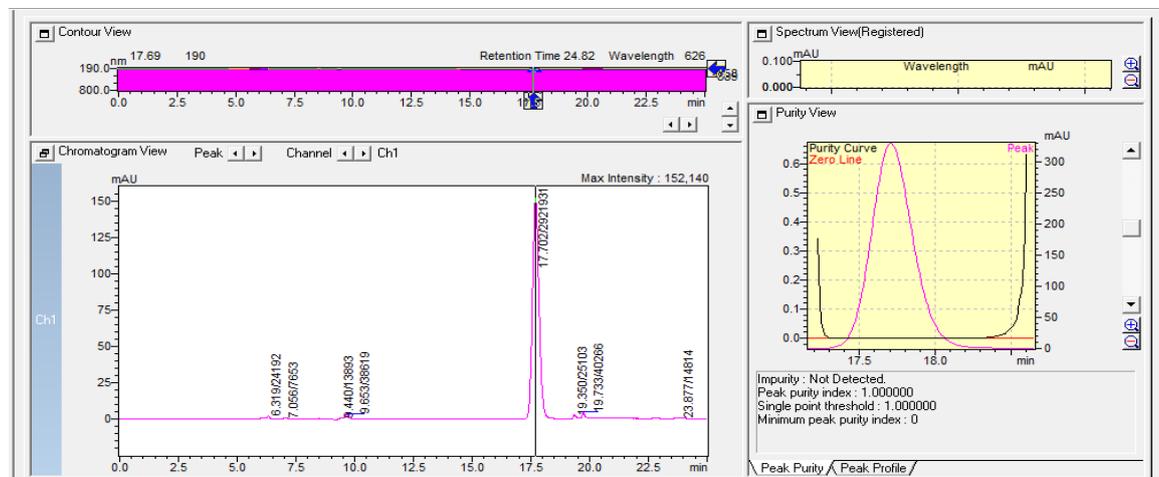
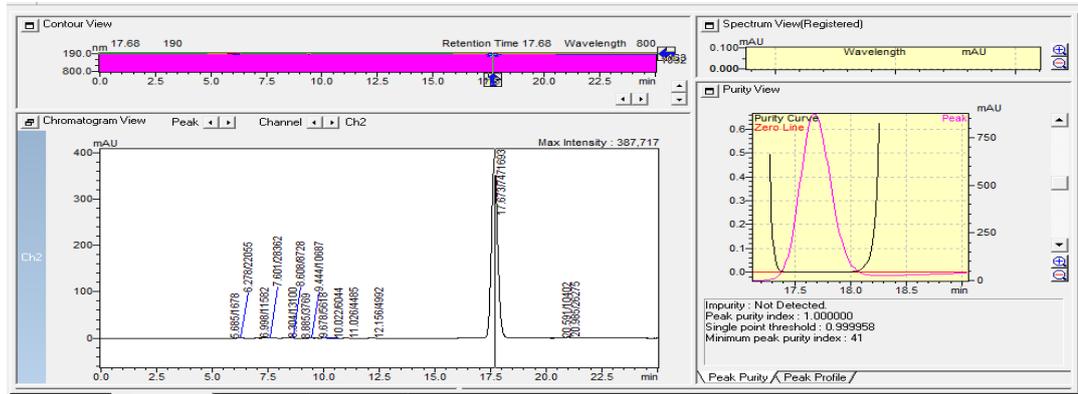


Figura 31: Cromatograma da matriz biológica Líquido Receptor tratada com cafeína padrão secundário 100 µg/ml, detecção de 273 nm nas mesmas condições do método definido, índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 (Software LC solutions®).

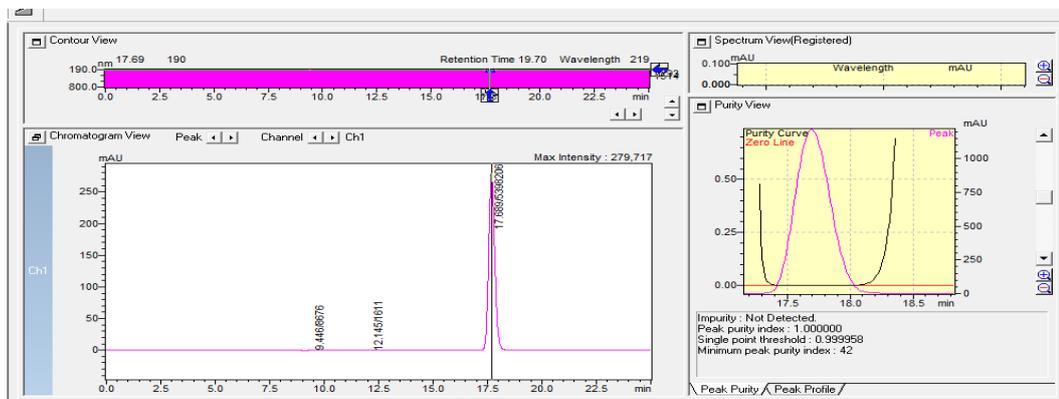


Como constatado no cálculo da exatidão e nos índices de pureza da cafeína nos cromatogramas acima, não houve interferentes eluindo com a cafeína.

5.5. Teor da cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) durante o TEN

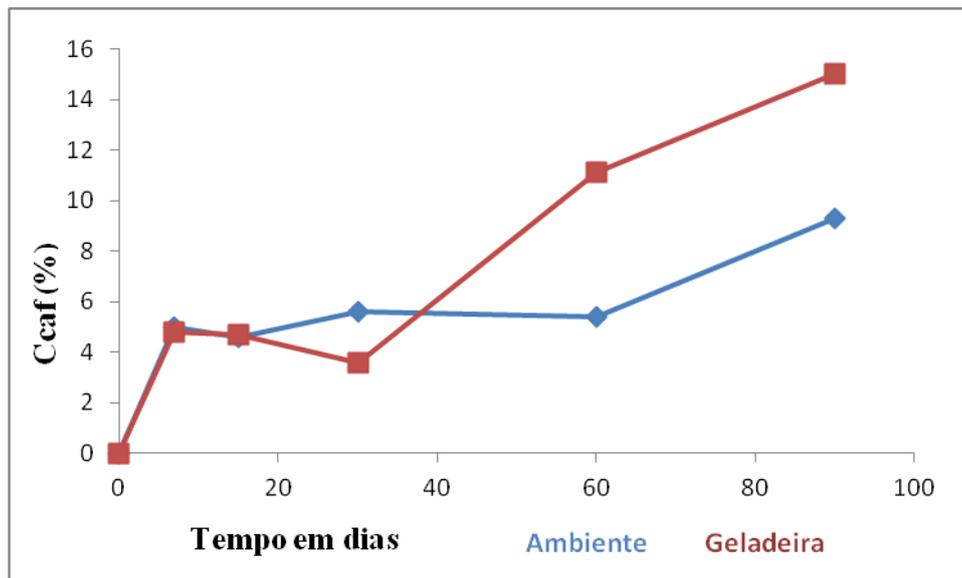
Alguns componentes ativos apresentam concentrações menores em relação ao início da estabilidade (0 dias), em virtude de diversos fatores. Logo, foi estudado o Teor da cafeína por CLAE conforme o TEN. **Figura 32** e **Tabelas 3**.

Figura 32: Cromatograma da cafeína padrão secundário 100 µg/ml, detecção de 273 nm nas mesmas condições do método definido, com o índice de pureza do pico da cafeína igual a 1 por meio do software LC solutions®.



Foi avaliada a estabilidade da cafeína ao longo da TEN (90 dias), nas condições $25,0 \pm 2,0$ °C e $5,0 \pm 2,0$ °C, conforme visto na **Figura 33**.

Figura 33: Teor de cafeína ao longo do Teste de Estabilidade Normal (TEN), nas condições de $25,0 \pm 2,0$ °C (ambiente) e $5,0 \pm 2,0$ °C (geladeira).



