

RICARDO FERREIRA NUNES

**NANOEMULSÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE
Eugenia dysenterica DC (MYRTACEAE): DESENVOLVIMENTO E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, PENETRAÇÃO CUTÂNEA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

RICARDO FERREIRA NUNES

NANOEMULSÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE
***Eugenia dysenterica* DC (MYRTACEAE): DESENVOLVIMENTO E**
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, PENETRAÇÃO CUTÂNEA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Brasília

2018

RICARDO FERREIRA NUNES

**NANOEMULSÕES CONTENDO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE
Eugenia dysenterica DC (MYRTACEAE): DESENVOLVIMENTO E
AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE, PENETRAÇÃO CUTÂNEA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 07/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso (presidente)

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães

Universidade de Brasília (UnB)

Prof. Dr. Luis Alexandre Muehlmann

Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico esta dissertação aos meus pais **Pedro dos Reis Nunes** e **Marcilene de Fátima Ferreira Nunes**, por todo amor e por nunca pouparem esforços para que eu pudesse ter a melhor educação possível, além do apoio e incentivo em todas as minhas decisões.*

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, meu refúgio e fortaleza, pelo dom supremo da vida e por seu imensurável amor que excede todo o entendimento. Obrigado por me abençoar e estar presente em cada etapa da minha vida.

A minha **família!** Aos meus pais, **Pedro dos Reis Nunes** e **Marcilene de Fátima Ferreira Nunes**, meu porto seguro, exemplos de determinação, força e honestidade, que nunca mediram esforços para que eu sempre tivesse as melhores condições de estudo. Sem vocês nada disso seria possível!!! Agradeço também a minha irmã **Daniela Ferreira Nunes**, que esteve sempre ao meu lado me apoiando e por me ouvir nos momentos de tensão.

Aos meus **familiares** por todo o incentivo, apoio e por compreenderem todos os meus momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Guilherme Martins Gelfuso**. Obrigado por ter me aceitado, sem ao menos me conhecer. Agradeço imensamente pela oportunidade de realizar mais uma etapa acadêmica, pela paciência, atenção e disponibilidade, além de todos os ensinamentos. A você o meu eterno *Obrigado!*

A toda a **família LTMAC!** A vocês que compartilharam comigo várias horas do dia, dentro e fora do ambiente laboratorial. Obrigado por se tornarem a minha família de Brasília! Em especial: **Camila Yumi, Felipe Pires, Geisa Barbalho, Giselly Almeida, Giulian Nepomuceno, Larissa Maria, Lorena Freitas, Ludmila Alvim, Maíra Nunes, Maíra Teixeira, Natane Duarte, Paula Martins, Tamara Ângelo** e **Thaiene Ávila**, agradeço pela amizade, carinho e por todos os ensinamentos e disponibilidade para me ajudar nos momentos em que eu mais necessitei.

Aos professores Dr. **Marcílio S. S. Cunha Filho** e Dra. **Taís Gratieri**, pelas valiosas contribuições e conhecimentos transmitidos.

A minha querida amiga **Wanessa de Sousa Cardoso Quintão**. Agradeço a Deus todos os dias por ter colocado você em meu caminho. Um ser iluminado que agregou somente coisas boas na minha vida! Obrigado pela amizade, pelos conselhos, pelas broncas, pelos momentos de descontração dentro e fora do laboratório, pela disponibilidade e por sempre me ajudar nos momentos em que eu mais precisei.

Ao **Breno Noronha Matos**, meu querido amigo! Obrigado por partilhar suas experiências e sempre me ajudar, além de todos os conselhos e ensinamentos.

A Profa. Dra. **Pérola Magalhães** e sua aluna de doutorado, **Sandra Márcia**, que me forneceram o extrato de cagaita. Obrigado pela amizade, experiência e conhecimentos transmitidos.

Ao Prof. Dr. **Paulo Souza** do Instituto de Física da UnB, por todo auxílio prestado durante os experimentos de atividade antioxidante por EPR. Obrigado por sempre estar disponível, pela paciência e pelos conhecimentos compartilhados.

A minha eterna orientadora, **Ana Paula Fonseca**, por sempre me incentivar a buscar o conhecimento. Agradeço por todo o carinho, conselhos e amizade, além de todos os ensinamentos e por acreditar em meu potencial... tenho certeza que grande parte do que eu sou hoje eu devo a você!

A **Helen Carla Vieira Caixeta**, obrigado por ter me apresentado a Universidade de Brasília e por todo o incentivo. Além de professora é uma grande amiga que, como você mesma diz, É PARA A VIDA! Obrigado pelo carinho e por sempre me ajudar em todos os momentos.

Agradeço também a três pessoas que foram fundamentais para a minha chegada em Brasília: **Zeni Bougleux**, **Telma** e **João Nunes**. Obrigado por me receberem em suas residências e por me ajudarem em todos os momentos.

As minhas queridas amigas (que considero como irmãs) de Minas Gerais, **Daiane Santos**, **Isadora Silveira** e **Poliana Pinheiro**. A vocês que mesmo estando distantes, sempre se fizeram presentes com uma mensagem ou uma ligação. Agradeço por me ouvirem e me aconselharem nos momentos difíceis e por sempre estarem presentes nas etapas mais importantes da minha vida.

Ao meu amigo **Douglas Brandão** pela convivência e amizade.

A **Universidade de Brasília** (UnB), por me proporcionar a realização deste trabalho, em especial aos funcionários da pós-graduação e do laboratório de ensino em Farmácia.

A **CAPES** e **CNPq** pelo apoio financeiro.

E por fim, deixo aqui os meus agradecimentos à todas as pessoas que, de alguma forma, puderam contribuir para a realização deste sonho. **A vitória é nossa!**

*“Uns são homens, alguns são professores, poucos são mestres.
Aos primeiros, escuta-se; Aos segundos, respeita-se; Aos terceiros, segue-se”.*

(Autor Desconhecido)

RESUMO

Eugenia dysenterica DC (cagaita) é uma planta pertencente à família Myrtaceae. O extrato (EXT) aquoso a partir das folhas possui como marcador a catequina, cujas propriedades antioxidantes sugerem seu uso em preparações dermatológicas. No entanto, ela possui baixa estabilidade e permeia de maneira limitada a pele. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver, caracterizar e avaliar nanoemulsões (NE) contendo EXT aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC. e catequina para serem empregadas como alternativas terapêuticas inovadoras para o retardamento do envelhecimento cutâneo com ação antioxidante. Um método analítico foi validado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação de catequina. Os estudos de compatibilidade térmica realizados evidenciaram que formulações produzidas com catequina, tensoativos (Labrasol® e Plurol® oleique) e óleo (oleato de etila) devem ser monitoradas, principalmente em processos que envolvam aquecimento. As NE O/A foram constituídas com Labrasol®/Plurol® oleique 4:1 (42%), oleato de etila (11%) e água Milli-Q (47%). A NE A/O foi composta por Plurol® oleique/Tween® 80 2:1 (40%), vaselina líquida (50%) e água Milli-Q (10%). Após sua caracterização, as NE O/A, NE O/A EXT e NE O/A CA apresentaram pH de 2,91, 3,76 e 2,92 e valor de potencial zeta de $-9,88 \pm 1,21$, $-11,2 \pm 0,63$ e $-9,7 \pm 1,19$, respectivamente. Com relação ao tamanho de gotícula, as NE O/A, NE O/A EXT e NE O/A CA possuíam o tamanho de $175,0 \pm 9,52$, $191,0 \pm 7,20$ e $208,8 \pm 3,15$ nm, respectivamente, enquanto que as NE A/O, NE A/O EXT e NE A/O CA tiveram o tamanho de $29,2 \pm 5,10$, $27,0 \pm 1,02$ e $34,6 \pm 3,72$ nm, respectivamente. Os estudos de estabilidade evidenciaram que as NE A/O EXT e NE A/O CA armazenadas em geladeira preservam o conteúdo de catequina devido a proteção fornecida pela formulação. Os ensaios de penetração cutânea *in vitro* foram realizados por períodos de 12 e 24 horas. Após 12 horas de ensaio, a catequina presente nas NE O/A EXT penetraram numa quantidade de: $0,75 \pm 0,23$ e $0,78 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no estrato córneo (EC) e pele viável, respectivamente, ao passo que as NE O/A CA penetraram numa quantidade de $0,36 \pm 0,11$ e $0,95 \pm 0,24$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no EC e pele viável. Para as NE A/O EXT e NE A/O CA, sua penetração cutânea foi de $1,57 \pm 0,12$ e $0,62 \pm 0,16$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ na pele total, respectivamente. Para as permeações de 24 horas, as NE O/A EXT penetraram numa quantidade de: $0,69 \pm 0,17$ e $2,27 \pm 0,41$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no EC e pele viável, respectivamente, ao passo que as NE O/A CA penetraram numa quantidade de $0,20 \pm 0,03$ e $3,84 \pm 0,68$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ no EC e pele viável, respectivamente. Para as NE A/O EXT e NE A/O CA, sua penetração cutânea foi de $1,41 \pm 0,18$ e $2,51 \pm 0,33$ $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ na pele total, respectivamente. Após os ensaios de penetração cutânea, foi possível observar que as NE são capazes de favorecer a penetração da catequina nas camadas mais profundas da pele. O estudo da atividade antioxidante mostrou que a quantidade de CA retida na pele irá proporcionar efeito antioxidante. E por fim, as NE foram classificadas como “irritante leve” após os ensaios de irritabilidade. Conclui-se que as NE com EXT aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC constituem uma alternativa promissora para administração tópica com atividade antioxidante.

Palavras-chave: Cagaita; Envelhecimento cutâneo; Extratos vegetais; Penetração cutânea; Nanoemulsões; Antioxidante.

ABSTRACT

Eugenia dysenterica DC (cagaita) is a plant belonging to Myrtaceae family. Aqueous extract (EXT) from their leaves has as a marker the catechin, whose antioxidant properties suggest its use in dermatological formulations. However, it has low stability and permeates the skin in a limited way. The present work had the objective of developing, characterizing and evaluating nanoemulsions (NE) containing aqueous EXT from the leaves of *E. dysenterica* DC. and catechin to be used as innovative therapeutic alternatives for the aging of the skin with antioxidant action. An analytical method was validated by high performance liquid chromatography (HPLC) for quantification of catechin. Thermal compatibility studies have shown that formulations produced with catechin, surfactants (Labrasol[®] and Plurol[®] oleique) and oil (ethyl oleate) should be monitored, especially in processes involving heating. NE O/W were composed of Labrasol[®]/Plurol[®] oleique 4: 1 (42%), ethyl oleate (11%) and Milli-Q water (47%). NE W/O was composed of Plurol[®] oleique/Tween[®] 80 2: 1 (40%), mineral oil (50%) and Milli-Q water (10%). After their characterization, NE O/W, NE O/W EXT and NE O/W CA had a pH of 2.91, 3.76 and 2.92 and a zeta potential value of -9.88 ± 1.21 , -11.2 ± 0.63 and -9.7 ± 1.19 , respectively. Regarding the droplet size, NE O/W, NE O/W EXT and NE O/W CA had the size of 175.0 ± 9.52 , 191.0 ± 7.20 and 208.8 ± 3.15 nm, respectively, whereas NE W/O, NE W/O EXT and NE W/O CA had a size of 29.2 ± 5.10 , 27.0 ± 1.02 and 34.6 ± 3.72 nm, respectively. Stability studies have shown that NE W/O EXT and NE W/O CA stored in a refrigerator preserves the catechin content because of the protection provided by the formulation. *In vitro* skin penetration assays were performed for periods of 12 and 24 hours. After 12 hours of testing, the catechin present in NE O/W EXT penetrated an amount of: 0.75 ± 0.23 and 0.78 ± 0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in the stratum corneum (EC) and viable skin respectively, while NE O/W CA penetrated an amount of 0.36 ± 0.11 and 0.95 ± 0.24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in EC and viable skin, respectively. For NE W/O EXT and NE W/O CA, their cutaneous penetration was 1.57 ± 0.12 and 0.62 ± 0.16 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in total skin, respectively. For the 24 hour permeations, NE O/W EXT penetrated in an amount of: 0.69 ± 0.17 and 2.27 ± 0.41 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in EC and viable skin, respectively, whereas NE O/W CA penetrated an amount of 0.20 ± 0.03 and 3.84 ± 0.68 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in EC and viable skin, respectively. For NE W/O EXT and NE W/O CA, their cutaneous penetration was 1.41 ± 0.18 and 2.51 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in total skin, respectively. After the skin penetration tests, it was possible to observe that the NEs are able to favor the penetration of the catechin in the deeper layers of the skin. The study of antioxidant activity showed that the amount of CA retained in the skin will provide antioxidant effect. And finally, NEs were classified as a "mild irritant" after the irritability tests. It is concluded that NE with aqueous EXT from *E. dysenterica* DC leaves are a promising alternative for topical administration with antioxidant activity.

