

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE**

**Priscila Aparecida de Almeida**

**Cuidados com a pele negra:** desenvolvimento tecnológico de formulações cosméticas contendo mistura de óleos vegetais da biodiversidade brasileira nanoencapsulados

Juiz de Fora  
2024

**Priscila Aparecida de Almeida**

**Cuidados com a pele negra:** desenvolvimento tecnológico de formulações cosméticas contendo mistura de óleos vegetais da biodiversidade brasileira nanoencapsulados

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde. Área de concentração: Pesquisa Pré-Clinica e de Inovação Tecnológica.

Orientadora: Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Prof. Dr. Richard Michael Grazul

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Almeida, Priscila Aparecida de.

Cuidados com a pele negra : desenvolvimento tecnológico de formulações cosméticas contendo mistura de óleos vegetais da biodiversidade brasileira nanoencapsulados / Priscila Aparecida de Almeida. -- 2024.

170 f. : il.

Orientadora: Nádía Rezende Barbosa Raposo

Coorientador: Richard Michael Grazul

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Saúde Brasileira, 2024.

1. Cosméticos. 2. Estabilidade de cosméticos. 3. Nanotecnologia. 4. Nanopartículas lipídicas. 5. Óleos vegetais. I. Raposo, Nádía Rezende Barbosa, orient. II. Grazul, Richard Michael, coorient. III. Título.

**Priscila Aparecida de Almeida**

**Cuidados com a pele negra:** desenvolvimento tecnológico de formulações cosméticas contendo mistura de óleos vegetais da biodiversidade brasileira nanoencapsulados

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Saúde. Área de concentração: Pesquisa Pré-clínica e de Inovação Tecnológica

Aprovada em 17 de dezembro de 2024.

**BANCA EXAMINADORA**

**Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo** - Orientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Richard Michael Grazul**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Guilherme Diniz Tavares**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Dra. Hanny Reis Mockdeci**

**Profa. Dra. Laura de Andrade Junqueira**

Delta Pharmaceuticals

Juiz de Fora, 03/12/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Nadia Rezende Barbosa Raposo, Professor(a)**, em 17/12/2024, às 13:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Laura de Andrade Junqueira, Usuário Externo**, em 17/12/2024, às 14:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares, Professor(a)**, em 17/12/2024, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Richard Michael Grazul, Professor(a)**, em 17/12/2024, às 15:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hanny Reis Mockdeci Gonçalves, Usuário Externo**, em 18/12/2024, às 09:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos Antonio Fernandes Brandao, Professor(a)**, em 18/12/2024, às 20:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2134107** e o código CRC **8A69AAE3**.

Dedico este trabalho ao meu esposo Tiago, pela insistência na realização do Doutorado e por todo o suporte, sempre me incentivando a não desistir; e à minha filha Letícia, pelos momentos da minha ausência para a conclusão deste trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela saúde, proteção e força para seguir adiante, mesmo diante das dificuldades, fornecendo virtude para encarar cada desafio como fonte de aprendizado.

À minha pequena Leticia, meu grande amor e meu maior sonho. Obrigada por todos os momentos maravilhosos ao seu lado.

Ao meu esposo Tiago, por toda a paciência que possui comigo, escutando minhas agonias e lamentos todos os dias dessa jornada. Obrigada também pelo incentivo diário, apoio e todo o amor.

Aos meus pais, Maria Rosilene e Vicente, por não terem medido esforços para me propiciar uma educação de qualidade, mesmo com todas as dificuldades.

Ao meu irmão Artur, por todos os momentos de diversão.

Ao meu cunhado Bruno, que faleceu em outubro de 2023 de maneira inesperada, por todos os momentos de bate papo e inspiração profissional.

A todos os meus familiares próximos, que torcem pelas minhas conquistas.

À professora Nádia, pela oportunidade de conduzir esta pesquisa, pelo apoio, confiança, desenvolvimento de pensamento crítico e por toda a compreensão de um novo momento de vida. O meu mais profundo muito obrigada!

Ao professor Richard e ao Departamento de Química da UFJF, pela generosidade, por todo o suporte e infraestrutura nas análises cromatográficas do projeto.

Ao professor Marcos Brandão, meu orientador de mestrado, que contribuiu fortemente na minha formação.

À equipe NUPICS. Em especial à Pollyana pela ajuda nos experimentos de atividade antioxidante e viabilidade celular, à Karla pela ajuda no desenho experimental das formulações e aquisição das matérias-primas, à Adriana pela ajuda na análise de viscosidade, e à Laura por todo o suporte em geral e incentivo. Também ao Urias, por toda a parceria, risadas e as mais diversas formas de ajuda na condução dos experimentos.

Ao José Márcio, por toda a ajuda concedida na realização dos experimentos nas mais diversas formas.

Ao laboratório LDNano da Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial nas pessoas dos professores Frederico Pittella e Guilherme Diniz, pela disponibilização do equipamento Zetasizer para a realização das análises das nanopartículas.

Ao laboratório de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFJF, em especial na pessoa da professora Mirian Rodarte, pela liofilização das amostras de nanopartículas.

À professora Thais Barradas da Faculdade de Farmácia da UFJF, pelas discussões científicas sobre Nanotecnologia e ajuda na realização da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

À professora Ana Cláudia Chagas da Faculdade de Farmácia da UFJF, pela disponibilização do microscópio de luz invertida para a realização dos experimentos em cultura de células e por todas as explicações concedidas sobre o tema.

Ao professor Luiz Fernando Capa do Departamento de Química da UFJF, pela disponibilização do Microscópio Eletrônico de Varredura.

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia, pelo suporte para a realização deste trabalho nas mais diversas formas de ajuda.