Legenda: Ccaf (%): percentual de variação da concentração de cafeína na nanoemulsão.

A condição de $25,0 \pm 2,0$ °C apresentou redução da concentração de cafeína ao longo do tempo da TEN (9,4%). A $5,0 \pm 2,0$ °C, também, houve redução da concentração de cafeína ao longo do tempo da TEN (15,1%). A redução da concentração de cafeína na condição de geladeira poderia influenciar na intensidade da resposta anticelulítica.

5.6. Eficiência de Associação (EA%) da cafeína nas gotículas

A eficiência de associação foi calculada de acordo com o **item 4.3.2**. O valor obtido de acordo com a **Equação 5** (4,8%), é inferior ao encontrado na literatura, provavelmente devido à hidrofília da cafeína e sua baixa solubilidade na fase oleosa utilizada. Zhang e colaboradores conseguiram eficiência de associação em nanoemulsão com ácido oléico- doxirubicina de 93,7%. O que indica que a cafeína se encontra majoritariamente na fase contínua.

5.7. Avaliação do potencial de irritação ocular

Uma das mais importantes propriedades biológicas de produtos de consumo, e também de muitas matérias-primas, é o grau de compatibilidade local para membranas mucosas. Os testes padronizados *in vivo*, são aceitos pelas autoridades de saúde pública como válidos para estimar o potencial de irritação de produtos químicos e avaliação do risco. Um dos mais importantes testes *in vitro* é a imagem de tamanho normal HET-CAM (STEILING *et al.*, 1999).

Os controles positivos foram considerados fortemente irritantes pois apresentaram eventos de lise e coagulação em um tempo médio de 2 segundos. O ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) (2010) preconiza que os resultados são válidos somente se os controles positivos forem classificados como fortemente irritantes por meio do índice de irritação ocular (IS).

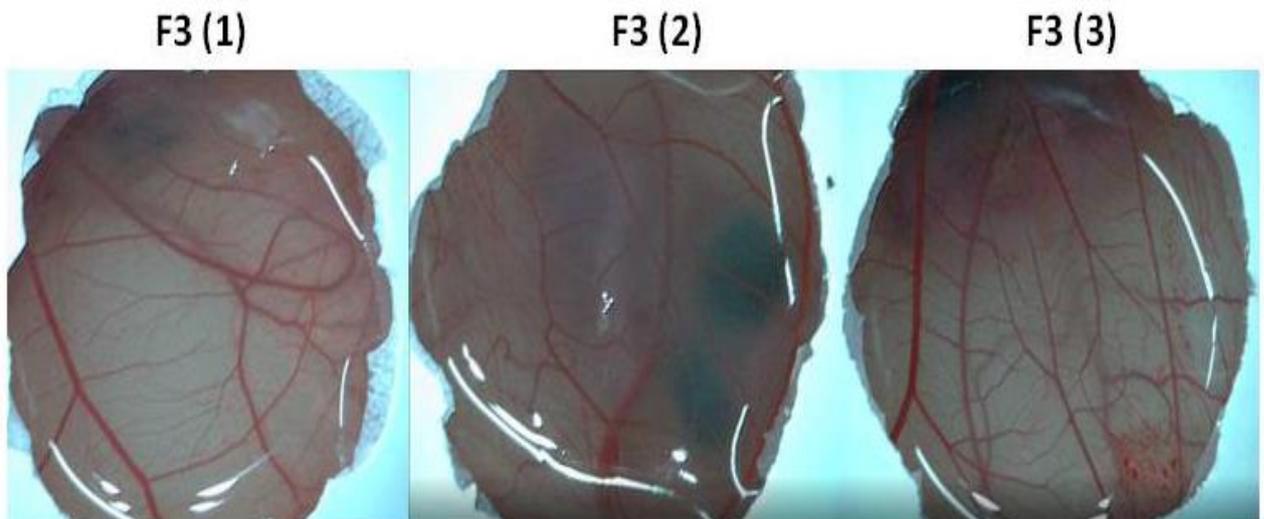
Cálculo do ensaio *in vitro* Het Cam

$$\text{IS} = \frac{(301 - \text{H})}{300} \times 5 + \frac{(301 - \text{L})}{300} \times 7 + \frac{301 - \text{C}}{300} \times 9$$

$$= 1,35 + 0,023 + 0,03 = 1,4$$

O resultado de 1,4 foi considerado levemente irritante de acordo com o **Tabela 3**, uma vez que durante os 5 min ou 300 (seg.) do ensaio não houve coagulação ou lise. Houve hemorragia em apenas uma amostra da triplicata, conforme **Figura 34**, o que indica cautela no uso deste produto para a área dos olhos com apelo de redução de bolsas e olheiras.

Figura 34: Triplicata da formulação F3 para observação dos eventos.



5.8. Ensaio de Permeação Cutânea

A solubilidade da cafeína saturada no tampão PBS pH 7.4 foi avaliada de acordo com o item 4.2.8. e foi menor (0,02 mg/ml) em relação à solubilidade em água que segundo Budavari *et al.*, (1996) é de 21,74 mg/ml. O valor de cafeína solúvel no tampão PBS saturado foi de 0,09%, considerando 21,74 mg/ml como 100% de solubilidade para a cafeína em solução aquosa não saturada, conforme na **Tabela 12**.

Tabela 12: Concentração da cafeína no tampão PBS, determinação a 273 nm.

Conc. teórica e Exper. µg/mL		Conversão em mg/mL	
30,76	16,32	0,03	0,02

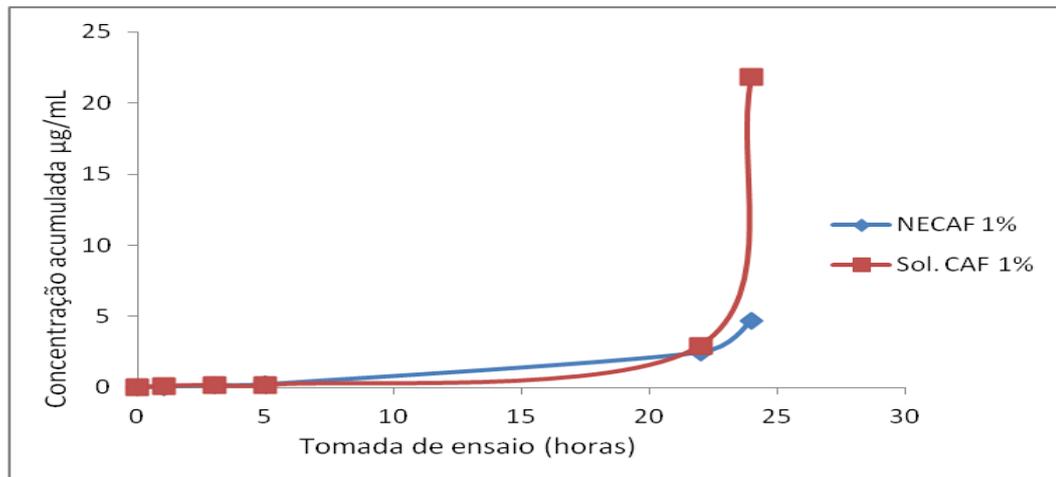
Os resultados obtidos indicaram que no tampão utilizado a cafeína foi pouco solúvel e dependendo da concentração a ser permeada ela pode saturar o líquido do compartimento receptor composto pelo mesmo tampão.

Para a realização deste ensaio foi determinada a perda de água transepidermica das peles do experimento (12,63 g/m²/h), média (n=3), que está dentro da faixa de perda de água transepidermica para pele íntegra: 6,11-47,67 g/m²/h, este ensaio é importante para verificar a integridade dessa pele (GARDIEN *et al.*, 2016). A área de difusão foi de 2,2 cm² e a espessura média da pele foi de 3,67 mm, ambas foram mensuradas com paquímetro. O volume ocupado pelo compartimento receptor foi 3 ml. O ensaio foi realizado de acordo com o item **4.3.5**.