Key-words: Cagaital Skin aging; Plant extracts; Skin penetration; Nanoemulsions; Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Espécime de *Eugenia dysenterica* DC (1) e suas flores (2) obtidas no campus Darcy Ribeiro – Universidade de Brasília. 4
- Figura 2.** Orientação das moléculas de tensoativo na interface óleo/água. O grupamento polar se orienta para a fase aquosa, enquanto que a cauda apolar se orienta para a fase orgânica. Adaptado de (44). 7
- Figura 3.** Representação esquemática de nanoemulsões do tipo A/O (1) e O/A (2). Adaptado de (44). 7
- Figura 4.** Métodos de formação de nanoemulsões que utilizam baixa energia de emulsificação. Adaptado de (53). 9
- Figura 5.** Esquema das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e anexos cutâneos (61). 12
- Figura 6.** Estrutura básica dos flavonoides. 17
- Figura 7.** Estrutura molecular da (+) catequina (PM: 290,3 g/mol). 18
- Figura 8.** Representação esquemática do desenho experimental realizado para avaliar a compatibilidade térmica da catequina com os excipientes. 29
- Figura 9.** Célula de difusão do tipo Franz montada com a pele de orelha de suíno separando o compartimento doador do receptor. 38
- Figura 10.** Esquema de obtenção do EC e epiderme por meio da técnica de tape stripping. Após o experimento de permeação (A) a pele é removida da célula e fixa em um suporte (B). O EC é retirado com o auxílio de 10 fitas por meio do tape stripping (C). O EC (D) e a pele remanescente (E) são picotadas e colocada em um frasco vidro âmbar para extração da catequina. 38
- Figura 11.** Casca do ovo removido para visualização da membrana cório-alantoide. 41
- Figura 12.** Espectro de absorção no UV/Vis de uma solução de catequina (25 µg/mL) em metanol. Faixa de varredura: 200 à 800 nm. 44
- Figura 13.** Cromatograma referente à injeção de uma solução de catequina em metanol (A) e em tampão fosfato pH 3,00 (B). 47
- Figura 14.** Representação gráfica da curva analítica obtida por CLAE para as soluções de catequina em metanol (A) e em tampão fosfato pH 3,00 (B) na faixa de concentração entre 0,5 à 10,0 µg/mL. Equação da reta para o gráfico (A): $y = 21149x + 948,93$, $r^2 = 0,9999$. Equação da reta para o gráfico (B): $y = 20906x + 454,01$, $r^2 = 1,0$ 48
- Figura 15.** Cromatograma referente à injeção de uma solução de catequina em metanol (A) e tampão fosfato pH 3,00 (B) contaminada com extrato de pele de orelha de porco e extrato córneo (EC), juntamente com óleos (vaselina líquida e oleato de etila) e tensoativos (Labrasol[®], Plurol[®] oleique CC 497 e Tween[®] 80) presentes nas NE. 49
- Figura 16.** Cromatograma referente à injeção de uma solução de catequina em metanol (A) e em tampão fosfato pH 3,00 (B) contaminadas com extrato

aquoso das folhas de <i>E. dysenterica</i> DC e produtos de degradação do extrato e catequina.....	50
Figura 17. Estabilidade da catequina (5 µg/mL) em metanol armazenada em temperatura ambiente (25°C) na presença de interferentes. n=3.....	54
Figura 18. Estabilidade da catequina (5 µg/mL) em metanol armazenada em geladeira (4°C) na presença de interferentes. n=3.	55
Figura 19. Parcelas de superfície de contorno da área do pico da catequina (A) e tempo de retenção (B) no ensaio de robustez juntamente com equações preditivas, r^2 e precisão adequada para cada resposta. As áreas escuras mostram regiões com menos mudanças nessas respostas.	57
Figura 20. Curva de DSC da catequina e misturas físicas. O pico de fusão do fármaco é indicada pela linha tracejada e o evento térmico ocorrido é exibido em ampliação.	59
Figura 21. Estruturas químicas dos espectros de catequina e FTIR de misturas selecionadas antes (A) e depois (B) do tratamento térmico. As mudanças nos espectros são sombreadas e numeradas de acordo com os grupos funcionais da catequina. LB: Labrasol®; PL: Plurol® oleique; EO: Oleato de etila.	62
Figura 22. Microscopia óptica das misturas de catequina com os excipientes de acordo com o design da mistura centroide. LB: Labrasol®; PL: Plurol® oleique; EO: Oleato de etila.	63
Figura 23. Superfícies de resposta para as variações no pico de fusão da catequina e na temperatura inicial de decomposição da amostra. As áreas escuras mostram regiões com maiores variações. LB: Labrasol®; PL: Plurol® oleique; EO: Oleato de etila.	65
Figura 24. Diagramas de fases pseudoternários obtidos após a titulação de diferentes fases oleosas e tensoativos para o desenvolvimento de NE O/A (A) e A/O (B).	69
Figura 25. Aspecto macroscópico das formulações NE O/A (1) e NE A/O (2) sem extrato.....	70
Figura 26. Aspecto macroscópico das formulações após a incorporação do extrato aquoso das folhas de <i>E. dysenterica</i> DC e catequina. 1 (NE O/A EXT); 2 (NE O/A CA); 3 (NE A/O EXT); 4 (NE A/O CA).....	71
Figura 27. Fotografia das NE O/A, O/A EXT e O/A CA armazenadas em temperatura ambiente durante 90 dias. Observa-se uma alteração de cor das NE O/A EXT após 60 dias de armazenamento.....	75
Figura 28. Fotografia das NE A/O, A/O EXT e A/O CA armazenadas em temperatura ambiente durante 90 dias.	76
Figura 29. Fotografia dos controles O/A EXT, controle O/A CA, controle A/O EXT e controle A/O CA armazenadas em temperatura ambiente durante 90 dias.....	77
Figura 30. Valores de pH das NE O/A (EXT e catequina) e controles armazenados em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias.....	79
Figura 31. Tamanho de gotícula e PDI das NE O/A (EXT e catequina) armazenados em temperatura ambiente por 90 dias.....	81

Figura 32. Tamanho de gotícula e PDI das NE O/A (EXT e catequina) armazenados em geladeira por 90 dias.....	82
Figura 33. Tamanho de gotícula e PDI das NE A/O (EXT e catequina) armazenados em temperatura ambiente por 90 dias.....	83
Figura 34. Tamanho de gotícula e PDI das NE A/O (EXT e catequina) armazenados em geladeira por 90 dias.....	84
Figura 35. Teor de catequina (%) obtido para as NE O/A (EXT e catequina) e seus respectivos controles armazenados em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias.....	85
Figura 36. Teor de catequina (%) obtido para as NE A/O (EXT e catequina) e seus respectivos controles armazenados em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias.....	87
Figura 37. CA recuperada do EC e pele remanescente após (A) 12 horas ou (B) 24 horas de tratamento com as NE O/A e seus respectivos controles (solução aquosa do extrato ou catequina). O símbolo (*) representa as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A barras representam o desvio padrão de 6 determinações.	89
Figura 38. CA recuperada da pele total após (A) 12 horas ou (B) 24 horas de tratamento com as NE A/O e seus respectivos controles (solução aquosa do extrato ou da catequina). O símbolo (*) representa as diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). A barras representam o desvio padrão de 6 determinações.....	91
Figura 39. Relação entre o campo de modulação (G) e a dupla integração (u.a) do sinal do EPR. Observa-se que o aumento do campo de modulação (G) é proporcional ao valor da dupla integração (u.a). Assim, a utilização deste recurso é capaz de melhorar a sensibilidade dos espectros coletados.....	94
Figura 40. Porcentagem de decaimento do radical livre DPPD em diferentes massas (0,9 – 5,4 µg) após 60 minutos de reação. Média de 3 determinações.	94
Figura 41. Imagem do índice de irritabilidade das NE e controles durante 20 segundos, 2 e 5 minutos após a aplicação das amostras.....	96
Figura 42. Classificação final das NE quanto ao potencial de irritabilidade por meio do ensaio HET-CAM.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho fatorial (2^3) utilizado para avaliação da robustez do método analítico.....	28
Tabela 2. Composição das misturas estudadas de acordo com o desenho experimental.....	29
Tabela 3. Características para a amostra de referência (padrão) e defeitos aceitáveis e sérios para as características organolépticas das amostras.....	35
Tabela 4. Misturas reacionais para o ensaio de atividade antioxidante das nanoemulsões com extrato de <i>E. dysenterica</i> DC, catequina e controles.....	40
Tabela 5. Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM.....	42
Tabela 6. Otimização das condições cromatográficas para quantificação de catequina em extrato aquoso das folhas de <i>E. dysenterica</i> DC considerando diferentes interferências. O método que realizou a separação dos picos de forma eficiente encontra-se destacado em negrito. Tempo de retenção (TR); Volume de injeção (VI); Pratos teóricos (PT); Fator de cauda (FC).....	45
Tabela 7. Resultados da seletividade referentes à média das concentrações mensuradas para as soluções metanólicas e em tampão fosfato pH 3,00 de catequina à 5,0 µg/mL e das soluções nas mesmas concentrações em presença dos interferentes.....	51
Tabela 8. Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de catequina em metanol.....	52
Tabela 9. Valores de precisão e exatidão do método analítico para quantificação de catequina em tampão fosfato pH 3,00.....	52
Tabela 10. Porcentagem de recuperação da catequina utilizando tampão pH 3,00 como solvente extrator.....	53
Tabela 11. Dados encontrados para os LD e LQ teóricos encontrados para o método de quantificação da catequina em metanol e tampão fosfato pH 3,00.....	53
Tabela 12. Dados termogravimétricos da catequina, excipientes e suas misturas. A temperatura inicial de decomposição das amostras é sombreada e em negrito quando ocorreu uma antecipação desse evento. PM: perda de massa.....	60
Tabela 13. Coeficiente de correlação dos espectros antes e após o tratamento térmico da catequina, excipientes e suas misturas.....	61
Tabela 14. Modelo de montagem, valor de P, Precisão adequada, coeficiente de regressão (R^2) e equação preditiva para cada resposta do projeto da mistura. LB: Labrasol®; PL: Plurol® oleique; EO: Oleato de etila.....	64
Tabela 15. Composição das formulações O/A e A/O desenvolvidas e selecionadas para estudo.....	70
Tabela 16. Determinação dos valores de pH para as formulações O/A.....	71

Tabela 17. Caracterização das NE O/A e A/O quanto ao Tamanho do gotícula (nm), Potencial zeta (-mV) e PDI. (-) não determinado.....	72
Tabela 18. Determinação da concentração de CA presente nas NE O/A e NE A/O (EXT e catequina).	74
Tabela 19. Quantidade de catequina penetrada após 24 horas de experimento na pele total para as NE O/A e NE A/O (com extrato e catequina).....	92