À Unidade de Microscopia Avançada do CENABIO da UFRJ, em especial na pessoa da Adélia Lima, pela parceria na realização da análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Ao Programa de Pós-graduação em Saúde pelo suporte e à FAPEMIG, pela bolsa de doutorado concedida.

“A Educação é a arma mais poderosa que você pode usar para mudar o mundo”.  
(Nelson Mandela)

## RESUMO

A busca por produtos que empreguem insumos naturais na composição, com propostas minimalistas e veganas, caracterizam as tendências do novo mercado de cosméticos. Uma lacuna neste segmento é o desenvolvimento de formulações para a pele negra. Portanto, o objetivo do presente estudo foi o desenvolvimento de cosméticos para cuidados faciais desse tipo de pele, empregando uma mistura de óleos vegetais oriundos da biodiversidade brasileira (copaíba e maracujá) apresentados como *Cannabinoid Active System* (CBA<sup>®</sup>) e nanoencapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs). O perfil fitoquímico do CBA<sup>®</sup> foi obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, evidenciando composição sesquiterpênia majoritária. O CLN foi desenvolvido empregando homogeneização por alto cisalhamento seguido de ultrassonicação e apresentou diâmetro hidrodinâmico médio de  $220,5 \pm 4,1$  nm; índice de polidispersão médio de  $0,237 \pm 0,007$ ; potencial zeta médio de  $-21,3 \pm 2,6$  mV e eficiência de encapsulação de 98,68%. Ademais, exibiu morfologia esférica por microscopia eletrônica de transmissão e estabilidade por 90 dias a 4°C. Os CLNs demonstraram atividade antioxidante baixa (19,2 a 23,6%) pela metodologia DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), toxicidade aguda moderada em *Artemia salina* (dose letal 50% de  $370,00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de óleo CBA<sup>®</sup>) e diminuição da viabilidade celular de maneira dose-dependente em linhagem celular L929 de fibroblastos murinos. Formulações apresentadas como bruma, sérum e creme foram desenvolvidos com o CLN, sendo que as duas primeiras foram avaliadas quanto ao controle de qualidade e estabilidade físico-química, demonstrando estabilidade ao abrigo da luz solar por 90 dias. Ademais, o sérum foi estudado quanto à *performance in vitro*, apresentando fator de oclusão de  $58,00 \pm 1,64\%$  em 48 horas. Portanto, nanocosméticos veganos inovadores propostos para o cuidado facial da pele negra foram obtidos. A propriedade de hidratação mediada pela formação de filme oclusivo foi demonstrada para os CLNs incorporados no sérum. Assim, essa forma farmacêutica pode atuar na redução da perda de água transepidermal (TEWL), característica importante na hidratação da pele negra, que tende a possuir maior TEWL.

Palavras-chave: Cosméticos. Estabilidade de cosméticos. Nanotecnologia.

Nanopartículas lipídicas. Óleos vegetais.

## ABSTRACT

The search for products that use natural inputs in the composition, with minimalist and vegan proposals, characterizes the new market of cosmetic products. A gap in this sector is the development of products for skin of color. Therefore, the aim of this current study is the development of cosmetics for facial care of black skin using a mix of vegetable oils from Brazilian biodiversity (copaiba and passion fruit) presented as *Cannabinoid Active System* (CBA<sup>®</sup>) encapsulated in nanostructured lipid carriers (NLCs). The phytochemical screening of CBA<sup>®</sup> was obtained by gas chromatography-mass spectrometry, and it showed majority sesquiterpene composition. The NLC was developed using high shear homogenization followed by ultrasonication. The average hydrodynamic diameter, polydispersity index, zeta potential and encapsulation efficiency were  $220.5 \pm 4.1$  nm;  $0.237 \pm 0.007$ ;  $-21.3 \pm 2.6$  mV and 98.68, respectively. Moreover, it showed spherical structure by transmission electron microscopy, and remained stable for 90 days at 4°C. The NLC showed low antioxidant activity from 19.2 to 23.6% by the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil) assay method, moderate acute toxicity against *Artemia salina* (lethal dose 50 equal to  $370.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  of CBA<sup>®</sup> oil) and it decreased the cell viability in a dose-dependent manner in the L929 cell line of murine fibroblasts. Formulations presented as mist, serum and cream were developed with NLC, with the first two being evaluated for physical-chemical quality control and stability, demonstrating stability protected from sunlight for 90 days. Furthermore, the serum was studied for *in vitro* performance, and it exhibited an occlusion factor of  $58,00 \pm 1.64\%$  in 48 hours. Therefore, innovative vegan nanocosmetics proposed for facial care of black skin were obtained. The hydration property due to film formation was demonstrated for the NLCs incorporated in the serum. Thus, this pharmaceutical form can reduce transepidermal water loss (TEWL), an important characteristic on the skin of color hydration, which tends to have greater TEWL.