O valor do coeficiente de permeabilidade aparente da nanoemulsão **F3** foi de $P_{app}=5,016 \cdot 10^{-5} \text{ cm h}^{-1}$ (0,00005016), enquanto que o da solução com cafeína a 1% p/v foi de $P_{app}=2,4 \cdot 10^{-4} \text{ cm h}^{-1}$ (0,00024).

A concentração de cafeína acumulada no líquido receptor através da pele dentro de 24h foi 5,45 e 20,55 µg/ml para nanoemulsão com cafeína (NECAF) 1% p/v e solução com cafeína (Sol. CAF) 1% p/v respectivamente, conforme **Figura 35**. Ou seja, a solução com cafeína a 1% p/v permeou mais que a nanoemulsão **F3**, corroborando com o resultado do ensaio de eficiência de associação, onde a cafeína permaneceu majoritariamente na fase aquosa contínua.

Figura 35: Perfil de permeação cutânea da cafeína da nanoemulsão **F3** e na solução de cafeína a 1% p/v na detecção de 273 nm.



Os demais compartimentos apresentaram as concentrações conforme **Tabela 13**.

Amnon & Greenberg (2014) mencionaram o baixo coeficiente de permeabilidade aparente para a membrana humana em relação aos outros modelos animais como o porco.

Tabela 13: Concentração de cafeína presente nos outros compartimentos do experimento, comparando a nanoemulsão com cafeína 1% p/v **F3** e a solução com cafeína 1% p/v na detecção de 273 nm, respectivamente.

Concentração experimental (µg/mL) ±dp		
Localização	NECAF F3	Sol. CAF 1%
Swab 1	55,072± 41,93	38,5± 32,38
Swab 2	36,58± 27,51	22,8± 5,01
Epiderme	0,43± 0,38	1,03± 1,52
Derme	5,45± 1,76	20,55± 1,84

Legenda: NECAF: nanoemulsão com cafeína 1% (**F3**); DP: desvio padrão; SWAB: haste flexível com algodão; Sol. CAF 1%: solução de cafeína 1% p/v.

É comum obter maior concentração do componente ativo (cafeína) nos *swabs* porque os mesmos são responsáveis pela remoção do excesso da formulação para a superfície da pele e da formulação em contato com o compartimento doador.

A nanoemulsão permeou (5,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aproximadamente 4x (quatro vezes) menos em relação a solução com cafeína (20,55 $\mu\text{g}/\text{mL}$). O que sugeriu que a saturação da cafeína no compartimento doador favoreceu a permeação cutânea da mesma. A cafeína vinculada neste sistema emulsionado O/A não foi relevante para a permeação cutânea. As concentrações permeadas não ultrapassaram a concentração de saturação do tampão PBS (48,96 $\mu\text{g}/3\text{mL}$).

A solução com cafeína permeou mais que a nanoemulsão com cafeína **F3**, porém a nanoemulsão melhorou visualmente e sensorialmente o efeito de melhorar a precipitação da cafeína.

6 - CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

A condição de temperatura $5,0 \pm 2,0$ °C foi escolhida para o armazenamento da nanoemulsão em consideração aos seguintes resultados: Menor percentual de variação dos valores de pH e menor desvio padrão durante os 90 dias da TEN (2% e 0,1) respectivamente. Maior uniformidade em relação aos valores de pH de acordo com o Teste de Tukey. Os índices de polidispersão apresentaram desvio reduzido de 0,1 e valores iguais ou inferiores a 0,2 durante a TEN. Tamanho médio de gotícula de 40 nm e percentual de variação igual ou inferior a 0,9%.

O percentual de Transmitância no t0 e com t90 dias de TEN apresentou valores de 48,7 e 6,5% respectivamente, indicando perda da transparência no decorrer do tempo. Os valores de ω_2 ($r^2=0,9024$) e de ω_3 ($r^2=0,9078$), sugeriram que o mecanismo responsável pelo aumento do diâmetro da gota nesta condição de temperatura foi uma relação sutil entre a difusão de gotículas de óleos isoladas e o óleo transportado por micelas. Os valores da constante de Ostwald ($\omega_2 = 6,17641 \cdot 10^{-06} \text{ nm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $\omega_3 = 0,0001 \text{ nm}^3 \text{ s}^{-1}$) foram melhores em comparação à condição ambiente segundo a relação de maturação de Ostwald.

No ensaio com a espectroscopia Raman foi comparado o espectro da cafeína em solução em diversos valores de pH e não foi observado deslocamento de bandas e nem a sua protonação, o que indicou que o pH não possui influência no deslocamento de bandas da cafeína. As bandas de cafeína encontradas na nanoemulsão F3 foram compatíveis com as encontradas na solução de cafeína (bandas 1337, 652,5 e 558,2 cm^{-1}), sugerindo que a cafeína se encontra na fase contínua.

Na validação analítica o método foi linear, preciso e exato. O ensaio de recuperação do padrão nas matrizes biológicas foram exatas. Os valores de desvio padrão na precisão intra e interdia foram inferiores a 5% (DPR%=0). Foi obtido para as soluções com padrão cafeína valores de exatidão entre 85 e 115%. O LQ estimado foi de 1,40 $\mu\text{g/ml}$. O LD estimado foi de 0,46 $\mu\text{g/ml}$, ambos para a cafeína padrão secundário. Na pesquisa de interferentes da cafeína com a nanoemulsão sem cafeína (NSCAF) foi detectado um pico que foi desconsiderado por possuir concentração inferior ao LQ e LD, em relação ao tampão PBS e na matriz biológica não foram detectados interferentes na eluição. Apresentou redução da concentração de cafeína ao longo do tempo da TEN (15,1%).

A eficiência de associação (4,8%) foi inferior à encontrada na literatura, provavelmente devido à hidrofília da cafeína e sua baixa solubilidade na fase oleosa utilizada.

No ensaio *in vitro* HET--CAM, o resultado de 1,4 foi considerado levemente irritante para a nanoemulsão com cafeína **F3**, sugerindo cautela na elaboração de formulações na região das áreas dos olhos com intuito de redução de bolsas e olheiras.

No ensaio de permeação cutânea as concentrações permeadas não ultrapassaram a concentração de saturação do tampão PBS (48,96 µg/3mL). A solução com cafeína permeou (20,55 µg/mL) e a nanoemulsão com cafeína **F3** (5,45 µg/mL), porém, a nanoemulsão melhorou visualmente e sensorialmente a precipitação da cafeína, o que sugere que a saturação da cafeína no compartimento doador favorece a permeação cutânea da mesma. A cafeína vinculada neste sistema emulsionado O/A não foi relevante para a permeação cutânea.

7 - BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

- ABD, E.; NAMJOSHI, S.; MOHAMMED, Y. H.; ROBERTS, M. S.; GRICE, J. E. Synergistic Skin Penetration Enhancer and Nanoemulsion Formulations Promote the Human Epidermal Permeation of Caffeine and Naproxen. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 212-220, 2016.
- ALMEIDA, T. S. et al. Índices de vegetação para a cultura da soja em diferentes condições hídricas e de sistema de manejo do solo. XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, Goiânia. **XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. Goiânia, Goiás, 2005.
- ALQUIER, L. Ce qu'est La Cellulite: comment la trailer. *Monde Méd. déc.* 59, (960). **Revue classée au dossier cellulite**, p. 344, 1949.
- ALLTOX. Non-animal Methods for Toxicity Testing. Table of Validated and Accepted Alternative Methods. Validation & Regulatory Acceptance Status of Alternative Test Methods & Testing Strategies. Disponível em: <<http://www.alttox.org/ttrc/validation-ra/validated-ra-methods.html>>. Acesso em: 17 jun 2016.
- AMNON, C. S.; GREENBERG, I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine-loaded microemulsion showing low reliability of the frozen/thawed skin models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, p. 516-524, 2014.
- ANDREEV, G.; SCHRADER, B.; SCHULZ, H.; FUCHS, R.; POPOV, S.; HANDJIEVA, N. Non-destructive NIR-FT-Raman analysis in practice. Part 1. Analysis of plants and historic textiles. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 371, p. 1009–1017, 2001.
- ANTON, N.; GAYET, P.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion: **International Journal of Pharmaceutics**, v. 344, p. 44-52, 2007.
- ANTON, N.; VANDAMME, F. T. The universality of low-energy nano-emulsification. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 142-147, 2009.
- AVELAR, M.; ILLOUZ, Y. **Lipoaspiração**. São Paulo, Ed. Hipócrates, 231p., 1986.
- BABY, A.R.; MIGLIATO, K. F.; MACIEL, C. P. M.; ZAGUE, V.; PINTO, C. A. S. O.; SALGADO, H. R. N.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Accelerated chemical stability data of O/W fluid emulsions containing the extract of *Trichiliacatigua* Adr. Juss (and) *Ptychopetalumolacoides* Bentham. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, p. 405-412, 2007.