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Características organolépticas da NE O/A armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado). 111
- Quadro 2.** Características organolépticas da NE O/A EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado)..... 111
- Quadro 3.** Características organolépticas da NE O/A CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado)..... 112
- Quadro 4.** Características organolépticas da NE A/O armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado). 112
- Quadro 5.** Características organolépticas da NE A/O EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado)..... 113
- Quadro 6.** Características organolépticas da NE A/O CA armazenados em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado)..... 113
- Quadro 7.** Características organolépticas do controle O/A EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); TR (Turvo); MA (Marrom); ME (Marrom escuro); C (Característico); LM (Levemente modificado); M (Modificado). 114
- Quadro 8.** Características organolépticas do controle O/A CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); AC (Amarelo claro); A (Amarelo); AE (Amarelo escuro); C (Característico)..... 114
- Quadro 9.** Características organolépticas do controle A/O EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. Legenda: HG (Homogêneo); T (Translúcido); TR (Turvo); MA (Marrom); MC (Marrom claro); ME (Marrom escuro); C (Característico); LM (Levemente modificado); M (Modificado)..... 115
- Quadro 10.** Características organolépticas do controle A/O CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); IN (Incolor); AC (Amarelo claro); A (Amarelo); C (Característico). 115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
A/O/A	Água em óleo em água
CA	Catequina
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CV%	Coefficiente de variação
DSC	Calorimetria de Varredura Diferencial
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTA	Análise térmica diferencial
EC	Estrato córneo
EI	Emulsificação espontânea
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EPR	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica
EXT	Extrato de <i>E. dysenterica</i> DC
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test on the Chorioallantoic Membrane</i>
ICH	<i>Internacional Conference of Harmonisation</i>
IFT	Inversão de fase por temperatura
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NE	Nanoemulsão
nm	Nanômetro
O/A	Óleo em água
O/A/O	Óleo em água em óleo
OE	Óxido de etileno
PDI	Índice de polidispersão
TGA	Análise de termogravimetria
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 PANORAMA GERAL	1
1.2 <i>Eugenia dysenterica</i> DC (CAGAITA)	3
1.3 SISTEMAS NANOEMULSIONADOS.....	6
1.4 ESTRUTURA DA PELE E A PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE SUBSTÂNCIAS.....	11
1.5 FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	15
1.5.1 Catequinas	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3. MÉTODOS	21
3.1 MATERIAL	21
3.2 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA NO EXTRATO AQUOSO, EM FORMULAÇÕES CONTENDO <i>Eugenia</i> <i>dysenterica</i> DC (CAGAITA) E NA PELE.....	22
3.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	22
3.3.1 Linearidade	23
3.3.2 Seletividade/especificidade	23
3.3.3 Precisão	24
3.3.4 Exatidão	25
3.3.5 Limite de detecção e Limite de quantificação	26
3.3.6 Robustez	27
3.4 ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A CATEQUINA E OUTROS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO	28
3.4.1 Desenho das misturas experimentais	28
3.4.2 Análise térmica	29
3.4.3 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	30
3.4.4 Análises morfológicas	31
3.5 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES	31
3.5.1 Construção dos diagramas de fases pseudoternários	31

3.5.2 Seleção das formulações	32
3.5.3 Incorporação do extrato de <i>Eugenia dysenterica</i> DC e catequina nas formulações	32
3.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DESENVOLVIDAS.....	33
3.6.1 Mensuração do pH	33
3.6.2 Potencial zeta	34
3.6.3 Tamanho de gotícula e Índice de polidispersão	34
3.6.4 Teor de Catequina	34
3.7 ESTUDO DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES	34
3.7.1 Caracterização da amostra de referência	35
3.7.2 Avaliação macroscópica	36
3.7.3 Teste de centrifugação	36
3.7.4 Estudos de estabilidade	36
3.8 ESTUDO DE PERMEAÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i> DE CATEQUINA A PARTIR DAS NANOEMULSÕES DESENVOLVIDAS.....	37
3.9 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DAS FORMULAÇÕES	39
3.10 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO POTENCIAL IRRITATIVO DAS NANOEMULSÕES (HET-CAM).....	40
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE CATEQUINA NO EXTRATO AQUOSO, EM FORMULAÇÕES CONTENDO <i>Eugenia dysenterica</i> DC (CAGAITA) E NA PELE.....	43
4.1.1 Linearidade	47
4.1.2 Seletividade/especificidade	48
4.1.3 Precisão	51
4.1.4 Exatidão	52
4.1.5 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	53
4.1.6 Robustez	54
4.2 ESTUDO DA COMPATIBILIDADE QUÍMICA ENTRE A CATEQUINA E OS OUTROS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO	57
4.2.1 Caracterização térmica	58
4.2.2 Caracterização molecular e morfológica	60
4.2.3 Desenho experimental	63

4.3 DESENVOLVIMENTO DAS NANOEMULSÕES	66
4.3.1 Construção dos diagramas de fases pseudoternários	68
4.3.2 Seleção das nanoemulsões a partir dos diagramas de fases pseudoternários	70
4.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES DESENVOLVIDAS	71
4.4.1 Mensuração do pH	71
4.4.2 Tamanho de gotícula, Potencial zeta e Índice de polidispersão	72
4.4.3 Concentração de catequina nas nanoemulsões	73
4.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE DAS NANOEMULSÕES E CONTROLES	74
4.5.1 Avaliação das características organolépticas	74
4.5.2 Mensuração dos valores de pH	78
4.5.3 Tamanho de gotícula e PDI	80
4.5.4 Teor de catequina	85
4.6 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> DE PENETRAÇÃO CUTÂNEA	88
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS FORMULAÇÕES	92
4.8 ENSAIO DE IRRITABILIDADE DAS NANOEMULSÕES	95
5. CONCLUSÕES	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 PANORAMA GERAL

A espécie *Eugenia dysenterica* DC pertence à família Myrtaceae e é popularmente conhecida como cagaiteira ou cagaita (1). Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina popular para tratamento de diabetes, icterícia e como antidiarreico (2). A espécie a ser estudada apresenta grande potencial antioxidante para ser incorporada em preparações cosméticas, devido à presença de catequina, taninos, flavonoides, terpenos e saponinas (3,4). Sabe-se que essas substâncias possuem propriedades antioxidante, de proteção contra raios UV, anti-inflamatória e anticarcinogênica (5–7).

A aplicação *in vivo*, no entanto, desses potenciais princípios ativos requer a sua incorporação em formas farmacêuticas que tornem possível: (I) a estabilização dessas substâncias, garantindo a eficácia e segurança do tratamento proposto; (II) a facilitação de sua aplicação por meio da via de administração tópica; e (III) promover e assegurar uma biodisponibilidade cutânea adequada dos princípios ativos, garantindo sua correta penetração em quantidades dentro da faixa terapêutica, assegurando assim sua efetividade.

Nesse sentido, o presente estudo buscou na nanotecnologia ferramentas para desenvolver formulações que poderão dar origem a produtos farmacêuticos inovadores e de alto desempenho, com viabilidade de aplicação garantida. Buscou-se, assim, a obtenção de um novo produto, com valor tecnológico agregado e com princípios ativos de origem natural e genuinamente brasileiro.

A nanotecnologia é uma área de pesquisa e desenvolvimento muito ampla e interdisciplinar, que se baseia nos mais diversificados tipos de materiais (polímeros, metais semicondutores, biomateriais), estruturados em escala nanométrica, de modo a formar sistemas com características especiais, frutos dessa nanoestruturação (8–10). Na área farmacêutica, esses nanomateriais estão sendo incorporados no desenvolvimento de novos veículos para a liberação de fármacos, agentes de contraste e testes para

diagnóstico, sendo que alguns já estão submetidos a ensaios clínicos ou já são aprovados para o uso humano pelo *Food and Drug Administration* (FDA) (10).

Os sistemas nanoestruturados têm demonstrado diversas vantagens biofarmacêuticas, como aumento de estabilidade de biomoléculas, possibilidade de se obter uma liberação direcionada (sítio-específica) ao seu alvo de ação, possibilidade de controle/sustentação da liberação dessas moléculas, de modo a reduzir o número de doses de medicamento que deve ser administrada ao paciente, aumento da penetração nas camadas mais profundas da pele, entre outras. Essas características fazem da nanotecnologia uma ferramenta bastante promissora no desenvolvimento de medicamentos inovadores. Os principais nanocompostos utilizados no campo farmacêutico são: dendrímeros, nanotubos de carbono, lipossomas, nanoemulsões (NE) e nanopartículas poliméricas, magnéticas, metálicas ou lipídicas.

Neste projeto foi proposto o desenvolvimento de formulações do tipo NE para veiculação do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC e catequina, visando a aplicação cosmética com ação antioxidante.

NE são sistemas homogêneos, isotrópicos, líquidos e transparentes, constituídos por uma fase aquosa e uma fase oleosa, estabilizadas sob a forma de gotículas de dimensões nanométricas com o auxílio de proporções definidas de um sistema tensoativo (11). As NE apresentam várias vantagens com respeito à facilidade de preparação, alta estabilidade e limpidez (11,12). Quando aplicadas topicamente, as NE têm mostrado atuar como promotores de permeação cutânea de fármacos, ou seja, são capazes de aumentar a quantidade de fármacos liberados no interior da pele, já que o estrato córneo (EC) funciona como uma eficiente barreira para a entrada de qualquer substância exógena no tecido cutâneo.

Formulações para administração tópica de fármacos vêm despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores e das indústrias farmacêuticas, devido às diversas vantagens que o emprego dessa via de administração possui, como uso de menores concentrações de fármacos e biofármacos, menor custo e, principalmente, ausência de efeitos colaterais sistêmicos (13). As NE já se mostraram sistemas eficientes para veiculação de extratos vegetais para uso tópico (14).

1.2 *Eugenia dysenterica* DC (CAGAITA)

Desde os primórdios, a busca constante para prevenir ou tratar as doenças sempre se fez presente. Os seres humanos buscaram encontrar na natureza algo que fosse capaz de realizar tais feitos. A utilização de plantas como tratamento remonta a séculos e, com o passar do tempo, foram descobertas novas formas para o uso dessas plantas. Inicialmente todos os tratamentos eram realizados de forma empírica, ou seja, não se conhecia os efeitos promovidos para determinadas plantas medicinais. Consequentemente, conforme as civilizações foram consolidando-se e expandindo-se, a visão empírica passou a ser explicada segundo evidências científicas (15–19).

Diversas plantas são utilizadas pela medicina tradicional para o tratamento ou cura de doenças. Nesse segmento, a família Myrtaceae se destaca por possuir cerca de 132 gêneros e mais de 5.600 espécies (20). A sua distribuição geográfica ocorre principalmente nas zonas tropicais e subtropicais (21). No Brasil ela está representada por cerca de 24 gêneros e 927 espécies (22).

Dentro desta família, destaca-se o gênero *Eugenia*, que compreende cerca de 1.009 espécies (23) e também é um dos maiores e mais importantes gêneros da família Myrtaceae (24,25). Distribui-se desde o Brasil até o norte e nordeste da Argentina, Uruguai e Paraguai (26). Estimam-se cerca de 350 espécies desse gênero no Brasil (27).

Muitas espécies do gênero *Eugenia* produzem frutos que são consumidas pela fauna silvestre e também pelo homem (25), como por exemplo, a *Eugenia uniflora* L. (pitanga), *Eugenia dysenterica* DC (cagaita) e *Eugenia involucrata* DC (cereja do mato) (26). Além disso, esse gênero encontra-se como um dos representantes mais significativos da família Myrtaceae, com espécies de alto valor comercial, nutritivo e potencial de aproveitamento no desenvolvimento de novos fármacos (21).

A espécie *Eugenia dysenterica* DC (Figura 1) (sinonímias botânicas: *Stenocalyx dysenterica*; *Stenocalyx dysentericus* - Mart. Ex DC.; Berg; *Myrtus dysenterica* Mart) (1,28,29) é popularmente conhecida como “cagaita” ou “cagaiteira” devido à ação laxativa de seus frutos, conforme relatos fornecidos

pela medicina tradicional (2,30–32). Popularmente, as folhas de *E. dysenterica* DC possuem propriedades antidiarreicas (33,34) e também são eficazes na cicatrização de feridas e no tratamento de diabetes e icterícia (2). Os frutos obtidos desta espécie são detentores da atividade laxativa (1,35,36).



Figura 1. Espécime de *Eugenia dysenterica* DC (1) e suas flores (2) obtidas no campus Darcy Ribeiro – Universidade de Brasília.

Vários compostos químicos obtidos a partir de extratos (EXT) de *E. dysenterica* DC foram isolados e identificados. Entre os metabólitos secundários encontrados no EXT etanólico das folhas, destacam-se taninos, flavonoides, terpenos e saponinas (3). No EXT aquoso das folhas, foram isolados vários compostos fenólicos, como taninos condensados, catequina e procianidinas (37,38). As catequinas encontram-se como componentes majoritários (47,51 mg/g) no EXT seco obtido a partir da infusão das folhas (38). O ácido elágico (38,39) e procianidina B1 (37) também foram identificados.

A polpa de *E. dysenterica* DC foi avaliada quanto a sua atividade laxativa. Os resultados evidenciaram que a polpa foi capaz de estimular a motilidade intestinal em ratos cerca de 20,8% quando comparado ao grupo controle (36). Além disso, a polpa mostrou-se atóxica quando foi realizada a análise histopatológica dos tecidos dos animais. Os autores concluíram que os

peptídeos que estão presentes na polpa de *E. dysenterica* DC representam uma nova fonte de compostos bioativos para a indústria farmacêutica, pois isso pode possibilitar o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de constipação crônica e síndrome do cólon irritável (36).