Keywords: Cosmetics. Cosmetic stability. Nanotechnology. Lipid nanoparticles. Vegetable oils.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática das camadas da pele humana.....	27
Figura 2 – Esquema dos principais fatores que influenciam nas propriedades da pele humana .....	29
Figura 3 – Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação dos cosméticos hidratantes.....	35
Figura 4 – Árvore da copaíba ( <i>Copaifera officinalis</i> ) e fruto do maracujá ( <i>Passiflora edulis</i> ).....	42
Figura 5 – Estruturas químicas do $\beta$ -cariofileno e ácido linoleico.....	42
Figura 6 – Cosméticos encontrados no mercado contendo CBA® .....	44
Figura 7 – Esquema ilustrativo dos nanomateriais utilizados nos cuidados com a pele .....	47
Figura 8 – Ilustração das rotas prováveis de penetração de nanopartículas através da pele incorporadas em cosméticos .....	52
Figura 9 – Esquema ilustrativo do efeito oclusivo dos carreadores lipídicos nanoestruturados.....	54
Figura 10 – Ilustração da bioimpressão de modelos de pele humana para substituir os procedimentos com testes em animais .....	57
Figura 11 – Esquema ilustrativo do preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados .....	67
Figura 12 – Esquema ilustrativo da técnica de ultrafiltração em centrífuga .....	69
Figura 13 – <i>Artemia salina</i> em água marinha artificial.....	77
Figura 14 – Linhagem celular L929 de fibroblasto murino em microscópio invertido	80
Figura 15 – Câmara de fotoestabilidade utilizada no ensaio de exposição à radiação luminosa .....	87
Figura 16 – Amostra depositada sobre placa de vidro lisa para análise de espalhabilidade .....	91
Figura 17 – <i>Fingerprint</i> obtido para o CBA® por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.....	93
Figura 18 – Principais sesquiterpenos identificados por Espectrometria de Massas no CBA® .....	94
Figura 19 – Ilustração do carreador lipídico nanoestruturado desenvolvido .....	98

Figura 20 – Dispersão coloidal obtida para a nanopartícula controle e a nanopartícula amostra .....	100
Figura 21 – Curvas de distribuição obtidas para a análise de diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas .....	101
Figura 22 – Cromatograma obtido na análise de eficiência de encapsulação das nanopartículas .....	105
Figura 23 – Micrografias obtidas na análise de Microscopia Eletrônica de varredura das nanopartículas.....	107
Figura 24 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão para os carreadores lipídicos nanoestruturados .....	108
Figura 25 – Dispersão do carreador lipídico nanoestruturado e formulações cosméticas desenvolvidas .....	122
Figura 26 – Demonstração da homogeneidade das formulações preparadas .....	122
Figura 27 – Creme facial (emulsão A/O) desenvolvido com os nanocarreadores...	127
Figura 28 – Microcápsulas Deepercaps® com pigmentos para a pele negra .....	128
Figura 29 – Aspecto final do creme facial desenvolvido.....	128
Figura 30 – Formulações após o teste de centrifugação na estabilidade preliminar .....	131
Figura 31 – Formulações após o teste de estresse térmico na estabilidade preliminar .....	131
Figura 32 – Formulação sérum no início e 90 dias após o estudo de estabilidade acelerada .....	134
Figura 33 – Formulação bruma no início e 90 dias após o estudo de estabilidade acelerada .....	135

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade antioxidante das nanopartículas e CBA®.....	112
Gráfico 2 – Resultados da análise de viabilidade celular em linhagem L929 de fibroblastos murinos.....	117
Gráfico 3 – Valores de pH para o estudo de estabilidade acelerada.....	132
Gráfico 4 – Perfil de espalhabilidade <i>in vitro</i> do sêrum em modelo de placa lisa ....	138
Gráfico 5 – Comparação dos fatores de oclusão obtidos para as amostras avaliadas .....	139

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação de Fitzpatrick dos fototipos de pele baseada em tendência auto-referida de queimaduras solares e bronzeamento.....	30
Quadro 2 – Principais nanomateriais utilizados na obtenção de cosméticos e suas propriedades .....	51
Quadro 3 – Resultados obtidos para a análise do parâmetro organoléptico cor no estudo de estabilidade acelerada para a bruma .....	133
Quadro 4 – Resultados obtidos para a análise do parâmetro organoléptico cor no estudo de estabilidade acelerada para o sérum .....	133

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> para estudar o efeito da proporção do tensoativo e do lipídeo sólido sobre o carreador lipídico nanoestruturado.....	65
Tabela 2 – Preparo das soluções estoque de CBA <sup>®</sup> <i>in natura</i> e nanopartículas para o ensaio de toxicidade aguda .....	78
Tabela 3 – Preparo das soluções estoque de CBA <sup>®</sup> <i>in natura</i> e nanopartículas para o ensaio de viabilidade celular .....	80
Tabela 4 – Composição da formulação cosmética bruma facial .....	82
Tabela 5 – Composição da formulação cosmética sérum facial.....	82
Tabela 6 – Composição da formulação cosmética creme facial.....	84
Tabela 7 – Composição sesquiterpênica obtida para o CBA <sup>®</sup> .....	94
Tabela 8 – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as proporções dos constituintes do nanocarreador .....	96
Tabela 9 – Efeitos e erros padrão calculados no planejamento experimental realizado no estudo da otimização da proporção dos constituintes do nanocarreador .....	97
Tabela 10 – Resultados obtidos na caracterização físico-química dos nanocarreadores.....	99
Tabela 11 – Resultados obtidos para a análise de limite de quantificação do método .....	104
Tabela 12 – Resultados obtidos no estudo de estabilidade físico-química das nanopartículas armazenadas em geladeira (4°C).....	110
Tabela 13 – Resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda.....	114
Tabela 14 – Resultados obtidos para as formulações cosméticas desenvolvidas ..	123
Tabela 15 – Valores de pH antes e após o teste de centrifugação na estabilidade preliminar .....	130
Tabela 16 – Valores de pH antes e após o teste de estresse térmico na estabilidade preliminar .....	130
Tabela 17 – Resultados para a análise de controle de qualidade das formulações	136