- BECHER, S. E.; SCHIK, M. J. Macroemulsions. In: SCHICK, M. J. *Surfactante Science Series, Nonionic Surfactantes – Physical Chemistry*. New York. Marcel Deckker (Ed), v. 23, p. 435-91, 1987.
- BERGENSTAHL, B.; WELIN-BERGER, K. Inhibition of Ostwald *ripening* in local anesthetic emulsions by using hydrophobic excipients in the disperse phase. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 200, p. 249-260, 2000.
- BERLAN, M.; GALITZKY, J. LAFONTAN, M. Hétérogénéité fonctionnelle Du tissu adipeux: récepteurs adrénérgiques et lipomobilisation. **Le Journal de Médecine Esthétique et de Chirurgie Dermatologique**, v. 73, n. 19, p. 7-15, 1992.
- BERTIN, C.; ZUNINO, H.; PITTET, J. C.; BEAU, P.; PINEAU, P.; MASSONEAU, M.; ROBERT, C.; HOPKINS, J. A Double-blind evaluation of the activity of an anti-cellulite product containing retinal, caffeine, and ruscogenine by a combination of several non-invasive methods. **Journal Cosmetic Science**, Paris, v.2, n.4, p.199-211, 2001.
- BEZERRA, S. V.; REBELLO, T. **Guia de Produtos Cosméticos**. São Paulo: Senac, p. 37, 61-63, 1996.
- BINAZZI, M. GRILLI-CICCOLONI, E. A propósito della cosiddetta cellulite e della dermatopaniculopatia edemato fibrosclerotica. **Annali Italiani di Dermatologia Clinica Sperimentale**, v. 31, p. 121-125, 1977.
- BJÖRNTORP, P. SJÖSTROM, L. Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. **Metabolism Journal**, v. 20, p. 703-713, 1971.
- BODDÉ, H., KRUTHOF, M., BRUSSEE, J., KOERTEN, H. Visualisation small-angle X-ray scattering. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 97, p. 1005-1012, 1991.
- BORGES, F. **Dermato-funcional: modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. São Paulo, SP: Phorte, 2 ed., 2010.
- BOUWSTRA, J. A., PESCHIER, L. J. C., BRUSSEE, J., BODDE, H. E. Effect of N-alkylazocycloheptan-2-ones including Azone on the behaviour of stratum corneum. **International Journal Pharmaceutics.**, v. 52, p. 47-54, 1989.
- BRANDÃO, L. **ÍNDICE ABC: Ingredientes Indústria Higiene Pessoal, Cosméticos**. São Paulo: Pharmabooks Editora, 3ed, 1460p., 2009.
- BRASIL. Parecer Técnico nº 1, de 29 de junho de 2002. Utilização de metilxantinas em preparações cosméticas. Disponível em: <[HTTP://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_metil.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_metil.htm)>. Acesso em: 02 abril 2014.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, 2003a.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos**, 2003b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>>. Acesso em: 20 de abr de 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2004. v.1, p 45.
- BRASIL. Farmacopéia Brasileira 5ª Ed., v. 1, 2010. **Preparo de tampão PBS**. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume%201.pdf>. Acesso em: 02 abril 2014.
- BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada RDC N° 27, de 17 de maio de 2012. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.pdf>. Acesso em 12 maio de 2016.
- BRONAUGH, R. L. **Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques, in: Percutaneous Absorption**, 2 ed., New York: Marcel Dekker, p. 239–258, 1989.
- BRONAUGH, R. L.; STEWART, R. F. Methods for in vitro percutaneous absorption studies, IV: The flow-through diffusion cell. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 74, n. 1, p. 64-67, 1985.
- BUDAVARI, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P. E.; KINNEARY, J. F. **The Merck Index: an encyclopaedia of chemicals, drugs and biological**. 20. ed. New Jersey (NJ): Merck, p. 268, 1996.
- CANSTOCKPHOTO. Figura de tecido com cellulite (esquerda) e sem cellulite (direita). Disponível em: <<http://www.canstockphoto.com.br/celulite-crucifixos-seção-3693773.html>>. Acesso em: 06 de abr. de 2015.
- CIPORKIN, H.; PASCHOAL, J. H. **Atualização terapêutica e fisiopatogênica da lipodistrofia ginóide**. São Paulo: Santos, p. 1, 322, 357, 1992.
- CRODA. **Raw Materials Guide**, 2006. Disponível em: < [file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Raw%20Materials%20Guide%202006\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usu%C3%A1rio/Downloads/Raw%20Materials%20Guide%202006(1).pdf) >. Acesso em: 26 de set. 2016.
- CURVELO, S.; RAMALHO, A.T. Substâncias Cosmetologicamente Ativas: Caracterização, Indicação, Eficácia e Segurança: Cafeína. **Revista Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde**, v. 3, n.2, p.183–150, 2006.

- DARIO, M. F.; SANTOS, M. S. C. S.; VIANA, A. S.; ARÊAS, E. P. G.; BOU-CHACRA, N. A.; OLIVEIRA, M. C.; PIEDADE, M. E. M.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. A high loaded cationic nanoemulsion for quercetin delivery obtained by sub-PIT method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 489, p. 256-264, 2016.
- DAVIS, H. M. Analysis of creams and lotions. In: SEZEL, A. J. (Ed.) **Newburger's Manual of Cosmetic Analysis**. Washington D.C., Association of Official Analytical Chemists, p. 32, 1977.
- PAEPE, K. D.; ROSEEUW, D., ROGIERS, V. Repair of acetone-and sodium lauryl sulfate-damaged human skin barrier function using topically applied emulsions containing barrier lipids. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, p. 587-94, 2002.
- DUNCAN, R. E. *et al.* Regulation of lipolysis in adipocytes. **Annual Review of Nutrition**, v. 27, p. 79-101, 2007.
- EDWARDS, H. G. M.; MUNSHI, T.; ANSTIS, M. Raman spectroscopic characterisations and analytical discrimination between caffeine and demethylated analogues of pharmaceutical relevance. **Spectrochimica Acta Part A**, v.61, n.7, p. 1453-1459, 2004.
- FERNANDES, E. M.; DAMASCENO, G. A.; FERRARI, M.; AZEVEDO, E. P. Incremento na dissolução da caffeine em base de ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer: desenvolvimento farmacotécnico de géis anti-celulite. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 1, p. 69-75, 2015.
- FERNANDEZ, P.; ANDRE, V.; RIEGER, J.; KUHMIE, A. Nano-emulsions formation by emulsions phase inversion, **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, p. 53-58, 2004.
- FERREIRA, P.; SERRA, H.; PEDRO, J. M.; GRAÇA, A.; SIMPLÍCIO, A. L. Optimização de um método de avaliação simultânea da dissolução e permeabilidade de fármacos. **Saúde e Tecnologia**, n. 2, p. 38-44, 2008.
- FISHER, H.; KANSY, M.; AVDEEF, A.; SENNER, F. Permeation of permanently positive charged molecules through artificial membranes influence of physico-chemical properties. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 1, p. 32-42, 2007.
- FRANZ, T. J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 64, p. 190-195, 1975.