A atividade antidiarreica também foi avaliada a partir do óleo essencial obtido das folhas de *E. dysenterica* DC. O óleo foi caracterizado quimicamente, e dentre os compostos majoritários encontrou-se o *cis*- β -ocimeno, (*E*)-cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, linalol e *trans*- β -ocimeno. Essas substâncias parecem ser responsáveis pela atividade antidiarreica e que atuam por meio de dois mecanismos: (I) inibição da secreção intestinal ou (II) aumento da absorção de fluidos pela mucosa intestinal (33).

Alguns estudos fitoquímicos e biológicos com a espécie *E. dysenterica* DC estão relatados na literatura. O óleo essencial obtido a partir das folhas foi capaz de inibir o crescimento de espécies do gênero *Candida sp* e *Cryptococcus neoformans* isolados a partir de pacientes infectados com o vírus HIV (35). O EXT etanólico seco a partir das folhas mostrou atividade frente ao rotavírus SA11, que é responsável por provocar diarreia em recém nascidos e crianças jovens. Esse EXT apresentou toxicidade na concentração de 5000 $\mu\text{g/mL}$ e citotoxicidade na concentração máxima de 50 $\mu\text{g/mL}$. Os autores concluíram que a presença de taninos, flavonoides, saponinas, cumarinas e terpenos podem ser responsáveis por essa atividade antiviral (3).

A atividade antifúngica frente a várias espécies de *Candida* também foi demonstrada a partir do EXT aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC por meio da técnica de difusão em disco. Foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente a diferentes cepas e o EXT mostrou forte atividade contra as espécies *C. tropicalis* (CIM: 125 $\mu\text{g/disco}$), *C. formata* (CIM: 125 $\mu\text{g/disco}$), *C. krusei* (CIM: 250 $\mu\text{g/disco}$), *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* com CIM de 500 $\mu\text{g/disco}$ (40).

Sabe-se que as plantas produzem diversos metabólitos vegetais, seja para o seu desenvolvimento ou como proteção frente a fatores ambientais. Os compostos fenólicos estão entre esses metabólitos que têm mostrado alta atividade antioxidante (36,41,42). A infusão das folhas foi avaliada quanto a

sua atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres utilizando o reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e também foi determinado o conteúdo de fenólicos totais pelo método de Folin–Ciocalteu (43). A infusão das folhas de *E. dysenterica* DC apresentou IC₅₀ de 6,83 µg/mL; índice de atividade antioxidante de 4,52 ± 0,37 e conteúdo de fenólicos totais equivalentes em ácido gálico de 412,1 ± 17,2 mg/g de EXT seco. Os autores certificam que a atividade antioxidante está diretamente ligada à grande quantidade de compostos fenólicos encontrada nas folhas (43).

Assim, como já foram evidenciadas várias atividades biológicas dos compostos presentes na espécie *E. dysenterica* DC, faz-se necessário o desenvolvimento de uma forma farmacêutica que seja efetiva, segura e estável por longos períodos de tempo para incorporar essas substâncias e facilitar a administração do produto. Aliado ao desenvolvimento de medicamentos, a nanotecnologia cada vez se faz mais presente devido às características peculiares e inovadoras do produto farmacêutico final. Nesse conceito, tornou-se uma alternativa interessante para a incorporação do EXT de *E. dysenterica* DC para melhorar a estabilidade dos ativos presentes no extrato, facilitar a administração pela via tópica e garantir a sua penetração nos tecidos mais profundos da pele.

1.3 SISTEMAS NANOEMULSIONADOS

Sistemas nano ou microemulsionados compreendem dispersões coloidais metaestáveis caracterizado pela dispersão de dois líquidos imiscíveis entre si, geralmente água e óleo, em que essa mistura é estabilizada por um agente tensoativo. O agente tensoativo irá atuar na interface óleo/água reduzindo a tensão interfacial entre esses líquidos. Tensoativos são moléculas anfifílicas que possuem uma cauda apolar que se orienta para a fase orgânica e uma cabeça polar voltada para a fase aquosa (Figura 2) (44).

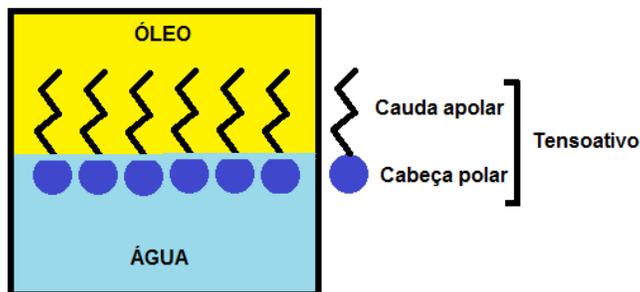


Figura 2. Orientação das moléculas de tensoativo na interface óleo/água. O grupamento polar se orienta para a fase aquosa, enquanto que a cauda apolar se orienta para a fase orgânica. Adaptado de (44).

Uma NE é um sistema cineticamente estável, isotrópico, transparente e/ou translúcido, formado pela dispersão de água e óleo e estabilizado pela presença de um filme de moléculas de tensoativo, geralmente associado a um co-tensoativo, que estão localizados na interface óleo/água (45,46).

Em geral, as NE possuem tamanho de gotículas compreendido entre 20 e 500 nm (47). Devido à esse pequeno tamanho, as NE possuem gotículas menores que o comprimento de onda que a luz visível, e por isso, são sistemas transparentes e não podem ser visualizadas em microscópios ópticos (48). Além disso, as NE podem ser classificadas como: O/A, quando as gotículas de óleo estão dispersas em uma fase aquosa contínua; A/O, quando gotículas de água encontram-se dispersas em uma fase oleosa contínua (Figura 3); e ainda, existem NE múltiplas do tipo O/A/O ou A/O/A (44).

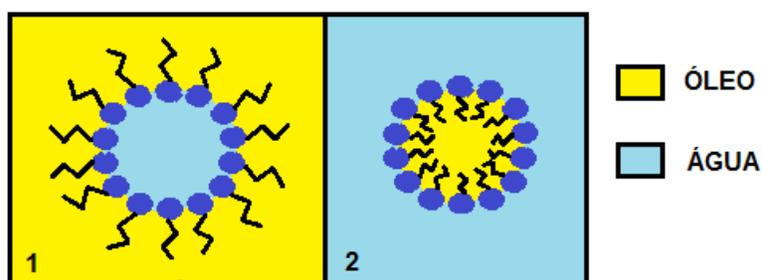


Figura 3. Representação esquemática de nanoemulsões do tipo A/O (1) e O/A (2). Adaptado de (44).

Para o preparo de NE, pode-se utilizar dois tipos distintos de métodos: os de alta e os de baixa energia de emulsificação. Os de alta energia necessitam da utilização de equipamentos mecânicos que produzem intensas perturbações físicas, como por exemplo, agitadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e geradores de ultrassom. Quanto maior a força utilizada durante o preparo, menor será o tamanho de gotícula (49).

A emulsificação ultrassônica é muito eficiente na redução do tamanho das gotículas. Nesta técnica, a energia é fornecida por meio de sonotrodos denominados de sondas sonicadoras. Elas contêm um cristal de quartzo piezelétrico que pode expandir e contrair em resposta à tensão elétrica alternada. À medida que a ponta do sonicador entra em contato com o líquido, ele produz vibração mecânica e ocorre cavitação. Cavitação é a formação e o colapso das cavidades de vapor em líquido. Assim, o ultrassom pode ser usado diretamente para produzir uma NE; é usado principalmente em laboratórios onde pode ser obtido um tamanho de gotícula tão baixo quanto 200 nm (47).

A microfluidização é uma tecnologia de mistura patenteada, que utiliza um dispositivo chamado microfluidizador. Este dispositivo usa alta pressão que força o produto através de uma câmara de interação, resultando na formação de gotículas muito pequenas. O processo é repetido várias vezes para se obter um tamanho de gotícula desejado e produzir uma NE mais uniforme (47).

Em contraste a este fato, os métodos que utilizam baixas energias de emulsificação (fazendo o uso da energia química do sistema), podem ser mais energeticamente eficientes pela simples agitação dos componentes da formulação (50). Ainda, os métodos de baixa energia de emulsificação pode ser subdividido em emulsificação espontânea (EI) ou inversão de fase por temperatura (IFT). O primeiro envolve a mistura do agente tensoativo lipofílico com a fase oleosa do sistema; o tensoativo hidrofílico com a fase aquosa do sistema até a sua completa dispersão. Na sequência, a fase orgânica é adicionada a fase aquosa sob agitação magnética e a NE é formada (51,52).

A IFT pode ocorrer de duas maneiras: (1) inversão de transição induzida por mudanças que afetam o equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL),

temperatura ou concentração de eletrólitos e (2) inversão catastrófica, que é induzida pelo aumento do volume da fase dispersa (52). Para a aplicação do princípio de IFT, usa-se o método de inversão de transição demonstrado por Shinoda e colaboradores quando eles utilizaram tensoativos não-iônicos do tipo etoxilato. Estes tensoativos são altamente dependentes da temperatura, tornando-se lipofílico com o aumento da temperatura devido à desidratação da cadeia de óxido de polietileno. Com o arrefecimento do sistema, a NE que era do tipo A/O torna-se O/A, pois os grupamentos de óxido de etileno estão agora mais orientados para a fase externa hidrofílica (12,52).

A formação desses sistemas que utilizam baixa energia de emulsificação pode ser observada na Figura 4.

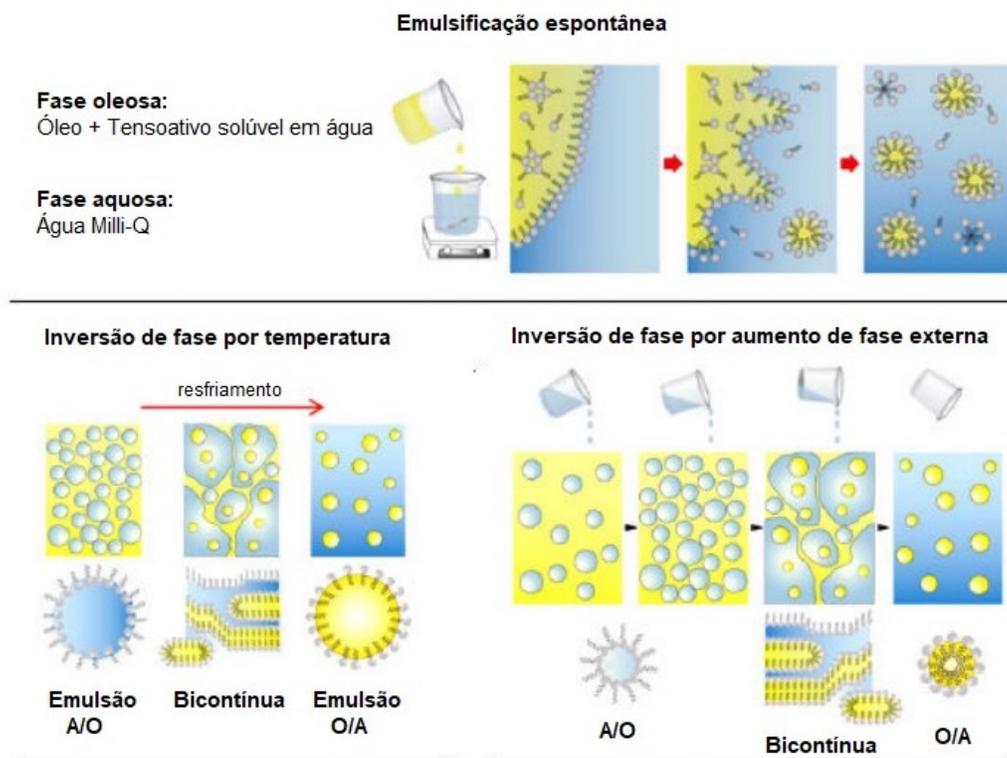


Figura 4. Métodos de formação de nanoemulsões que utilizam baixa energia de emulsificação. Adaptado de (53).

Dependendo do sistema e composição, vários tamanhos de gotículas podem ser alcançados para ambos os tipos de métodos que

envolvam alta ou baixas energias de emulsificação (50). O tipo de NE formada também depende das propriedades físicas e químicas do tensoativo, traduzidas pelo seu EHL (54,55).

O EHL é uma escala de valores que foi introduzida para classificar os tensoativos não-iônicos conforme o tamanho de sua cadeia polar. Valores compreendidos entre 0 a 10 indicam a predominância da parte apolar da estrutura do tensoativo, sendo seu uso mais empregado para produzir NE do tipo A/O; enquanto valores superiores a 10 caracterizam a predominância da parte polar da molécula e são mais utilizadas para desenvolver NE do tipo O/A (56). Entretanto, a capacidade de formação de NE não depende somente do EHL, mas também por outros fatores como temperatura do meio, força iônica e a presença de co-tensoativo. A adição de um co-tensoativo proporciona uma condição de solubilização máxima do óleo em água (45).