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água/óleo
CBA <sup>®</sup>	<i>Cannabinoid Active System</i>
CBD	Canabidiol
CG-EM	Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas
Cl <sub>50</sub>	Concentração que reduz a viabilidade celular em 50%
CLN	Carreador Lipídico Nanoestruturado
CLN-OC	Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA <sup>®</sup>
COSMOS	<i>COSMetics Organic Standard</i>
CV	Coefficiente de Variação
DL <sub>50</sub>	Dose Letal 50%
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil (do inglês <i>1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil</i> )
ECS	Sistema Endocanabinoide (do inglês <i>Endocannabinoid System</i> )
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> )
EE	Eficiência de Encapsulação
F	Fator de oclusão
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPS	Fator de Proteção Solar
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico (do inglês <i>4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> )
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
INCI	<i>International Nomenclature Cosmetic Ingredient</i>

iPSC	Célula Tronco Pluripotente Induzida ( <i>Induced Pluripotent Stem Cell</i> )
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de Detecção
Log P	Coeficiente de Partição
LQ	Limite de Quantificação
m/v	Massa/volume
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico] (do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide</i> )
NATRUE	<i>The International Natural and Organic Cosmetic Association</i>
NL-C	Nanopartícula Lipídica Controle
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
O/A	Óleo/água
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
p/p	Porcentagem em peso
PI	Índice de Polidispersão (do inglês <i>Polydispersity Index</i> )
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TACC	Triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico
TFS	Tampão Fosfato Salino
TEWL	Perda de Água Transepidermal (do inglês <i>Transepidermal Water Loss</i> )
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume
Vis	Visível
v/m	Volume/massa

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
Da	Dalton
nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µg	Micrograma
m	Metro
mm	Milímetro
mL	Mililitro
min	Minuto
eV	Elétron-volt
AMU	Unidade de Massa Atômica (do inglês <i>Atomic Mass Unity</i> )
%	Porcentagem
g	Gramma
mg	Miligrama
L	Litro
h	Hora
kV	Kilovolt
cm	Centímetro
d	Diâmetro
mPa	MiliPascal
s	Segundo

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
2.1	PELE .....	25
2.1.1	<b>Estrutura da pele</b> .....	<b>25</b>
2.1.2	<b>Propriedades e funções da pele</b> .....	<b>27</b>
2.1.3	<b>Pele negra</b> .....	<b>29</b>
2.2	DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICOS.....	31
2.2.1	<b>Fórmulas para hidratação da pele</b> .....	<b>33</b>
2.2.2	<b>Tendências mercadológicas</b> .....	<b>35</b>
2.2.3	<b>Aspectos regulatórios: estabilidade e controle de qualidade</b> .....	<b>38</b>
2.3	BIODIVERSIDADE BRASILEIRA E OS ÓLEOS VEGETAIS .....	40
2.3.1	<b>Mistura de óleos vegetais CBA®</b> .....	<b>41</b>
2.3.1.1	<i>Canabinoides-like</i> .....	44
2.4	NANOTECNOLOGIA.....	46
2.4.1	<b>Nanotecnologia aplicada a cosméticos</b> .....	<b>50</b>
2.4.2	<b>Segurança e eficácia de nanocosméticos: novas abordagens</b> .....	<b>54</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>61</b>
3.1	GERAL .....	61
3.2	ESPECÍFICOS .....	61
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>62</b>
4.1	AMOSTRA, REAGENTES, PADRÃO ANALÍTICO E EQUIPAMENTOS....	62
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO CBA® QUANTO AO PERFIL FITOQUÍMICO .....	63
4.3	DESENVOLVIMENTO DO CLN .....	64
4.3.1	<b>Caracterização físico-química do CLN</b> .....	<b>67</b>
4.3.1.1	<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, PI e potencial zeta</i> .....	67
4.3.1.2	<i>Determinação da eficiência de encapsulação</i> .....	68
4.3.1.2.1	Estudo de solubilidade do $\beta$ -cariofileno em água .....	70
4.3.1.2.2	Determinação do limite de quantificação do método .....	71
4.3.1.3	<i>Determinação da morfologia do CLN por Microscopia Eletrônica</i> .....	72
4.3.1.3.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	72
4.3.1.3.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	73
4.3.2	<b>Avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas</b> .....	<b>73</b>

4.3.3	<b>Determinação da densidade da dispersão aquosa dos CLNs.....</b>	<b>74</b>
4.3.4	<b>Cálculo da proporção óleo/sistema nanoparticulado na condição ótima .....</b>	<b>74</b>
4.4	TRIAGEM DE AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i> DOS CLNS.....	75
4.4.1	<b>Atividade antioxidante .....</b>	<b>75</b>
4.4.2	<b>Toxicidade aguda .....</b>	<b>77</b>
4.4.3	<b>Viabilidade celular.....</b>	<b>79</b>
4.5	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS.....	82
4.5.1	<b>Desenvolvimento da bruma e sérum faciais.....</b>	<b>82</b>
4.5.2	<b>Desenvolvimento do creme facial.....</b>	<b>83</b>
4.5.3	<b>Estabilidade físico-química da bruma e do sérum .....</b>	<b>85</b>
4.5.3.1	<i>Avaliação da estabilidade preliminar .....</i>	<i>85</i>
4.5.3.2	<i>Avaliação da estabilidade acelerada .....</i>	<i>86</i>
4.5.4	<b>Controle de qualidade físico-químico da bruma e do sérum.....</b>	<b>88</b>
4.5.4.1	<i>Determinação das características organolépticas .....</i>	<i>88</i>
4.5.4.2	<i>Determinação do pH.....</i>	<i>88</i>
4.5.4.3	<i>Determinação da densidade.....</i>	<i>89</i>
4.5.4.4	<i>Determinação da viscosidade do sérum.....</i>	<i>89</i>
4.5.5	<b>Testes de <i>performance in vitro</i> da formulação sérum facial .....</b>	<b>90</b>
4.5.5.1	<i>Avaliação da espalhabilidade .....</i>	<i>90</i>
4.5.5.2	<i>Avaliação da oclusividade .....</i>	<i>91</i>
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO CBA® QUANTO AO PERFIL FITOQUÍMICO .....	93
5.2	DESENVOLVIMENTO DO CLN .....	96
5.2.1	<b>Caracterização físico-química do CLN .....</b>	<b>98</b>
5.2.1.1	<i>Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, PI e potencial zeta .....</i>	<i>98</i>
5.2.1.2	<i>Determinação da eficiência de encapsulação .....</i>	<i>103</i>
5.2.1.3	<i>Determinação da morfologia do CLN por Microscopia Eletrônica .....</i>	<i>106</i>
5.2.1.3.1	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</i>	<i>106</i>
5.2.1.3.2	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....</i>	<i>108</i>
5.2.2	<b>Avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas .....</b>	<b>109</b>
5.2.3	<b>Determinação da densidade da dispersão aquosa dos CLNs.....</b>	<b>111</b>
5.2.4	<b>Cálculo da proporção óleo/sistema nanoparticulado na condição ótima .....</b>	<b>112</b>