- FRANZ, T. J. The Finite dose Technique as a Valid in Vitro Model for the Study of Percutaneous Absorption in Man. **Current Problems in Dermatology**, v.7, p.58-68, 1978.
- FRIBERG, S. E.; GOLDSMITH, L. B.; HILTON, M. L. Theory of emulsions. In: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. New York: Marcel Dekker; (Ed.), p. 49-91, 1988.
- FOX, C. Advances in cosmetic science and technology II. Topical bioactive materials. (Review). **Cosmetic Toiletries**, v. 109, n. 9, p. 83-115, 1994.
- GIL, O. M. Espectroscopia **Raman aplicada ao estudo da resposta bioquímica de tecidos a compostos lamelares**. Dissertação (Mestrado) em Química. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 23-24, 2015.
- GIMIER, L. P.; JUEZ, P. Imagem da pele humana e subdivisões morfológicas (estrato córneo, epiderme e derme). **Ciencia Cosmética Bases Fisiológicas y Cráterios Prácticos**. Madri: Consejo General de Colegios Oficiales Farmacéuticos, p. 212, 1995.
- GIOIA, F.; CELLENO, L. The dynamics of transepidermal water loss (TEWL) from hydrated skin. **Skin Research and Technology**, v. 8, p. 178-186, 2002.
- GOMES, R. K.; DAMAZIO, M. G. **Cosmetologia: descomplicando os princípios ativos**. 3.ed. São Paulo, SP: Livraria Médica Paulista, 2009.
- GRIFFIN, W. C. Classification of Surface-Active Agents by ‘HLB’. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.
- GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Revista Fisioterapia Dermato Funcional: fundamentos, recursos e patologias**. 3. ed. São Paulo, SP: Manole, 584p., 2007.
- GUY, R. H.; HADGRAFT, J. Rate Control in Transdermal drug delivery. **International Journal Pharmaceutics**, n. 3, v. 82, p. 1-6, 1991.
- HADGRAFT, J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **International Journal Pharmaceutics**, v. 184, n. 1, p. 1-6, 1999.
- HAWKINS, G. S.; REIFENRATH, W. G. Influence of skin source, penetration cell fluid, and partition coefficient on in vitro skin penetration. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 378-381, 1986.
- HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAM, R. **Principles of colloid and surface chemistry**, 3. ed., p. 43, 1997.
- HERMAN, A.; HERMAN, A. P. Caffeine's Mechanisms of Action and Its Cosmetic Use. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 8-14, 2013.
- HOLMBERG, K.; JONSON, B.; KNOBERG, B.; LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. 2 ed. New York: John Wiley e Sons Ltd. (Ed.), p. 451-471, 2002.

- ICH. International Conference on Harmonisation of technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use. Quality Guidelines. View All Quality Guidelines. Analytical Validation Q2. **Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)**. 2005, 17p. Disponível em: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Acesso em: 10 abr. 2010.
- IDSON, B. Percutaneous absorption. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 64, p. 901-924, 1975.
- INFOESCOLA. Figura da Epiderme. Disponível em: <http://www.infoescola.com/anatomia-humana/epiderme/>. Acesso em: 15 de agos. de 2016.
- IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; FENG, J.; GARCIA-CELMA, M. J. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method, **Langmuir**, v. 20, p. 6594–6598, 2004.
- JAFARI, S. M.; HE, Y.; BRANDARI, B. Production of sub-micron emulsions by ultrasound and microfluidization techniques. **Journal of Food Engineering**, v. 82, n. 4, p. 478-488, 2007.
- JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos colóides. **Química nova na escola**, v. 9, p. 9-13, 1999.
- KABALNOV, A. S.; PERTZOV, A. V.; SHCHUKIN, E. D. Ostwald ripening in emulsions: I. Direct observations of Ostwald ripening in emulsions. **Journal of Colloid and Interfaces Science**, v. 118, p. 590-597, 1987.
- KALWEIT, S.; BESOKE, R.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicology in vitro**, v. 4, n. 4/5, p. 702-706, 1990.
- KNITTLE, J. L.; TIMMER, K.; GINSBERG-FELLNER, F.; BROW, R. E.; KATZ, D. P. The growth of adipose tissue in children and adolescents. Cross-sectional and longitudinal studies of adipose cell number and size. **Journal Clinical Investigation**, v. 63, n. 2, p. 23, 1979.
- KRUPEK, T.; MAREZE-DA-COSTA, C. E. Mecanismo de ação de compostos utilizados na cosmetica para o tratamento da gordura localizada e da celulite. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, p. 555-566, 2012.
- KUNIEDA, H.; HASEGAWA, Y.; FOHN, A. C.; NAITO, M.; MUTO, M. Phase behavior of polyoxyethylene hydrogenated castor oil in oil water system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 109, p. 209-216, 1996.

- LOCHHEAD, R. Y. Emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v.109, n.5, p. 93-103, 1994.
- LUEDER, M.; MOREL, J.; TIEDTKE, J.; MARKS, O. Anti-cellulite actives, dream ou reality?. **Cosmetics Today**. Suplemento to chimica oggi/ Chemistry Today. p. 45-48, 2004. Disponível em <[http://www.teknoscienze.com/supplements/cosmetics_today/pdf_cosmetics%20today/lueder .pdf](http://www.teknoscienze.com/supplements/cosmetics_today/pdf_cosmetics%20today/lueder.pdf)>. Acesso em: 16 jan. 2015.
- LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6/7, p. 495-496, 1986.
- MALVERN INSTRUMENTS. **An Introduction to Dispersion Technology system**. Webinar Disponível em: <<http://WWW.malvern.com/Dispersion Technology Introduction>>2016 Acesso em: 23 de br. de 2016.
- MALVERN. **Dynamic Light Scattering**. Disponível em: <http://www.sysmex.nl/fileadmin/media/f102/MLS/Academy_docs/Malvern_Dynamic_Light_Scattering.pdf>, 2015. Acesso em: 03 de junho de 15.
- MAPRIC. **Boletim Técnico Crodamol GTCC**. Disponível em: <http://www.mapric.com.br/anexos/boletim322_17092007_160310.pdf>. Acesso em: 03 de outubro de 2015.
- MARSZALL, L. HLB of Nonionic Surfactants: RIT and EPI Methods, In: Schick, M. J. **Surfactant Science**. Series Nonionic Surfactants-Physical Chemistry. New York: Marcel Dekker Inc. (Ed.), v. 23, p. 93-547, 1987.
- MARTEN, B.; PFEUFFER, M.; SCHREZENMEIR, J.. Medium-chain triglycerides. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 11, p. 1374-1382, 2006.
- MARTINI, E. **Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química**. Dissertação (Mestrado) em Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 106, 2005.
- MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p.17-22, 2009.
- MATAS, M.; EDWARDS, H. G. M.; LAWSON, E. E.; SHIELDS, L.; YORK, P. FT-Raman spectroscopic investigation of a pseudopolymorphic transition in caffeine hydrate. **Journal of Molecular Structure**, v. 440, p. 97-104, 1998.
- MEI, Z.; LIU, S.; WANG, L.; JIANG, J.; XU, J.; SUN, D. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, p. 565–572, 2011.