As NE possuem excelente capacidade para solubilizar substâncias e, atualmente, elas têm sido utilizadas para aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade de vários fármacos, seja para administração oral, tópica, injetável, nasal ou ocular, pois elas permitem a veiculação de vários componentes na fase oleosa (baixa constante dielétrica), aquosa (alta constante dielétrica) ou mesmo na interface óleo/água (alta constante dielétrica) (55–57).

Dentre as potenciais vantagens deste tipo de sistema, pode-se destacar (47):

- Melhora da biodisponibilidade do fármaco;
- É não tóxico e de natureza não irritante;
- Devido ao pequeno tamanho de gotícula, sua superfície de contato é maior, levando a uma melhor penetração do fármaco;
- Pode ser formulado em diversas formas, tais como espumas e *sprays*;
- Fornece melhor absorção de fármacos solúveis na fase oleosa em tecnologia de culturas celulares;
- Pode incorporar fármacos hidrofílicos e lipofílicos em uma mesma formulação;

- É eficiente para mascarar sabores desagradáveis quando administradas pela via oral;
- Pode ser administrada por via inalatória, ocular, endovenosa (apenas NE do tipo O/A), oral, nasal, auricular, retal e tópica.

Como pode ser observado, várias são as vantagens deste tipo de sistema. A literatura científica relata que muitas NE já foram desenvolvidas e utilizadas principalmente para incorporar fármacos que são administrados por via tópica. Isso se deve ao fato do baixo tamanho de gotícula e da melhor estabilidade e penetrabilidade do fármaco nas camadas da pele proporcionada por este sistema.

1.4 ESTRUTURA DA PELE E A PERMEAÇÃO CUTÂNEA DE SUBSTÂNCIAS

A pele, o maior órgão do corpo humano, possui uma superfície de aproximadamente 2.500 cm² em um recém-nascido e 18.000 cm² em um adulto, podendo pesar até 4,8 kg (58). Sua principal função é isolar o meio interno do ambiente externo. Além disso, outras funções podem ser destacadas, como: regulação da temperatura corporal; proteção contra a contaminação microbiana, substâncias químicas e outros agentes; proteção do organismo contra a radiação ultravioleta (UV); auxílio na excreção de substâncias tóxicas; redução da perda de água; e por fim, possui a capacidade de receber estímulos como tato, dor, calor e pressão (59,60).

Estruturalmente, a pele é constituída por três camadas altamente especializadas e heterogêneas, sendo elas a epiderme, derme e hipoderme (Figura 5) (59).

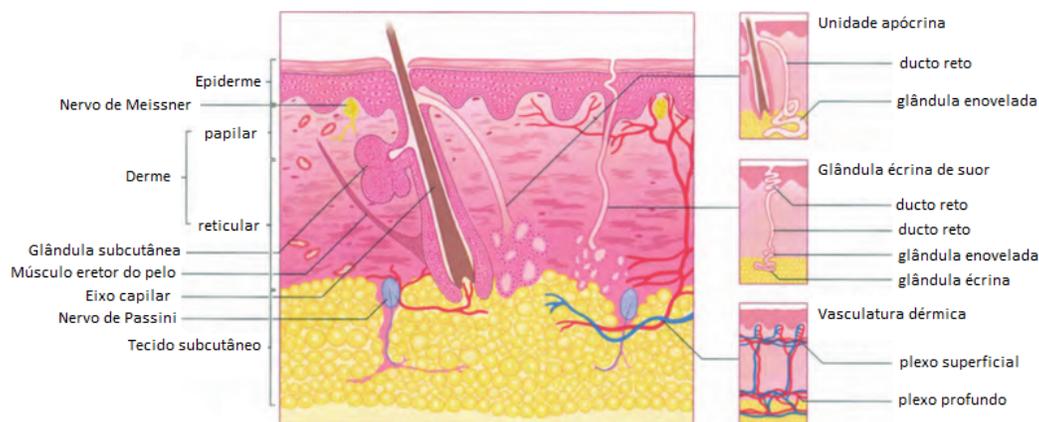


Figura 5. Esquema das camadas da pele (epiderme, derme e hipoderme) e anexos cutâneos (61).

A primeira camada da pele, a epiderme, é formada por queratinócitos, que são células estratificadas que se diferenciam à medida que se voltam da camada basal para a superfície da pele. Quando atingem a superfície da pele, elas já são alongadas, mortas e extremamente ricas em queratina, constituindo o EC (58,59). A espessura dessa camada varia de acordo com sua localização no corpo humano, sendo mais espessa nas palmas das mãos e dos pés e mais delgada na superfície ocular (62). A epiderme, portanto, é formada por cinco camadas, sendo elas (62,63):

- **Camada basal:** as células encontram-se na junção dermoepidermal. É nesta camada que se encontram os queratinócitos que, por mitose, promovem a renovação celular da epiderme. Aqui também se encontram os melanócitos, que são responsáveis pela elaboração de pigmentos que dão cor à pele.
- **Camada espinhosa:** os queratinócitos que estão nessa camada apresentam-se em forma de glóbulos, poliédricos e fortemente aderidos entre si por espessamento da membrana (dermossomas), conferindo-lhes uma aparência espinhosa. Esta camada é constituída por 6 a 20 fileiras de queratinócitos.
- **Camada granulosa:** aqui, os queratinócitos são achatados, com núcleo basofílico e protoplasma contendo granulações de querato-hialina. Nesse momento, as células já estão perdendo suas características fisiológicas.

- *Camada lúcida*: esta camada está presente principalmente na região da planta dos pés e das mãos. São pobres em hialina e formam uma camada fina e translúcida acima da camada granulosa.
- *EC*: essa é a primeira barreira da pele, que é formada por corneócitos. Essas células apresentam-se alongadas, mortas e desidratadas, altamente queratinizadas e assim, isso confere-lhes um aspecto rígido e resistente. Essa camada possui entre 10 a 15 μm de espessura e é a primeira barreira encontrada pelos fármacos na absorção percutânea.

A renovação celular que ocorre na epiderme e vai da camada basal até o EC, onde há o desprendimento de células mortas (64).

Os queratinócitos encontram-se rodeados por lipídeos no espaço intercelular, uma vez que a função barreira do EC depende do acúmulo dessas gorduras (63). Entre os principais lipídeos encontrados, cita-se as ceramidas, ácidos graxos e colesterol. Acredita-se que eles são produzidos pela camada granulosa, em que pequenas inclusões citoplasmáticas (denominada de corpos lamelares) são formadas e “empilhadas” (65).

A principal ceramida encontrada na pele é a esfingosina. No EC, ao menos nove diferentes ceramidas já foram relatadas. Admite-se que elas estão relacionadas com a organização do EC para a forma ortorrômbica. Já o colesterol é outro lipídeo que está presente no EC com a principal função de barreira. Por fim, os ácidos graxos livres, juntamente com o sulfato de colesterol, são os únicos lipídeos que possuem a porção polar ionizável/carregada. Esses ácidos graxos são os responsáveis por manter o pH levemente ácido da pele, que situa-se entre 4,0 a 5,0 (65).

As substâncias administradas pela via tópica deparam-se com o EC como sendo a primeira barreira para a sua penetração. Isso ocorre devido às características hidrofílica e lipofílica dessa camada, e a permeação do fármaco irá depender, portanto, das características deste fármaco. A permeabilidade de determinadas moléculas por meio desta estrutura é o principal fator dentre os muitos outros aspectos biofarmacêuticos de medicamentos de uso tópico (62,66,67).

Os fármacos de uso tópico podem atravessar o EC por meio de três mecanismos distintos, sendo eles: (I) via intercelular, onde o fármaco irá se difundir em torno dos corneócitos, ficando regularmente no interior da matriz lipídica; (II) via transcelular, onde o fármaco atravessa inteiramente os corneócitos e a matriz lipídica extracelular; (III) via anexos cutâneos, onde o fármaco pode ser absorvido por meio dos folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Entretanto, a contribuição de cada uma dessas vias na penetração/permeação irá depender das características físico-químicas do fármaco (68) e de qual formulação este fármaco está inserido.

A próxima camada da pele, a derme, é um tecido elástico que, além de fornecer nutrientes para a epiderme, protege o corpo contra lesões mecânicas. Sua espessura é de 1 a 4 mm dependendo da região do corpo. A derme papilar é aquela que se encontra em contato direto com a epiderme e a derme reticular encontra-se logo abaixo desta. Ainda, a derme reticular é formada principalmente por fibras colágenas de grande diâmetro, organizadas em grandes feixes entretecidos, com fibras elásticas ramificadas em torno desses feixes. Nessa camada é onde se encontra o bulbo dos pelos, glândulas, terminações nervosas e vasos sanguíneos e linfáticos (59,69). As principais células que se encontram nessa camada são os fibroblastos, que sintetizam as fibras colágenas e substâncias gelatinosas, onde os elementos dérmicos estão imersos (63), além dos macrófagos, mastócitos e outras células circulantes do sistema imunológico (59).

As fibras de colágeno formam estruturas rígidas que conferem propriedades biomecânicas para a pele, dando a ela sustentação, firmeza e elasticidade. O envelhecimento cutâneo é um processo biológico complexo que é influenciado por fatores intrínsecos (genética, metabolismo celular e hormônios) e extrínsecos (exposição frequente à luz solar, poluição, radiação ionizante e agentes químicos). Esses fatores acabam por danificar as estruturas de colágeno, fazendo com que ocorra uma perda gradual da elasticidade, ocorrendo, dessa forma, o processo de flacidez (70).

Por fim, a terceira camada e a mais interna da pele é denominada hipoderme. Essa camada isola o corpo, serve como reserva de energia, amortece e protege a pele frente a impactos e permite sua mobilidade sobre

estruturas adjacentes. Além disso possui um efeito “cosmético”, pois esse tecido molda e dá contorno para o corpo. O limite entre a derme reticular profunda e a hipoderme é uma transição abrupta de um tecido conjuntivo dérmico e predominantemente fibroso para um tecido subcutâneo primariamente adiposo. Apesar desta clara distinção anatômica, as duas regiões ainda estão estruturalmente e funcionalmente integradas através de redes de nervos e vasos sanguíneos por meio da continuidade dos apêndices epidérmicos. As glândulas sudoríparas apócrinas e écrinas são normalmente encontradas nesta camada (59).

Os adipócitos são as principais células que se encontram na hipoderme. Eles são organizados em lóbulos definidos por septos de tecido conjuntivo fibroso. Nervos, vasos sanguíneos e linfáticos estão localizados dentro desses septos e fornecem nutrientes para essas células. A síntese e o armazenamento de gordura perpetuam ao longo da vida através de um maior acúmulo de lipídios nas células adiposas, proliferação de adipócitos existentes ou pelo recrutamento de novas células do mesênquima que ainda não se diferenciaram (59).

Concluindo, nota-se que a pele é um órgão altamente complexo devido às suas características fisiológicas, anatômicas e funcionais. A sua frequente exposição à radiação UV e à poluição promove o envelhecimento cutâneo precoce devido à formação de agentes oxidantes que acabam por destruir o tecido, por meio principalmente do enrijecimento das fibras que compõem a derme, promovendo o aspecto envelhecido da pele. Uma das alternativas para contornar este problema é a administração tópica de agentes denominados antioxidantes que retardam tais efeitos, em que se destacam aqueles que são originados de produtos naturais.

1.5 FLAVONOIDES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um radical livre é uma espécie molecular que contém um elétron desemparelhado na sua última camada de valência. A falta desse elétron não pareado resulta em certas propriedades comuns que são compartilhadas pela

maioria dos radicais livres. Muitos radicais livres são instáveis e altamente reativos, fazendo com que reajam com várias outras moléculas (71).

Os radicais livres que contêm oxigênio são o radical hidroxila, o radical ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o oxigênio *singlet*, o radical óxido nítrico e o radical peroxinitrito. Estas são espécies altamente reativas, capazes de atuarem no núcleo e nas membranas de células em moléculas biologicamente relevantes, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídios (71,72).

Esses radicais livres podem ser neutralizados administrando-se substâncias denominadas antioxidantes (72), destacando-se aqueles oriundos de produtos naturais.