5.3	TRIAGEM DE AVALIAÇÕES <i>IN VITRO</i> DOS CLNS.....	112
5.3.1	<b>Atividade antioxidante .....</b>	<b>112</b>
5.3.2	<b>Toxicidade aguda .....</b>	<b>114</b>
5.3.3	<b>Viabilidade celular .....</b>	<b>116</b>
5.4	DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS .....	120
5.4.1	<b>Desenvolvimento da bruma e sérum faciais .....</b>	<b>122</b>
5.4.2	<b>Desenvolvimento do creme facial.....</b>	<b>124</b>
5.4.3	<b>Estabilidade físico-química da bruma e do sérum .....</b>	<b>129</b>
5.4.3.1	<i>Avaliação da estabilidade preliminar .....</i>	<i>129</i>
5.4.3.2	<i>Avaliação da estabilidade acelerada .....</i>	<i>131</i>
5.4.4	<b>Controle de qualidade físico-químico da bruma e do sérum.....</b>	<b>136</b>
5.4.5	<b>Testes de <i>performance in vitro</i> da formulação sérum facial .....</b>	<b>138</b>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>143</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>145</b>
	<b>ANEXO A – CERTIFICADO DE ANÁLISE DO ÓLEO CBA® .....</b>	<b>170</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os cosméticos compreendem uma categoria de produtos de saúde e beleza que são usados externamente nas diversas partes do corpo humano “com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado” (Brasil, 2015). São produtos amplamente utilizados a pelo menos 7000 anos e estão atrelados à identidade e expressão pessoal de cada consumidor, sendo um setor que passa por diferentes flutuações conforme as tendências do mercado (Surya; Gunasekaran, 2021).

Atualmente e, principalmente, no período pós-pandemia de COVID-19, novas demandas foram surgindo pelos consumidores desse tipo de produto (Dini; Laneri, 2021). Eles buscam por formulações atreladas à tendência *clean beauty* (beleza limpa) (Kalil et al., 2022), produtos com o menor número possível de constituintes (minimalismo), matérias-primas preferencialmente naturais (Dini; Laneri, 2021) e fórmulas veganas (Lee; Kwon, 2022).

Novos nichos de mercado também são uma realidade no setor de cosméticos e o desenvolvimento de produtos para pessoas com a pele negra é um deles. Esse tipo de pele possui especificidades biológicas, funcionais e estruturais que justificam a busca por formulações específicas. De maneira geral, se caracteriza por possuir um número maior de melanossomas (Brown-Korsah et al., 2022); estrato córneo com mais camadas de células e mais compacto devido à maior coesão intercelular (Alchorne; Abreu, 2008); maior perda de água transepidérmica (*Transepidermal Water Loss – TEWL*) (Sugino; Imokawa; Maibach, 1993); maior quantidade de fibroblastos, dimensionalmente maiores e hiperativos (Girardeau-Hubert et al., 2009) e maior produção de sebo (Alchorne; Abreu, 2008).

Diante do cenário apresentado, é importante destacar a necessidade e a relevância de pesquisas no setor de inovação cosmética, buscando produtos que atendam às novas exigências dos consumidores e que apresentem um perfil de segurança adequado (Infante; Melo; Maia Campos, 2018).

Outro fato relevante para o setor foi a proibição da utilização de animais na pesquisa e desenvolvimento de cosméticos, levando à busca por metodologias *in vitro*, consideradas alternativas e que possam demonstrar a segurança e a eficácia das formulações (Barthe et al., 2021), merecendo destaque os testes com cultura de

células 2D e 3D (Langhans, 2008), bioensaios empregando organismos invertebrados, plantas, algas e microrganismos (Hassan et al., 2016) e a utilização crescente da engenharia de tecidos, representada pelos órgãos-em-chip (Filaire et al., 2022), bioimpressão 3D (Soman; Vijayavenkataraman, 2020) e modelos de pele artificiais produzidos em laboratório (Nabarretti et al., 2022).

A busca por cosméticos que empreguem matérias-primas vegetais na sua composição gera um desafio farmacotécnico, devido à baixa estabilidade (degradações física e química) e solubilidade dessas matérias-primas (Dewi et al., 2022). Nesse sentido, as formulações cosméticas naturais baseadas em nanotecnologia vêm ganhando espaço nas últimas décadas, devido ao seu potencial de reduzir as desvantagens associadas à incorporação de matérias-primas vegetais (Kaul et al., 2018; Mohd-Setapar et al., 2022). Alguns sistemas nanotecnológicos têm sido propostos, principalmente aqueles que são biocompatíveis, biodegradáveis e baseados em polímeros, lipídeos e nanoemulsões (Dewi et al., 2022).