- MENOSGORDURA. Figura das vias da lipólise no adipócito. Disponível em: <
<http://menosgordura.com/site/weight-level/#2>>. Acesso em: 25 de maio de 2015.
- MORRISON, I. D.; ROSS, S. **Emulsions Colloidal, dispersion, suspensões, emulsions and foams**. New York: John Wiley e Sons (Ed.), p. 420-455, 2002.
- NANOTECH. **Consumer Products Top the 1,000 Mark, 2009**. Disponível em:
<http://www.nanotechproject.org>. Acesso em: 21 set. 2014.
- NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES, 2006. Disponível em:
<http://www.nih.gov/about-nih/what-we-do/nih-almanac/national-institute-environmental-health-sciences-niehs>. Acesso em abr. 2015.
- OLIVEIRA, A. G. L.; SILVA, R. S.; ALVES, E. N.; PRESGRAVE, R. F.; PRESGRAVE, O. A. F.; DELGADO, I. F. Ensaio da membrana cório-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 1, 2012.
- OLIVEIRA, J. M.; MEI, L. H. I. Surfactantes reativos não iônicos em polimerização em emulsão de látices de acetato de vinila, vinil neodecanoato: influência nas propriedades de barreira à água. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 1, p. 22-30, 2009.
- ONGPIPATTANAKUL, B., BURNETTE, R. R., POTTS, R. O., FRANCOEUR, M. L. Evidence that oleic acid exists in a separate phase within stratum corneum lipids. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 350-354, 1991.
- OTBERG, N, PATZELT A, RASULEV U, HAGEMMEISTER T, LINSCHIED M, SINKGRAVEN R, STERRY W, LADEMANN J. The role of hair follicles in the percutaneous absorption of caffeine. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 65, p. 488-92, 2008.
- PARISH, W. E. Ability of in vitro (corneal injury-eye organ-and chorioallantoic membrane) tests to represent histopathological features of acute eye inflammation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 23, p. 215-227, 1985.
- PAVEL, I.; SZEGHALMI, A.; MOIGNO, D.; CINTÃ, S. KIEFER, W. Theoretical and pH dependent surface enhanced Raman spectroscopy study on caffeine. **Biopolymers**, v. 72, p. 25-37, 2003.
- PIANOVSKI, A. R.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. S.; LIMA, C. G.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 249-259, 2008.

- PIORKOWSKI, D. T.; MCCLEMENTS, D. L. Beverage emulsions: Recent developments in formulation, production, and applications. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 5-41, 2014.
- PIRES, M. C.; PSCHIEDT, M. Vulvovaginites na infância: visão do dermatologista. **Pediatria Moderna**, v. 50, n. 5, p. 229-232, 2014.
- PRATIWI, D. FAWCETT, J. P.; GORDON, K. C.; RADES, T. Quantitative analysis of polymorphic mixtures of ranitidine hydrochloride by Raman spectroscopy and principal components analysis. **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 54, p. 337-341, 2002.
- PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**, 4ed., Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, p. 962, 1061, 1992.
- RAWLINGS, A. V. Cellulite and its treatment. **International Journal of Cosmetics Sciences**, v. 28, n. 3, p. 175-190, 2006.
- REIFENRATH, W. G.; HAWKINS, G. S.; KURTZ, M. S. Percutaneous penetration and skin retention of topically applied compounds: An in vitro-in vivo study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 80, p. 526-532, 1991.
- RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada à Dermoestética**. 2. ed. São Paulo, SP: Pharmabooks, p. 291 e 296, 2010.
- RIEGER, M. M. Factors affecting sorption of topically applied substances. In: ZATZ, J. L. (Ed). **Skin permeation: fundamentals and application**. Wheaton: Allured, Cap. 2, p. 33-72, 1993.
- RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n. 5, p. 47-53, 1996.
- RINALDO, G. S.; LEE, W.; STUMPER, J.; EIKERLING, M. Nonmonotonic dynamics in Lifshitz-Slyozov-Wagner theory: Ostwald ripening in nanoparticle catalysis. **American Physical Society**, v. 86, p. 1-10, 2012.
- RITO, P. N.; PRESGRAVE, R. F.; ALVES, E. N.; HUF, G.; VILLAS BÔAS, M. H. S. Avaliação dos aspectos do controle da qualidade de produtos cosméticos comercializados no Brasil analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 557-565, 2012.
- ROGER, K.; CABANE, B.; OLSSON, U. Formation of 10-100nm Size-Controlled Emulsions through a Sub-PIT cycle. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 3860-3867, 2010.

- RUBIO, L.; ALONSO, C.; LOPEZ, O.; RODRIGUEZ, G.; CODERCH, L.; NOTARIO, J.; MAZA, A. L.; PARRA, J. L. Barrier function of intact and impaired skin: percutaneous penetration of caffeine and salicylic acid. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 881-889, 2011.
- SCHALKA, S.; REIS, V. M. S. Fator de proteção solar: significado e controvérsias. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 3, p. 507-515, 2011.
- SAJJADI, S.; JAHANZAD, F.; YIANNESKIS, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in abnormal O/W emulsions effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance. **Industry and Engineering Chemical Research**. Washington D.C., p. 3571-3577, 2003a
- SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phases inversion in p-xylene-water emulsion with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate (Span 20 Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.218, p. 241-254, 2003b.
- SALLAGER, J. L.; FORGJARINIA.; MARQUEZ. L.; PENA, A.; PIZZINO.; RODRIGUEZ, M. P.; GONZALEZ, M. R. Using emulsion inversion in industrial process. **Advances in Colloid an Interface Science**, v. 259, p. 109-109, 2004.
- SANTOS, I. M. N. S. R.; SARRUF, F. D.; BALOGH, T. S.; PINTO, C. A. S. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Hidrolipodistrofia ginoide: aspectos gerais e metodologias de avaliação da eficácia. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**, v. 36, n. 2, p. 85-94, 2011.
- SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERREZ, S.S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.
- SHAFIQ-UN-NABI, S.; SHAKEEL, F.; TALEGAONKAR, S.; ALI, J.; BABOOTA, S.; AHUJA, A.; KHAR, R. K.; ALI, M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. **American Association of Pharmaceutical Scientists Tech**, v. 8, n. 2, p. E1-E6, 2007.
- SHINODA, K.; FRIBERG, S. E. Factors affecting the phase inversion temperature in emulsions. **Emulsions and Solubilization**, New York: John Wiley & Sons . (Ed.). p. 96-123, 1986.
- SHINODA, K.; SAITO, H. The Effect of Temperature on The Phase Equilibria and the Types of dispersions of the Ternary System Composed of water, cyclohexane, and Nonionic Surfactant. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 26, p. 70-74, 1968.

- SIMÕES, C. M. O. E.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS, cap.18, p. 467-495, 2003.
- SINTOV, A. C.; GREENBERG, I. Comparative percutaneous permeation study using caffeine loaded microemulsion showing low reliability of the frozen thawed skin models. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1, p. 516-524, 2014.
- SMITH, E. W.; HAIGH, J. M. In vitro systems for assessment of drug release from topical formulations and transmembrane permeation. **Percutaneous Absorption**, 2ed. New York: Dekker, p. 465, 1989.
- SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R. ROOKE.; GONZÁLEZ, G.; LUCAS, E. F. Evaluation of Process Conditions and Characterization of Particle Size and Stability of Oil-in-water Nanoemulsions. **Colloid Journal**, v. 72, n.1, p. 56–65, 2010.
- SRILATHA, R.; APHARNA, C.; SRINIVAS, P.; SADANANDAM, M. Formulation, evaluation and characterization of glipizide nanoemulsion. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 6, p. 66-71, 2013.
- STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, O. S. The HET-CAM, a useful *In Vitro* assay for assessing the eye irritation Properties of Cosmetic Formulations and Ingredients. **Toxicology in vitro**, v. 13, p. 375-384, 1999.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 303-318, 2004.
- TAGLIARI, M. P.; GRANADA, A.; KUMINEK, G.; STULZER, H. K.; SILVA, M. A. S. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico, e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginate. **Química Nova**, v. 35, n. 6, p. 1228-1232, 2012.
- TANDON, P.; FORSTER, G.; NEUBERT, R.; WARTEWIG, S. Phase transitions in oleic acid as studied by X-ray diffraction and FT-Raman spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 524, p. 201–215, 2000.
- TANO, C. T. N. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação de cafeína e Cafeisilane®**. Dissertação (Mestrado) em Ciências Farmacêuticas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 79-80, 2003.