Na natureza existe uma enorme variedade de agentes antioxidantes que diferem em relação à sua composição, propriedades físicas e químicas e mecanismos de ação (73). Acredita-se que dois terços de todas as espécies de plantas possui importância terapêutica, e que quase todas detêm atividade antioxidante (74). As plantas sintetizam e acumulam os metabólitos secundários por dois motivos. O primeiro está relacionado com a capacidade que elas possuem de produzir diferentes compostos químicos para realizar suas funções normais e/ou protegê-las contra o ataque de patógenos e herbívoros. O segundo mecanismo está diretamente ligado a síntese de substâncias como uma resposta frente ao estresse ambiental (75,76).

As plantas produzem uma enorme variedade de compostos com estruturas e características químicas distintas. Já se tem elucidado mais de 50.000 compostos originários de plantas (77). Entre eles destacam-se os flavonoides, carotenoides, compostos fenólicos e polifenólicos. Segundo a literatura, há evidências de que a maioria dessas substâncias possuem atividade antioxidante que podem exercer diversos efeitos benéficos para a saúde humana (42,78).

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos está relacionada com a propriedade de serem doadores de elétrons; assim, eles são capazes de eliminar os radicais livres. Os polifenóis possuem estrutura química adequada

para terem atividade antioxidante e já foi demonstrado que esses compostos são mais eficazes como antioxidantes do que as vitaminas C e E (42,79).

Os compostos fenólicos encontram-se dentro de uma classe que engloba uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem ao menos um anel aromático no qual, ao menos, um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila. Eles são classificados de acordo com sua estrutura principal ou segundo sua ocorrência no reino vegetal (80).

Dentro dos compostos fenólicos encontra-se os flavonoides, uma subclasse que também é referenciada na literatura por possuir atividade antioxidante (81). Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal (82). Os flavonoides podem ser encontrados sob diversas formas estruturais; todavia, a maioria possuem 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas. As unidades são denominadas de núcleos A, B e C, e os átomos de carbono recebem a numeração com números ordinários para os centros A e C e os mesmos números seguidos de uma linha (') para o centro B (Figura 6) (80).

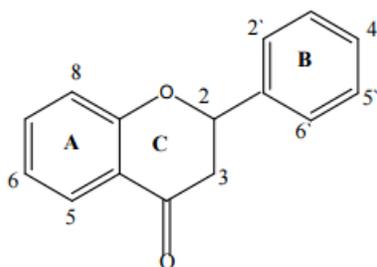


Figura 6. Estrutura básica dos flavonoides.

1.5.1 Catequinas

As catequinas (Figura 7) pertencem à classe dos flavonoides e são encontradas principalmente na espécie *Camellia sinensis* (chá verde) (83). Elas são consumidas mundialmente pela infusão das folhas, principalmente nos países Asiáticos, como China e Japão (84,85). O consumo do chá nessas culturas têm sido associada com a prevenção de muitas doenças, incluindo

câncer, catarata e doenças cardíacas (86). Esse efeito benéfico para a saúde humana está relacionada com a forte atividade antioxidante promovida pelas catequinas (86,87), além da atividade antiangiogênica e inibição da proliferação celular e modulação do metabolismo carcinogênico (7).

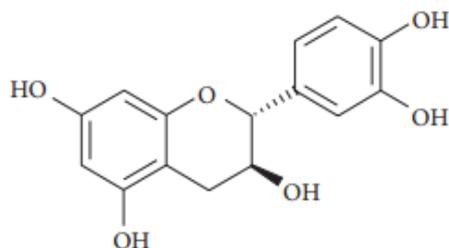


Figura 7. Estrutura molecular da (+) catequina (PM: 290,3 g/mol).

Sabe-se que as catequinas possuem uma forte atividade antioxidante e que elas têm a capacidade de eliminar espécies reativas de oxigênio/nitrogênio em virtude das suas propriedades redutoras exercidas pelos grupamentos hidroxilas ligados ao anel aromático (88).

Quando administradas pela via oral, as catequinas possuem baixa biodisponibilidade. Esse fato pode estar relacionado com o metabolismo de primeira passagem e/ou remoção pelo fígado imediatamente após a sua absorção. Além disso, há também a baixa extensão com que as catequinas são distribuídas nos tecidos, sendo encontrada em baixos níveis plasmáticos (89,90).

A utilização de plantas ricas em compostos fenólicos como suplemento dietético tem crescido nos últimos anos, e o uso de extratos de plantas em produtos dermatocósméticos também encontra-se em ascensão. Isso porque a complexa mistura de substâncias fenólicas encontradas nas plantas exercem para pele o mesmo efeito protetor que para os órgãos internos (6).

Alguns estudos já mostram que a aplicação tópica de catequina tem demonstrado um efeito fotoprotetor, com redução do número de células danificadas pelo sol, proteção das células de Langherans, redução do dano

levado ao DNA após a exposição à radiação UV e, principalmente, acentuada ação antioxidante (5,88,89). Entretanto, a catequina é uma molécula que possui baixa estabilidade nas condições ambientais, sendo facilmente oxidada. Além disso, possui baixa capacidade de penetrar nas camadas mais profundas da pele (91). Esses problemas podem ser contornados veiculando essa substância em formulações nanoemulsionadas, uma vez que esses sistemas têm potencial de protegerem as catequinas do ambiente externo, melhorando sua estabilidade físico-química por longos períodos de tempo e melhorar as propriedades antioxidantes da própria molécula. Adicionalmente, o tamanho reduzido das gotículas das NE fornece maior superfície de contato delas com a pele e os tensoativos são capazes de desestabilizar o EC, aumentando a penetração cutânea de substâncias nela incorporadas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi desenvolver, caracterizar e avaliar nanoemulsões contendo extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* DC e catequina para serem empregadas como alternativas terapêuticas inovadoras para o tratamento tópico do envelhecimento cutâneo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar e validar um método analítico seletivo para quantificação de catequina no extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC e para dar suporte aos ensaios de permeação cutânea dessas substâncias a partir das formulações;
- Verificar a compatibilidade química entre a catequina e os excipientes utilizados no preparo das nanoemulsões;
- Obter nanoemulsões do tipo O/A e A/O a partir da construção de diagramas de fases pseudoternários;
- Incorporar o extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* DC e catequina aos sistemas nanoemulsionados desenvolvidos e caracterizá-los quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, pH e teor de catequina;
- Realizar os estudos de estabilidade das nanoemulsões por 90 dias;
- Verificar *in vitro* a retenção cutânea da catequina a partir das nanoemulsões obtidas;
- Determinar a atividade antioxidante das nanoemulsões utilizando o radical livre DPPH por meio da técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR);
- Avaliar o potencial irritante das nanoemulsões desenvolvidas por meio do ensaio *in vitro* HET-CAM.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cardoso L de M, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. Food Res Int [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(7):2151–4.
2. Silva RSM, Chaves LJ, Naves RV. Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil. Rev Bras Frutic. 2001;23(2):330–4.
3. Cecílio A., Faria D., Oliveira P., Caldas S, Oliveira D., Sobral ME., et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. J Ethnopharmacol [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;141(3):975–81.
4. Mazuti Silva SM, Gasca Silva CA, Fonseca-Bazzo YM, Magalhães PO, Silveira D. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex Dc. (Cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. Infarma - Ciências Farm [Internet]. 2015;27(1):49.
5. Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Matsui M, Katiyar S, Mukhtar H. Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. Am Acad Dermatol. 2001;44:425–32.
6. Stallings AF, Lupo BMP. Practical uses of botanicals in skin care. J Clin Aesthet Dermatol. 2009;2(1):36–40.
7. Henning SM, Fajardo-Lira C, Lee HW, Youssefian AA, Go VLW, Heber D. Catechin content of 18 teas and a green tea extract supplement correlates with the antioxidant capacity. Nutr Cancer. 2003;45(2):226–35.
8. Duran N, Mattoso LH., Moraes P. de. Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. Editora Artliber, 2006. 2006.
9. Fernandes MF., Filgueiras CA. Um panorama da nanotecnologia no Brasil (e seus macrodesafios). Quim Nova. 2008;31(8):2205–13.
10. Kim BY., James T., Chan WC. Nanomedicine. N Engl J Med. 2010;363(25):2434–43.
11. Osborne D., Meddleton C., Rogers R. Alcohol free microemulsions. J Dispers Sci Technol. 1988;9:415–23.
12. Fernandez P, André V, Rieger J, Kuhnle A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp. 2004;251:53–8.
13. Meidan V., Bonner M., Michiniak B. Transfollicular drug delivery- is it a reality? Interncional J Pharm. 2005;306:1–14.
14. Mahdi E., Noor A., Sakeena M., Abdullah G., Abdulkarim M., Sattar M. Formulation and *in vitro* release evaluation of new lysyn the sized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic drie dextract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. Int J Nanomedicine. 2011;6:2499–512.
15. Battisti C, Garlet TMB, Essi L, Horbach RK, Andrade A de, Badke MR. Plantas

- medicinais utilizadas no município de Palmeira das Missões , RS , Brasil. Rev Bras Biociências. 2013;11(3):338–48.
16. Firmo W, Menezes V, Passos C, Dias C, Alves L, Neto M, et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. Cad Pesqui. 2011;18:90–5.
 17. França ISX de, Souza JA de, Baptista RS, Britto VR de S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev Bras Enferm. 2007;61(2):201–8.
 18. Giraldi M, Hanazaki N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão , Florianópolis , SC , Brasil. Acta botânica Bras. 2010;24(2):395–406.
 19. Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. Ann Epidemiol. 2005;15(9):686–99.
 20. Govaerts R. Royal Botanic Gardens. 2008. 455 p.
 21. Duarte AR. Espécies de Myrtaceae de uma parcela permanente de floresta ombrófila densa baixo montana no parque estadual Carlos Botelho, município de Sete Barras - SP. Universidade de São Paulo; 2003.
 22. Sobral M et al. Lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico, Rio de Janeiro; 2010.
 23. Fontenelle G., Costa C., Machado R. Foliar anatomy and micromorphology of eleven species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). Bot J Linn Soc. 1994;115:111–33.
 24. Silva C., Bilia DA., Maluf A., Barbedo C. Fracionamento e germinação de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess. - Myrtaceae). Rev Bras Botânica. 2003;26(2):213–21.
 25. Fischer DC., Limberger R., Henriques A., Moreno PR. Essential oils from leaves of two *Eugenia brasiliensis* specimens from southeastern Brazil. J Essent Oil Res. 2005;17:499–500.
 26. Consolini A., Baldini OA., Amat A. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. J Ethnopharmacol. 1999;66:33–9.
 27. Landrum R., Kawasaki M. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification Keys. Brittonia. 1997;49(4):508–36.
 28. The Plant List: a working list of all plant species [Internet]. Version 1.1. 2013 [cited 2017 Nov 17]. Available from: <http://www.theplantlist.org/>
 29. Ávila RI De, Belo C, Alvarenga M, Henrique P, Ávila M De, Moreira RC, et al. *Eugenia dysenterica* DC . (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. Pharm Biol. 2016;209:1–12.
 30. Telles MP., Silva RS., Chaves L., Coelho AS., Filho JA. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. Pesqui Agropecuária Bras. 2001;36(11):1387–94.

31. Oliveira VB, Yamada LT, Fagg CW, Brandão MGL. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. Food R [Internet]. Elsevier Ltd; 2012;48(1):170–9.
32. Zucchi MI, Pereira R, Brondani V, Pinheiro JB, Chaves LJ, Siqueira A, et al. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR markers. Genet Mol Biol. 2003;26(4):449–57.
33. Galheigo MRU, Prado LC da S, Mundin AMM, Gomes DO, Chang R, Lima AMC, et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. Nat Prod Res [Internet]. 2016;30(10):1182–5.
34. Lima T., Silva O., Rocha T., Grossi-De-Sá MF, Franco OL, Leonardecz E. In Vivo effects of cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) leaf extracts on diarrhea treatment. Evidence-Based Complement Altern Med. 2011;2011:1–10.
35. Costa TR, Fernandes OFL, Santos SC, Oliveira CMA, Lião LM, Ferri PH, et al. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. J Ethnopharmacol. 2000;72(1–2):111–7.
36. Lima TB, Silva ON, Oliveira JTA, Vasconcelos IM, Scalabrin FB, Rocha TL, et al. Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome. Peptides [Internet]. Elsevier Inc.; 2010;31(8):1426–33.
37. Prado LCS, Silva DB, de Oliveira-Silva GL, Hiraki KR, Canabrava HA, Bispo-da-Silva LB. The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins. Biol Pharm Bull. 2014;37(5):722–30.
38. Zorzin F, Silva S, Freitas M, Coppini R, Souza P, Silveira D, et al. Validation of the analytical method by HPLC for determination of catechin in *Eugenia dysenterica* DC dry aqueous extract: a Beazilian savannah native plant. Pharmacol Online. 2015;2:100–7.
39. Zorzin FM. Avaliação da atividade de inibição de alfa-amilase e padronização do extrato aquoso da folha de Eugenia dysenterica. 2014;
40. Correia AF, Silveira D, Fonseca-bazzo YM, Magalhães PO, Fagg CW, Clementino E, et al. Activity of crude extracts from Brazilian cerrado plants against clinically relevant *Candida* species. BMC Complement Altern Med [Internet]. BMC Complementary and Alternative Medicine; 2016;16:1–9.
41. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agrindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food Chem. 2006;99:191–203.
42. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends plant Sci Rev. 1997;2(4):152–9.
43. Takao LK, Imatomi M, Gualtieri SCJ. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). Brazilian J Biol. 2015;75(4):948–52.
44. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: implications for multi-drug delivery. Int J Pharm [Internet]. Elsevier B.V.; 2017.