As nanopartículas lipídicas são as mais empregadas na obtenção de produtos tópicos (Jyothi et al., 2022; Küchler et al., 2009) sendo que, no mercado de cosméticos atual, existem diversos produtos que as empregam. Dentre eles, é possível citar: Creme corporal Allure® da Chanel, creme Nanorepair Q10® e creme Nanovital Q10® da Dr. Rimpler, creme VITAMINA - *Masque Creme Fraicheur aux Fruits*® da Isabelle Lancray, sérum Phyto NLC *Active Cell Repair*® da Sirehemas e creme Olivenol® da Medipharma (Pareek et al., 2025).

As nanopartículas lipídicas são basicamente compostas de lipídeos e surfactantes, com as substâncias ativas encapsuladas, incorporadas e/ou adsorvidas na superfície. Esse grupo compreende as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs). A composição do núcleo dessas nanopartículas consiste na principal diferença entre elas, de modo que os CLNs possuem uma mistura de lipídeos líquido e sólido no núcleo, enquanto as NLSs são formadas apenas pelo lipídeo sólido (Viegas et al., 2023).

No que concerne ao desenvolvimento de formulações hidratantes, as nanopartículas lipídicas possuem uma função peculiar de formação de filme oclusivo sobre o estrato córneo (Gupta et al., 2013; Wissing; Müller, 2002), demonstrada *in vitro* e *in vivo* (Montenegro et al., 2017), que diminui a TEWL e, conseqüentemente, contribui para o aumento da hidratação da pele (Chauhan et al., 2020).

A busca por cosméticos naturais reflete no setor da indústria, que está em crescente demanda pela descoberta de novas matérias-primas. Nesse âmbito, merece destaque o *Cannabinoid Active System* (CBA<sup>®</sup>), uma mistura de dois óleos vegetais provenientes da biodiversidade brasileira (copaíba – *Copaifera officinalis* e maracujá – *Passiflora edulis*), desenvolvido pela empresa Beraca (atualmente Grupo Clariant). Essa matéria-prima vegetal tem a proposta de atuação canabinoide-like, ou seja, com capacidade de modulação do Sistema Endocanabinoide (ECS) presente no organismo (Clariant, 2023). Trata-se de uma alternativa natural ao uso do canabidiol (CBD), um fitocanabinoide isolado de *Cannabis* sp. com diversas propriedades medicinais (Pisanti et al., 2017), já que a legislação sanitária brasileira vigente não permite a utilização do CBD em formulações cosméticas (Brasil, 2019).

Nos últimos anos, os óleos vegetais têm ganhado ainda mais destaque como matéria-prima para o desenvolvimento de cosméticos (Neto; Batista; Meirelles, 2020). Eles são obtidos, principalmente, pelo processo de extração a frio dos grãos, sementes, cereais, frutas e outras partes das plantas (Lima et al., 2021), apresentando composição fitoquímica diversa (Masiero et al., 2021; Orchard; Van Vuuren, 2019), geralmente caracterizada pela maior presença de ácidos graxos insaturados (Guidoni et al., 2019). De maneira diferente, o óleo CBA<sup>®</sup>, por se tratar de uma mistura do óleo da resina da copaíba e da semente do maracujá possui, além dos ácidos graxos, uma composição rica em sesquiterpenos (Clariant, 2023).

Portanto, diante de todo o cenário exposto, o presente trabalho propõe como objetivo o desenvolvimento de fórmulas cosméticas inovadoras (bruma, sérum e creme faciais), baseadas em nanotecnologia, atreladas aos conceitos de *clean beauty* e veganismo, para o cuidado facial da pele negra. Para tanto, CLNs contendo óleo CBA<sup>®</sup> como insumo natural foram desenvolvidos, caracterizados e avaliados quanto a propriedades biológicas e toxicológicas *in vitro*. Ademais, foram incorporados em formulações e, como principal propriedade, foi avaliada a capacidade de hidratação proveniente do mecanismo de formação de filme oclusivo dos mesmos, vislumbrando a restauração da função barreira da pele negra, com sensorial e estabilidade satisfatórios.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 PELE

#### 2.1.1 Estrutura da pele

A pele humana é composta por diversos tecidos que juntos desempenham a função de manter as condições internas do corpo (homeostase), além de proteger o organismo contra danos externos. É composta por três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme (Hofmann et al., 2023).

A epiderme é a camada mais superficial que interage com o meio ambiente. Ela é responsável por criar uma barreira eficaz contra toxinas, patógenos e desidratação, sendo constituída por 4 subcamadas (estratos) nomeadas como: estratos córneo, granuloso, espinhoso e basal (Salvioni et al., 2021). Os queratinócitos são o principal tipo celular encontrado na epiderme, porém melanócitos, células de Merkel e de Langerhans também estão presentes (Hofmann et al., 2023).

Os queratinócitos em diferentes estágios de maturação produzem diversos tipos de queratinas, que fornecem suporte estrutural e desempenham papel importante na viabilidade celular e nas vias de sinalização associadas com a síntese de proteínas, crescimento e diferenciação celular (Hofmann et al., 2023). Os corneócitos são queratinócitos diferenciados, caracterizados por serem células mortas anucleadas, compactados com queratinas e rodeados por uma estrutura polimérica resistente, chamada de envelope celular cornificado, que possui composição lipoprotéica. Eles constituem o estrato mais externo da epiderme (estrato córneo) responsável pela proteção contra a TEWL (função barreira do estrato córneo) (Kahraman et al., 2019), sendo considerado um estrato lipofílico (somente 15% de água), enquanto os outros estratos, que compõem a epiderme viável exibem um caráter mais hidrofílico (75% de água) (Salvioni et al., 2021).