- TERRANOVA, F.; BERARDESCA, E.; MAIBACH, H. Cellulite: nature and aetio-pathogenesis. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 3, p. 157-167, 2006.
- TRAUER, S.; PATZELT, A.; OTBERG, N.; KNORR, F.; ROZYCHI, C.; BALIZS, G.; BUTTEMAYER, R.; LINSCHIED, M.; LIEBSCH, M.; LADEMANN, J. Permeation of Topically applied caffeine through human skin – a comparison of in vivo and in vitro data. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 68, p. 181-186, 2009.
- THE UNITED STATES PHARMACOPEIA CONVENTION. **The United States Pharmacopeia: the official compendia of Standards**. 31. MD: Rockville, MD: Asian Edition, v. 2, p. 1590, 2008.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Pharmacopeial Forum 2009**. Disponível em: < http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/transdermalStimArticle.pdf >. Acesso em: 06 de jun. de 2016.
- UNITED STATES PHARMACOPEIA: USP 36; The National Formulary: NF31. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, p. 983-988, 2013.
- UNITED STATES NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method, 2010. Disponível em: < <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/protocols/ivocular-hetcam.pdf> >. Acesso em: 15 de jul. de 2016.
- VANKEIRSILCK, T.; VERCAUTEREN, A.; BAEYENS, W.; van der weken, G.; Applications of Raman Spectroscopy in pharmaceutical analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 869–877, 2002.
- ZHANG, J.; BOZENA, M. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: ketoprofen, lidocaine and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 421, p. 34-44, 2011.
- ZERFA, M.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W.; Phase behavior of polymer emulsions during the phase inversion process in the presence of non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 178, p. 41-48, 2001.
- WAGNER, H.; KOSTKA, K. H.; LEHR, C. M.; SCHAEFER, U. F. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of Controlled Release**, v. 75, p. 283-295, 2001.
- WALTERS, K. A.; WALKER, M.; OLEJNIK, O. Non-ionic Surfactant Effects on Hairless Mouse Skin Permeability Characteristics. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 525-529, 1988.

- WEISS, J.; COUPLAND, J.; BRATHWAITE, D.; MCCLEMENTS, D. Influence of molecular structure of hydrocarbon emulsion droplets on their solubilization in non ionic surfactant micelles. **Colloid and Surfaces A**, v. 121, p. 53–60, 1997.
- WEISS, J.; CANCELIERI, C.; MCCLEMENTS, D. Mass transport phenomena in oil-in-water emulsions containing surfactant micelles: Ostwald ripening, **Langmuir**, v. 16, p. 6833–6838, 2000.
- WILLIAMS, B. R.; NAZARIANS, A.; GIL, L. M. A. A review of rivastigmine: a reversible cholinesterase inhibitor. **Clinical Therapeutics.**, v.25, p. 1634–1653, 2003.
- WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANDUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability, **Langmuir**, v. 24, p. 12758–12765, 2008.

**ANEXO A - INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS
DE BANCAS JULGADORAS DE
MESTRADO/DOCTORADO**



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

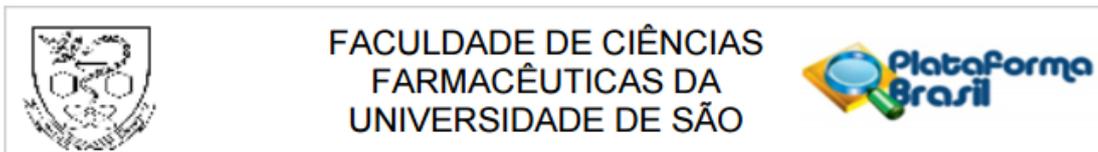
4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

**ANEXO B – PARECER DO CÔMITE DE ÉTICA EM
PESQUISA**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de eficácia de permeação de nanoemulsão com cafeína com ação anticelulítica.

Pesquisador: Vânia Rodrigues Leite e Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 51650815.0.3001.0067

Instituição Proponente: Universidade Federal de São Paulo

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.801.820

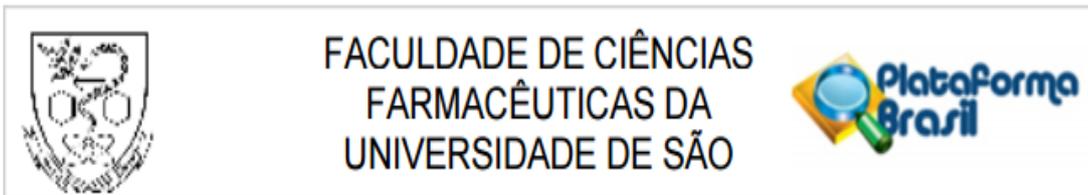
Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa científica regular da Profa. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva da Universidade Federal de São Paulo (Unifesp), campus Diadema, com co-participação da Profa. Dra. Maria Valéria Robles Velasco da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP). Participa como assistente e executante dos testes de bancada a aluna de pós-graduação da FCF-USP Thamires Batello Freire. Serão obtidas amostras de pele de 10 participantes, a partir de material obtido em cirurgias plásticas previamente indicadas. As amostras de pele serão processadas e utilizadas em laboratório a fim de avaliar a permeação nos extratos cutâneos da cafeína, utilizando cremes com nanoemulsão. A concentração de cafeína no creme a ser avaliado será de 1%, e a ANVISA libera utilização de concentrações até 8%. Será avaliada a penetração do creme em todas as camadas de pele através da concentração de cafeína obtida em cada camada.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral é avaliar a permeação cutânea da cafeína, veiculada a 1% p/p em nanoemulsão.

Objetivos específicos são avaliar, preliminarmente, a permeação das substâncias em membrana natural (pele humana) utilizando células de Franz, quantificando a cafeína nas camadas da pele: superfície, epiderme, derme e líquido receptor e realizar a determinação de cafeína nas amostras obtidas na etapa anterior (método analítico que será validado).



Continuação do Parecer: 1.801.820

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos envolvidos são os inerentes ao procedimento cirúrgico em si, e após este não há riscos envolvidos com os testes de bancada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa clara, que envolve testes de bancada. Esta pesquisa já vem tramitando há algum tempo no Comitê, tendo sido aprovada em março de 2016 tanto na instituição proponente como na co-participante. A pesquisadora solicitou uma emenda ao projeto, incluindo outros testes e um novo projeto intitulado avaliação da permeação cutânea da vitamina D em gel transdérmico e inclusão de nova aluna de pós-graduação Gabriela Maria D'Angelo

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de consentimento pós esclarecimento são apresentados, sendo um destinado aos participantes que serão submetidos ao procedimento da cirurgia plástica, e o outro destinado ao cirurgião plástico que realizará as cirurgias. Ambos são claros, com linguagem acessível.

A pesquisadora apresenta carta de anuência do Departamento de Farmácia da FCF-USP.