45. Formariz TP, Urban MCC, Júnior AADS, Gremião MPD, Oliveira AG De. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Rev Bras Ciências Farm.* 2005;41(3):301–13.
46. Klier BJ, Tucker CJ, Kalantar TH, Green DPP. Properties and applications of microemulsions. *Advantaced Mater.* 2000;12(23):1751–7.
47. Jaiswal M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. *3 Biotech [Internet].* 2015;5(2):123–7.
48. Singh V, Bushettii SS, S AR, Ahmad R, Singh M, Bisht A. Microemulsions as promising delivery systems: a review. *Indian J Pharm Educ Res.* 2011;45(4):392–401.
49. Solans C, Solé I. Nano-emulsions :formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci [Internet]. Elsevier Ltd;* 2012;17(5):246–54.
50. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci [Internet]. Elsevier Ltd;* 2012;17(5):246–54.
51. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N, Garcia-Celma MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2005;10:102–10.
52. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;108–109:303–18.
53. Mcclements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter.* 2012;8:1719–29.
54. Oliveira AG, Scarpa M V, Chaimovich H. Effect of hexadecyltrimethylammonium bromide-based microemulsions on the rate of decomposition of the -lactam antibiotic Cephaclo. *J Pharm Sci.* 1997;86(5):616–20.
55. Constantinides PP. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: physical and biopharmaceutical aspects. *Pharm Res.* 1995;12(11):1561–72.
56. Silva JDF, Silva YP, Piatnicki CMS, Bockel WJ, Mendonça CRB. Microemulsões: componentes, características, potencialidades em química de alimentos e outras aplicações. *Quim Nova.* 2015;38(9):1196–206.
57. Constantinides PP, Lancaster CM, Marcello J, Chiossone DC, Orner D, Hidalgo I, et al. Enhanced intestinal absorption of an RGD peptide from water-in- oil microemulsions of different composition and particle size. *J Control Release.* 1995;34:109–16.
58. Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release.* 1987;6:85–97.
59. Chu DH. Development and structure of skin. In: *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 2008. p. 57–92.
60. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical ef fi cacy and safety. *Clin Interv Aging.* 2006;1(4):327–48.
61. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the Skin. *Dermatology Nurses Assoc.* 2011;3(4):203–13.

62. Gomara F de L. Estudo de permeação cutânea in vitro do ácido kójico. Universidade Federal do Paraná; 2003.
63. Mezadri H. Desenvolvimento de nanoemulsões contendo extratos dos frutos de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman e estudo fitoquímico destes extratos. Universidade Federal do Ouro Preto; 2010.
64. Edwards C, Marks R. Evaluation of Biomechanical Properties of Human Skin. *Clin Dermatol.* 1995;13:375–80.
65. Jungersted J., Helgren L., Jemec GB., Agner T. Lipids and skin barrier function – a clinical perspective. *Contact Dermatitis.* 2008;(5):255–62.
66. Kligman AM. Skin permeability: dermatologic transdermal drug delivery aspects of transdermal drug delivery. *Dermatology transdermal drug Deliv.* 1984;108(1):200–6.
67. Godin B, Touitou E. Transdermal skin delivery: predictions for humans from *in vivo*, *ex vivo* and animal models. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59:1152–61.
68. Gratieri T, Martins G, Fonseca R, Lopez V. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. *Quim Nova.* 2008;31(6):1490–8.
69. Rosani L. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais. Universidade Federal de São Carlos; 2011.
70. Ganceviciene R, Liakou AI, Theodoridis A, Makrantonaki E, Zouboulis CC. Skin anti-aging strategies. *Dermatoendocrinol.* 2012;4(3):308–19.
71. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods : Impact on human health. *Pharmacogn Rev.* 2010;4(8):118–26.
72. Pham-huy LA, He H, Pham-huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biol Sci.* 2008;4(2):89–96.
73. Gupta VK, Sharma SK. Plants as natural antioxidants. *Nat Prod Radiance.* 2006;5(4):326–34.
74. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprod Process.* 2011;9:217–33.
75. Kasote DM, Katyare SS, Hegde M V, Bae H. Significance of antioxidant potential of plants and its relevance to therapeutic applications. *Int J Biol Sci.* 2015;11(8):982–91.
76. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002;177:67–80.
77. Pichersky E, Gang DR. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends plant Sci Perspect.* 2000;5(10):439–45.
78. Jorge AJ, Heliodoro DLGT, Alejandro ZC, Ruth BC, Noé AC. The optimization of phenolic compounds extraction from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) skin in a reflux system using response surface methodology. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2013;3(6):436–42.

79. Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 2000;48:3396–402.
80. Simões CM de O, Schenkel EP, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick P dos R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5°. Porto Alegre/ Porto Alegre; 2004.
81. Procházková D, Bousová I, Wilhelmová N. Fitoterapia antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia.* 2011;82:513–23.
82. Dornas W., Oliveira T., Rodrigues-das-Dores R., Santos A., Nagem T. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2007;28(3):241–9.
83. Johnson R, Bryant S, Huntley AL. Maturitas green tea and green tea catechin extracts: an overview of the clinical evidence. *Maturitas* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;73(4):280–7.
84. Jeong W-S, Kong A-NT. Biological properties of monomeric and polymeric catechins: green tea catechins and procyanidins. *Pharm Biol.* 2004;42:84–93.
85. Colon M, Nerin C. Role of catechins in the antioxidant capacity of an active film containing green tea, green coffee, and grapefruit extracts. *J Agric Food Chem.* 2012;60:9842–9.
86. Lambert JD, Yang CS. Cancer chemopreventive activity and bioavailability of tea and tea polyphenols. *Mutat Res.* 2003;524:201–8.
87. Higdon J V, Frei B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43(1):89–143.
88. Li D, Martini N, Wu Z, Wen J. Development of an isocratic HPLC method for catechin quantification and its application to formulation studies. *Fitoterapia* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;83(7):1267–74.
89. Zhu M, Chen Y, Li RC. Oral absorption and bioavailability of tea catechins. *Planta Med.* 2000;66:444–7.
90. Mata-Bilbao M de L, Andrés-Lacueva C, Roura E, Jáuregui O, Escibano E, Torre C, et al. Absorption and pharmacokinetics of green tea catechins in beagles. *Br J Nutr.* 2008;100:496–502.
91. Harwansh RK, Mukherjee PK, Kar A, Bahadur S, Al-Dhabi NA, Duraipandiyam V. Enhancement of photoprotection potential of catechin loaded nanoemulsion gel against UVA induced oxidative stress. *J Photochem Photobiol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2016;160:318–29.
92. Levin C, Maibach H. Exploration of “alternative” and “natural” drugs in dermatology. *Arch Dermatol.* 2002;138:207–11.
93. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE n 899, 29 de maio de 2003, p. 1–15, 2003.
94. ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. International Conference on Harmonization, 2005
95. FDA. Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods. 1994.

96. Silva SMM da. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma do cerrado. Universidade de Brasília; 2013.
97. Valentini SR, Sommer WA, Matioli G. Validação de métodos analíticos. *Arq do Mudi*. 2007;11(2):26–31.
98. Gratieri T, Wagner B, Kalaria D, Kalia YN. Development and validation of a HPAE-PAD method for the quantification of CGP69669A, a sialyl Lewis x mimetic, in skin permeation studies. *Biomed Chromatogr*. 2012;2011(July 2011):507–11.
99. Dias F de S, Lovillo MP, Barroso CG, David JM. Optimization and validation of a method for the direct determination of catechin and epicatechin in red wines by HPLC/fluorescence. *Microchem J [Internet]*. Elsevier B.V.; 2010;96(1):17–20.
100. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova*. 2004;27(5):771–80.
101. Ruela ALM, Araújo MB, Pereira GR. Desenvolvimento e validação de um método analítico rápido por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de nimesulida em estudos de liberação *in vitro*. *Quim Nova*. 2009;32(1):165–8.
102. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm*. 2004;280(1–2):241–51.
103. BRASIL. Resolução nº 1 de 29/07/2005 / ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2005;2005.
104. BRASIL. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 2004;1:47.
105. BRASIL. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. 1st ed. Brasília; 2007. 125 p.
106. ICH. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2). 2003;4:17.
107. Zillich O V, Hasenkopf K, Eisner P, Kerscher M. Release and *in vitro* skin permeation of polyphenols from cosmetic emulsions. *Int J Cosmet Sci*. 2013;35:491–501.
108. Santos AB dos, Silva DHS, Bolzani V da S, Santos LÁ, Schimidt TM, Baffa O. Antioxidant properties of plant extracts: an EPR and DFT comparative study of the reaction with DPPH, TEMPOL and Spin Trap DMPO. *J Braziliam Chem Soc*. 2009;20(8):1483–92.
109. Oliveira AGL de, Silva RS, Alves EN, Presgrave R de F, Presgrave OAF, Delgado IF. Ensaio da membrana córneo-alantoide (HET-CAM e CAM-TBS): alternativas para a avaliação toxicológica de produtos com baixo potencial de irritação ocular. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2012;71(1):153–9.
110. Vinardell MP, Macian M. Comparative study of the HET-CAM test and the Drize eye test assessment of irritancy potencial. *Toxicol Vitri*. 1994;8(3):467–70.
111. Barros CB De. Validação de métodos analíticos. *Biológico*. 2002;64:175–7.
112. Brito NM, Junior ODP, Polese L, Ribeiro ML. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pestic REcototoxicol e Meio Ambient*. 2003;13:129–46.

113. Valentini SR, Sommer WA, Matioli G. Validação de métodos analíticos. *Arq Mundi*. 2007;11(2):26–31.
114. De Aragão NM, Veloso MCDC, De Andrade JB. Validação de métodos cromatográficos de análise- Um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. *Quim Nova*. 2009;32(9):2476–81.
115. Matos BN, Oliveira PM De, Reis TA, Gratieri T, Cunha-Filho M, Gelfuso GM. Development and validation of a simple and selective analytical HPLC method for the quantification of Oxaliplatin. *J Chem*. 2015;2015:1–6.
116. Abdel-hafez SM, Hathout RM, Sammour OA. Towards better modeling of chitosan nanoparticles production: screening different factors and comparing two experimental designs. *Int J Biol Macromol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;64:334–40.
117. Shah RR, Magdum CS, Patil SS, Niakwade NS. Preparation and evaluation of aceclofenac topical microemulsion. *Iran J Pharm Res*. 2010;9(1):5–11.
118. Masek A, Chrzescijanska E, Zaborski M. Electrochemical properties of catechin in non-aqueous media. *Int J Eletrochemical Sci*. 2015;10:2504–14.
119. Júnior OV, Dantas JH, Brandão CE, Zanoelo EF, Cardoso-Filho L, Moraes FF de. Formation of inclusion compounds of (+) catechin with β -Cyclodextrin in different complexation media: spectral, thermal and antioxidant properties. *J Supercrit Fluids* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;121:10–8.
120. Alves-silva I, Sá-barreto LCL, Lima EM, Cunha-filho MSS. Preformulation studies of itraconazole associated with benzimidazole and pharmaceutical excipients. *Thermochim Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;575:29–33.
121. Malaquias LFB, Schulte HL, Chaker JA, Karan K, Durig T, Marreto RN, et al. Hot melt extrudates formulated using design space: one simple process for both palatability and dissolution rate improvement. *J Pharm Sci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;1–11.
122. He C-X, He Z-G, Gao J-Q. Microemulsions as drug delivery systems to improve the solubility and the bioavailability of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(4):445–60.
123. Effendy I, Maibach HI. Surfactants and experimental irritant contact dermatitis. *Contac Dermat*. 1995;33:217–25.
124. Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RSR. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *Pharm Sci Technol* [Internet]. 2006;7(3):77.
125. Fini A, Bergamante V, Ceschel GC, Ronchi C, De CAF. Control of transdermal permeation of hydrocortisone acetate from hydrophilic and lipophilic formulations. *Pharm Sci Technol*. 2008;9(3):762–8.
126. Hu L, Hu Q, Yang J. Enhancement of transdermal delivery of ibuprofen using microemulsion vehicle. *Iran J Basic Med Sci*. 2014;17(10):760–6.
127. Zhao X, Liu JP, Zhang X, Li Y. Enhancement of transdermal delivery of theophylline using microemulsion vehicle. *Int J Pharm*. 2006;327:58–64.