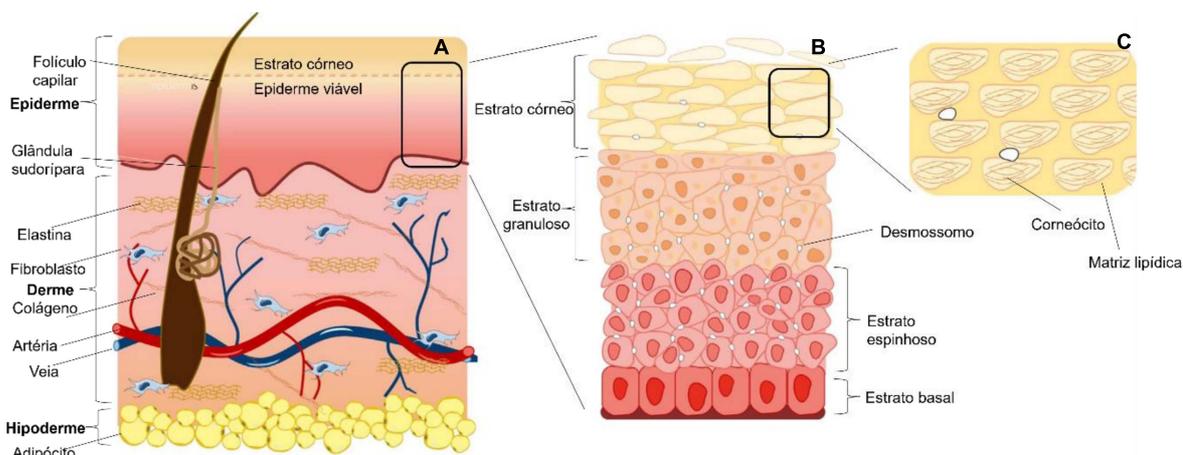
A derme é a camada da pele responsável principalmente pela termorregulação, através do controle de suprimento sanguíneo, fornecendo sangue rico em oxigênio para a epiderme, bem como removendo produtos residuais dessa camada (Hofmann et al., 2023). É composta principalmente por fibroblastos, um

retículo de colágeno e fibras de elastina em uma matriz proteoglicana. Trata-se de uma camada mais heterogênea que a epiderme e se assemelha a uma rede complexa, que compreende tecido conectivo, vasos sanguíneos, terminações nervosas, folículos pilosos e glândulas. O colágeno e a elastina conferem força e flexibilidade à pele, enquanto proteoglicanos como o ácido hialurônico contribuem para a hidratação e a viscosidade do tecido (Meléndez-Martínez; Stinco; Mapelli-Brahm, 2019). As fibronectinas possuem papel essencial na cicatrização de feridas e estão envolvidas na adesão, crescimento, migração e diferenciação celular. Além disso, é importante ressaltar que a maioria das células imunocompetentes da pele, como células dendríticas, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos B e T, são encontradas na derme. Tais células desempenham papel importante na prevenção de infecções e reconstrução do tecido danificado (Hofmann et al., 2023).

A hipoderme, também conhecida como camada subcutânea, consiste basicamente em tecido conjuntivo frouxo, que isola e protege a pele (Hofmann et al., 2023). O tecido é rico em proteoglicanos e glicosaminoglicanos, substâncias que atraem fluidos para essa camada e conferem propriedades semelhantes à mucosa. Os tipos celulares encontrados são fibroblastos, adipócitos e macrófagos. A gordura é armazenada na forma de grandes gotículas de lipídeos dentro de adipócitos maduros e funciona como uma reserva de energia para o corpo, além da função de isolamento térmico e proteção contra os choques mecânicos (Wong et al., 2016).

Na Figura 1 tem-se um esquema representativo das camadas da pele, destacando a epiderme e o estrato córneo.

Figura 1 – Representação esquemática das camadas da pele humana



Fonte: Adaptado de Salvioni et al. (2021).  
 A: Pele. B: Epiderme. C: Estrato córneo.

### 2.1.2 Propriedades e funções da pele

O pH (potencial de hidrogênio iônico) fisiológico da superfície da pele (estrato córneo) na maior parte das regiões do corpo humano é ácido (faixa 4,1-5,8). Na face, por exemplo, é possível encontrar áreas com valores maiores de pH, como o queixo (pH 5,6) e áreas com valores menores, como a testa (pH 4,4) e a pálpebra superior (pH 4,6). Já outras regiões do corpo como axilas, virilha e ânus possuem valores de pH entre 6,1 e 7,4. A manutenção do caráter ácido da pele possui relação direta com a sua microbiota, de modo que um aumento no valor de pH favorece a ocorrência de infecções, reações eczematosas e doenças inflamatórias (Proksch, 2018).

O pH ácido da pele também está relacionado com a função barreira do estrato córneo. Na presença de pH neutro, a matriz lamelar lipídica intercelular perde a capacidade de formação eficaz de uma função barreira, pois ocorre uma diminuição da atividade da enzima beta-glucocerebrosidase (responsável pela formação de ceramidas) e da secreção lipídica através das camadas celulares basais (Kahraman et al., 2019). Somado a isso, o processo de regeneração dessa barreira ocorre em um ambiente ácido, enquanto na presença de pH neutro, o processo de regeneração é mais lento (Proksch, 2018).