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto nos moldes atuais atende as resoluções do CNS 466/2012. Já havia sido avaliado anteriormente por este CEP e a pesquisadora respondeu as solicitações exaradas em parecer anterior de forma adequada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este CEP entende que o projeto de pesquisa pode ser considerado aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_776563 E1.pdf	29/08/2016 09:33:43		Aceito
Outros	CANCELAMENTO_EMENDA.docx	29/08/2016 09:32:52	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	INCLUSAO_NOVA_FORMULACAO_PA RA_TESTE_Gabriela.docx	16/08/2016 14:05:28	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	Resposta_Parecer.doc	15/01/2016 13:52:06	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito



FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO



Continuação do Parecer: 1.801.820

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	5_PROJETO_PERMEACAO.docx	15/01/2016 13:50:25	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Dr_Koji.pdf	15/01/2016 13:50:04	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_CORRIGIDO_2.doc	15/01/2016 13:47:47	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_assinada.pdf	04/12/2015 10:59:18	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	Anuencia_USP.pdf	02/12/2015 14:26:17	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito
Outros	Participa_Thamires.pdf	02/12/2015 14:23:39	Vânia Rodrigues Leite e Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 01 de Novembro de 2016

Assinado por:

Cristina Northfleet de Albuquerque
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112

Bairro: Butantã

CEP: 05.508-000

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11) 3091-8000

Fax: (11) 3091-8088

E-mail: f1111@usp.br

ANEXO C – FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO



9139 - 9129080/1 - Thamires Batello Freire

Email: tbfreire@usp.br
 Data de Nascimento: 01/09/1987
 Cédula de Identidade: RG - 42.474.920-8 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Farmacêutico - Universidade São Judas Tadeu - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Mestrado
 Programa: Fármaco e Medicamentos
 Área: Produção e Controle Farmacêuticos
 Data de Matrícula: 02/02/2015
 Início da Contagem de Prazo: 02/02/2015
 Data Limite para o Depósito: 02/08/2017
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valéria Robles Velasco - 02/02/2015 até o presente.
 Email: mvrobles@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 02/02/2015
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/03/2016
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).
 Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2017
 Impresso em: 13/02/2017 16:04:44

Irineu José de Oliveira
 Chefe Adm. de Serviço
 SPG/FCF/USP
 Nº USP 7115033

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO



9139 - 9129080/1 - Thamires Batello Freire

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5704-6/3	Análise Espectrométrica de Fármacos	09/03/2015	22/06/2015	150	10	95	A	N	Concluída
FBF5777-3/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	12/03/2015	24/06/2015	45	3	93	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delimitação de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída
PSC5964-1/2	Preparação Pedagógica (Instituto de Psicologia - Universidade de São Paulo)	11/06/2015	21/09/2015	30	2	83	A	N	Concluída
QBQ5715-8/1	Planejamento de Aulas Práticas de Bioquímica e Biologia Molecular (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/08/2015	09/11/2015	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
QFL5714-7/1	Introdução à Análise Térmica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	24/08/2015	04/10/2015	90	6	97	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	27
Estágios:			
Total:	0	25	27

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 06/02/2017

Impresso em: 13/02/2017 16:04:44

Irineu Ruel de Oliveira
Chefe Adm. de Serviço
SPG/FICF/USP
Nº USP 2115033

Janus - Sistema Administrativo de Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas



FICHA DO ALUNO

9139 - 9129000/1 - Thamires Batello Freire

Comissão julgadora da dissertação de mestrado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
57532	Maria Valeria Robles Velasco	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 05/02/2017

Impresso em: 13/02/2017 16:04:44


Irineo José de Oliveira
Civ. Adm. de Serviço
SPO/FCF/USP
Nº USP 2115003

ANEXO D – CURRÍCULO LATTES



Thamires Batello Freire

Bolsista de Mestrado do CNPq

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/045380433814719>

Última atualização do currículo em 13/03/2017

Possui graduação em Farmácia pela Universidade São Judas Tadeu (2011). Experiência profissional adquirida nas áreas: Hospitalar, Manipulação, Controle de Qualidade Físico-químico e Microbiológico, Pesquisa e Desenvolvimento, Licitações, Drogeria, Distribuidora de matérias-primas, medicamentos e materiais médico-hospitalares e docência em curso técnico. Atualmente mestranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, atuando na área de desenvolvimento e avaliação de eficácia de produtos cosméticos, com ênfase em nanocosméticos. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Thamires Batello Freire

Nome em citações bibliográficas

FREIRE, T. B.

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Avenida Professor Lineu Prestes
Butantã
05508000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913621

Formação acadêmica/titulação

2015

Mestrado em andamento em Fármacos e Medicamentos (Conceito CAPES 4).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil

13/03/2017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Thamires Batello Freire)

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão com cafeína com ação na

HDLG, Orientador:  Maria Valéria Robles Velasco.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

2008 - 2011

Graduação em Graduação.

Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.

Título: A atividade antifúngica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* frente à *Candida albicans*, utilizando como padrão o produto Malvona.

Orientador: Humberto Valvassori.

Formação Complementar

2013 - 2015

Inglês. (Carga horária: 185h).

Minds English School (SP), MINDS, Brasil.

2008 - 2010

Regime de Iniciação Científica.

Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.

2009 - 2009

Treinamento Teórico-prático sobre Técnicas de Aplicação de Injetáveis. (Carga horária: 8h).

Universidade São Judas Tadeu, USJT, Brasil.

Atuação Profissional

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional**2015 - Atual**

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estudante

Centro Universitário Senac, SENAC/SP, Brasil.

Vínculo institucional**2013 - 2013**

15/03/2017 - Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Thamires Batello Freire)

1Y3

13022017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Thamires Batello Freire)

2008 - 2009

Vínculo: Colaborador, Enquadramento Funcional: Auxiliar de farmácia, Carga horária: 48

Outras informações

Conhecimento da rotina hospitalar, medicamentos e materiais hospitalares

Farmácia de Manipulação Ultrafórmulas, FM, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 44

Farmácia de Manipulação Buenos Ayres, FM, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 40

FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO MATÉRIA PRIMA, MATÉRIA PRIMA, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2008

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Auxiliar de Manipulação, Carga horária: 44

Projetos de pesquisa

2015 - Atual

Desenvolvimento e avaliação da segurança e eficácia de nanoemulsão com cafeína com ação na HDL com ação anticelulítica.

Descrição: Projeto de mestrado..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico: (1) .

51Y3

13022017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Thamires Batello Freire)

Integrantes: Thamires Batello Freire - Integrante / maria valéria robles velasco - Coordenador.

2008 - 2010

Avaliação comparativa dos efeitos do Durateston (propionato de testosterona 30mg, fenilpropionato de testosterona 60mg, isocaproato de testosterona 60mg, caproato de testosterona 100mg) no miocárdio de ratos

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Alunos envolvidos: Graduação: (1) .

Integrantes: Thamires Batello Freire - Integrante / Francisco Benedito Kuchinski - Coordenador.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: cosmética.

2.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: nanotecnologia.

3.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Farmácia.

4.

Grande área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Saúde Pública.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Italiano

Compreende Razoavelmente, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

Português

Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Produções

Produção bibliográfica

Livros publicados/organizados ou edições

1.

★ APPAS, C. T. F. ; LADEIRA, A. D. S. ; **FREIRE, T. B.** ; LOPES, P. S. ; LETTE-SILVA, V. R. . *Cosmetic Formulation: principles and practice*; chapter: humectants and moisturizers. 1. ed. , 2017.

Textos em jornais de notícias/revistas

1.

DARIO, M. F. ; **FREIRE, T. B.** ; Forster, C. ; FUJII, L. S. ; SU, C. Y. ; SEMEDO, A. S. V. ; PINTO, C. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . *Mechanical Resistance and Combing of dyed hair exposed to UV Radiation*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 17 - 17, 30 set. 2016.

2.

FREIRE, T. B.; DARIO, M. F. ; PINTO, C. S. O. ; BABY, A. R. ; BOU-CHACRA, N. A. ; VELASCO, M. V. R. . *Anti-cellulite Action of Nanoemulsion with caffeine*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*.

3.

FREIRE, T. B.; SANTOS, I. M. N. S. R. ; DARIO, M. F. ; SARRUF, F. D. ; PINTO, C. S. O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . *Anti-cellulite Efficacy Evaluation of Trichilia catigua and Ptychopetalum olacoides Extracts*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 46 - 46.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1.

Nutracêuticos e Nutricosméticos - Inovações e Tendências (28/10/10). 2017. (Outra).

2.

EPIFAR.Apresentação das Linhas de Pesquisa do Laboratório de Cosmetologia. 2016. (Outra).

3.

Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2016. (Seminário).

4.

EPIFAR.Linhas de Pesquisa do Laboratório de Cosmetologia. 2015. (Outra).