128. Zhang Q, Jiang X, Jiang W, Lu W, Su L, Shi Z. Preparation of nimodipine-loaded microemulsion for intranasal delivery and evaluation on the targeting efficiency to the brain. *International J Pharm*. 2004;275:85–96.
129. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Methods*. 2004;21(2):201–30.
130. Lin Y, Shen Q, Katsumi H, Okada N, Fujita T, Jiang X, et al. Effects of Labrasol and other pharmaceutical excipients on the intestinal transport and absorption of rhodamine123, a P-glycoprotein substrate, in rats. *Biol Pharm Bull*. 2007;30(7):1301–7.
131. Grampurohit N, Ravikumar P, Mallya R. Microemulsions for topical use - a review. *Indian J Pharm Educ Res*. 2011;45(1):100–7.
132. Gattefossé. BRANCO.pdf [Internet]. Plurol oleique CC497 - Gattefossé. 2017 [cited 2017 Aug 23]. Available from: <https://www.gattefosse.com/plurol-oleique-cc-497>
133. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6th ed. Washington: Pharmaceutical Press; 2009. 917 p.
134. Zhang R, Wang Y, Tan L, Zhang HY, Yang M. Analysis of Polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection. *J Chromatogr Sci*. 2012;50:598–607.
135. Karijiban RA, Basri M, Rahman MBA, Salleh AB. Structural properties of nonionic Tween 80 micelle in water elucidated by Molecular Dynamics Simulation. *Procedia APCBEE*. 2012;3:287–97.
136. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000;45:89–121.
137. Mehta SK, Bala K. Tween-based microemulsions: a percolation view. *Fluid Phase Equilib*. 2000;172:197–209.
138. Silva JA da, Damasceno BPG de L, Borba VF da C, Egito EST. Use of pseudo-ternary phase diagrams as a tool to produce transdermal nanoemulsion. *Rev Bras Farmácia*. 2009;90(3):245–9.
139. Damasceno BPGL, Silva JA, Oliveira EE, Silveira WLL, Araújo IB, Oliveira AG, et al. Microemulsão: Um promissor carreador para moléculas insolúveis. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl*. 2011;32(1):9–18.
140. Peng LC, Liu CH, Kwan CC, Huang KF. Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;370(1–3):136–42.
141. Zemb TN, Klossek M, Lopian T, Marcus J, Schöetl S, Horinek D. How to explain microemulsions formed by solvent mixtures without conventional surfactants. *PNAS*. 2016;113(2016):4260–5.
142. Azeem A, Rizwan M, Ahmad FJ, Iqbal Z, Khar RK, Aqil M, et al. Nanoemulsion components screening and selection: a technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2009;10(1):69–76.
143. Lambers H, Piessens S, Bloem A, Pronk H, Finkel P. Natural skin surface pH is on average below 5 , which is beneficial for its resident flora. *Int J Cosmet Sci*.

2006;28:359–70.

144. Gislaine A, Leonardi R, Gaspar LR, Campos PMBGM. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A , E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An Bras Dermatol*. 2002;77(5):563–9.
145. Zhu QY, Zhang A, Tsang D, Huang Y, Chen Z-Y. Stability of Green Tea Catechins. *J Agric Food Chem* [Internet]. 1997;45(12):4624–8.
146. Shah RR, Magdum CS, Patil SS, Niakwade NS. Preparation and evaluation of aceclofenac topical microemulsion. *Iran J Basic Med Sci*. 2010;9(1):5–11.
147. Nidhi K, Indrajeet S, Khushboo M, Gauri K, Sen DJ. Hydrotropy: A promising tool for solubility enhancement: A review. *Int J Drug Dev Res*. 2011;3(2):26–33.
148. Wang J-J, Hung C-F, Yeh C-H, Fang J-Y. The release and analgesic activities of morphine and its ester prodrug, morphine propionate, formulated by water-in-oil nanoemulsions. *J Drug Target*. 2008;16(4):294–301.
149. Moghimipour E, Salimi A, Eftekhari S. Design and characterization of microemulsion systems for naproxen. *Adv Pharm Bull*. 2013;3(1):63–71.
150. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust J-E, Benoit J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*. 2003;24:4283–300.
151. Ueta B, Durães C, Ilário C, Asdorian G, Koroyva P, Ueda S, et al. Atividade antioxidante da catequina e análise comparativa com as vitaminas C e E. 2014 p. 1–3.
152. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil : in vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(44):1–9.
153. Li N, Taylor LS, Ferruzzi MG, Mauer LJ. Kinetic study of catechin stability: Effects of ph, concentration, and temperature. *J Agric Food Chem*. 2012;60(51):12531–9.
154. Ananingsih VK, Sharma A, Zhou W. Green tea catechins during food processing and storage: A review on stability and detection. *Food Res Int* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;50(2):469–79.
155. Saadeh R, Al-jabari M, Abdoh A, Al-bawab A. Stability study of green tea natural extract in aqueous solutions and its chemical kinetics. *Dirasat, Pure Sci*. 2009;36(1):62–75.
156. Parveen R, Baboota S, Ahmad S. Stability studies of silymarin nanoemulsion containing Tween 80 as a surfactant. *J Pharm Bioallied Sci*. 2015;7(4):321–4.
157. Jaiswal M, Dudhe R. Nanoemulsion : an advanced mode of drug delivery system. *Biotech*. 2015;5:123–7.
158. Bhushani JA, Karthik P, Anandharamakrishnan C. Nanoemulsion based delivery system for improved bioaccessibility and Caco-2 cell monolayer permeability of green tea catechins [Internet]. Vol. 56, *Food Hydrocolloids*. Elsevier Ltd; 2016. 372-382 p.
159. Harwansh RK, Patra KC, Pareta SK, Singh J, Rahman MA. Nanoemulsions as

- vehicles for transdermal delivery of glycyrrhizin. *Brazilian J Pharm Sci.* 2007;8(4):91–8.
160. Doh HJ, Jung Y, Balakrishnan P, Cho HJ, Kim DD. A novel lipid nanoemulsion system for improved permeation of granisetron. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013;101:475–80.
 161. SY L, SJ H, TH H, FL Y. Comparisons of different animal skins with human skin in drug percutaneous penetration studies. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1992;14(8):645–54.
 162. Batchelder RJ, Calder RJ, Thomas CP, Heard CM. *In vitro* transdermal delivery of the major catechins and caffeine from extract of *Camellia sinensis*. *Int J Pharm.* 2004;283:45–51.
 163. Su R, Fan W, Yu Q, Dong X, Qi J, Zhu Q. Size-dependent penetration of nanoemulsions into epidermis and hair follicles: implications for transdermal delivery and immunization. *Oncotarget.* 2017;8(24):38214–26.
 164. Augusto F, Sá P De, Fleury S, Martins G, Martins E, Gratieri T. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015;133:331–8.
 165. Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:747–58.
 166. Debbasch C, Ebenhahn C, Dami N, Pericoi M, Berghe C Van Den, Cottin M, et al. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of *in vitro* results with clinical data and product composition. *Food Chem Toxicol.* 2005;43:155–65.
 167. Pereira GG. Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões [Internet]. 2008.
 168. Maruno M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. 2009.
 169. Rocha-Filho PA, Ferrari M, Maruno M, Souza O, Gumiero V. *In vitro* and *in vivo* evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. *Cosmetics.* 2017;4(32):1–13.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Características organolépticas das NE O/A e NE A/O durante os estudos de estabilidade

Quadro 1. Características organolépticas da NE O/A armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado).

DIAS	NE O/A – Temperatura ambiente					NE O/A – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
90	HG	TL	LM	C	LS	HG	TL	C	C	LS

Quadro 2. Características organolépticas da NE O/A EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	NE O/A EXT – Temperatura ambiente					NE O/A EXT – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	LM	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	LM	C	LS	HG	TL	LM	C	LS
90	HG	TL	M	C	LS	HG	TL	LM	C	LS

Quadro 3. Características organolépticas da NE O/A CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	NE O/A CA – Temperatura ambiente					NE O/A CA – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
90	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS

Quadro 4. Características organolépticas da NE A/O armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado).

DIAS	NE A/O – Temperatura ambiente					NE A/O – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
90	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS

Quadro 5. Características organolépticas da NE A/O EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	NE A/O EXT – Temperatura ambiente					NE A/O EXT – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	LM	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	LM	C	LS	HG	TL	LM	C	LS
90	HG	TL	M	C	LS	HG	TL	LM	C	LS

Quadro 6. Características organolépticas da NE A/O CA armazenados em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); TL (Translúcido); C (Característico); LS (Liso); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	NE A/O CA – Temperatura ambiente					NE A/O CA – Geladeira				
	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato	Aspecto		Cor	Odor	Sensação de tato
0	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
7	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
15	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
30	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
60	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS
90	HG	TL	C	C	LS	HG	TL	C	C	LS

APÊNDICE B – Características organolépticas dos controles O/A e A/O durante os estudos de estabilidade.

Quadro 7. Características organolépticas do controle O/A EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); TR (Turvo); MA (Marrom); ME (Marrom escuro); C (Característico); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	Controle O/A EXT – Temperatura ambiente				Controle O/A EXT – Geladeira			
	Aspecto		Cor	Odor	Aspecto		Cor	Odor
0	HG	T	MA	C	HG	T	MA	C
7	HG	TR	MA	C	HG	T	MA	C
15	HG	TR	ME	LM	HG	T	MA	C
30	HG	TR	ME	M	HG	TR	MA	LM
60	HG	TR	ME	M	HG	TR	ME	M
90	HG	TR	ME	M	HG	TR	ME	M

Quadro 8. Características organolépticas do controle O/A CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); AC (Amarelo claro); A (Amarelo); AE (Amarelo escuro); C (Característico).

DIAS	Controle O/A CA – Temperatura ambiente				Controle O/A CA – Geladeira			
	Aspecto		Cor	Odor	Aspecto		Cor	Odor
0	HG	T	AC	C	HG	T	AC	C
7	HG	T	AC	C	HG	T	AC	C
15	HG	T	AC	C	HG	T	AC	C
30	HG	T	A	C	HG	T	A	C
60	HG	T	AE	C	HG	T	A	C
90	HG	T	AE	C	HG	T	A	C

Quadro 9. Características organolépticas do controle A/O EXT armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. Legenda: HG (Homogêneo); T (Translúcido); TR (Turvo); MA (Marrom); MC (Marrom claro); ME (Marrom escuro); C (Característico); LM (Levemente modificado); M (Modificado).

DIAS	Controle A/O EXT – Temperatura ambiente				Controle A/O EXT – Geladeira			
	Aspecto		Cor	Odor	Aspecto		Cor	Odor
0	HG	T	MC	C	HG	T	MC	C
7	HG	TR	MC	C	HG	T	MC	C
15	HG	TR	MA	LM	HG	T	MC	C
30	HG	TR	MA	M	HG	T	M	LM
60	HG	TR	ME	M	HG	T	M	LM
90	HG	TR	ME	M	HG	T	ME	LM

Quadro 10. Características organolépticas do controle A/O CA armazenado em temperatura ambiente e geladeira por 90 dias. HG (Homogêneo); T (Translúcido); IN (Incolor); AC (Amarelo claro); A (Amarelo); C (Característico).

DIAS	Controle O/A CA – Temperatura ambiente				Controle O/A CA – Geladeira			
	Aspecto		Cor	Odor	Aspecto		Cor	Odor
0	HG	T	IN	C	HG	T	IN	C
7	HG	T	IN	C	HG	T	IN	C
15	HG	T	IN	C	HG	T	IN	C
30	HG	T	AC	C	HG	T	AC	C
60	HG	T	AC	C	HG	T	AC	C
90	HG	T	A	C	HG	T	AC	C