A proteção natural contra a radiação ultravioleta (UV) é outra função importante da pele, sendo o grau de penetração da luz na pele dependente do

comprimento de onda. Dessa forma, quanto maior o comprimento de onda (e menor a energia da radiação) mais profunda é a penetração (Abdo; Sopko; Milner, 2020). Tal proteção está relacionada com o pigmento melanina, sintetizado nos melanócitos (células presentes nas camadas basal e suprabasal da epiderme) em resposta à produção do hormônio alfa-melanócito estimulante ou melanocortina (MSH), após a exposição da pele à radiação UV. Dois tipos diferentes de pigmento de melanina são produzidos, a eumelanina e a feomelanina, que diferem na cor e na via de biossíntese (Horrell; Boulanger; D'Orazio, 2016). A proteção artificial contra a luz ultravioleta (UVA: 320-400 nm e UVB: 280-320 nm) está relacionada à prevenção de lesões de diferentes gravidades, incluindo queimaduras solares, imunossupressão, fotocarcinogênese e fotoenvelhecimento (Abdo; Sopko; Milner, 2020).

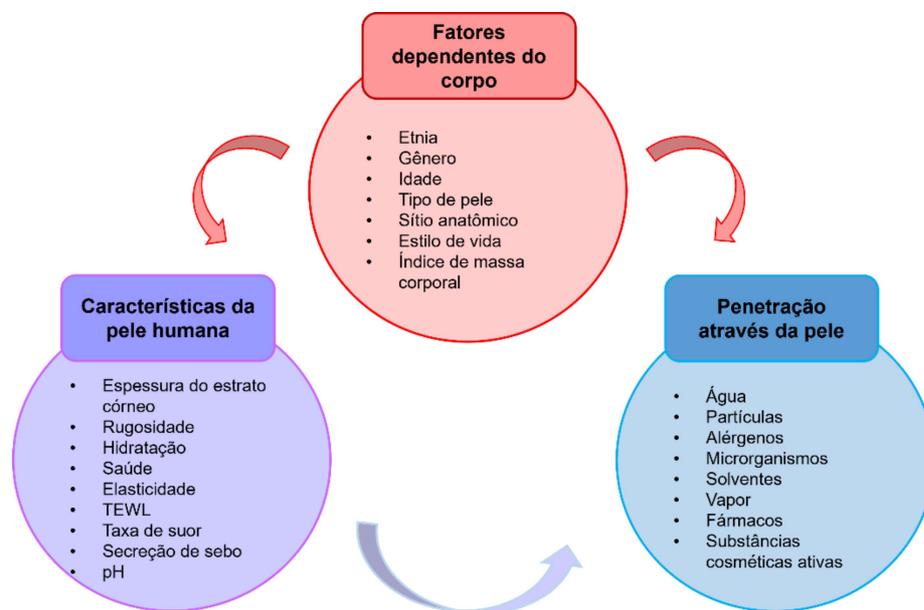
Outra função de destaque é a síntese de vitamina D. A epiderme é considerada a maior fonte de vitamina D para os seres humanos, sendo que a radiação UV (especificamente UVB) através da quebra do anel B permite a conversão do 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D<sub>3</sub>, que se isomeriza a vitamina D<sub>3</sub>. Posteriormente, a vitamina D<sub>3</sub> sofre uma primeira hidroxilação no fígado originando a 25-hidroxivitamina D, seguido por uma segunda hidroxilação nos rins, com consequente formação da 1,25-dihidroxivitamina D (forma ativa) (Abdo; Sopko; Milner, 2020). O 7-desidrocolesterol está presente na membrana plasmática dos queratinócitos basais e suprabasais e nos fibroblastos dérmicos. Além disso, os queratinócitos possuem enzimas que catalisam a conversão da vitamina D na sua forma ativa, a 1,25-dihidroxivitamina D (Meléndez-Martínez; Stinco; Mapelli-Brahm, 2019).

A pele recebe, processa e transmite informações ambientais a partir de múltiplos receptores, possuindo função sensorial. Entre os queratinócitos basais na epiderme estão as células de Merkel. Essas células mecanorreceptoras de adaptação lenta detectam o toque leve, assim como características como curvatura e borda. Os axônios mielinizados perdem a sua bainha de mielina, penetram na lâmina basal e ramificam para suprir até 50 células de Merkel, sendo a possível comunicação entre esses dois tipos celulares mediada por receptores alfa-adrenérgicos em sinapses excitatórias (Hoffman et al., 2018). Dois tipos de receptores sensoriais são encontrados na derme: terminações nervosas livres (para nocicepção e sensação térmica) e mecanorreceptores capsulados, como os

corpúsculos de Meissner, que detectam o toque em movimento e os corpúsculos de Pacini, que captam a vibração e o toque breve (Feito et al., 2018).

As propriedades da pele, relacionadas diretamente com as suas funções, são dependentes de múltiplos aspectos, conforme apresentado na Figura 2. Alguns dos fatores relacionados ao indivíduo são congênitos. Dentre eles, a etnia e o gênero possuem menor influência nas propriedades da pele (Dabrowska et al., 2017).

Figura 2 – Esquema dos principais fatores que influenciam nas propriedades da pele humana



Fonte: Adaptado de Dabrowska et al. (2017).

TEWL: Perda de água transepidermal (do inglês, *Transepidermal Water Loss*).

### 2.1.3 Pele negra

Do ponto de vista de cor ou raça, a população brasileira se divide em: brancos, pretos, pardos, amarelos e indígenas. Devido à sua característica de miscigenação, prevalece o critério de autodeclaração para fins estatísticos (Alchorne; Abreu, 2008). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) provenientes da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD) contínua, 56,1% da população se autodeclara como preta e parda no país (IBGE, 2021).

Não há um consenso internacional para a definição de pele negra. Na tentativa de realizar uma uniformização, a Dermatologia utiliza um sistema de classificação de fototipos de pele, denominada classificação de Fitzpatrick (Fitzpatrick, 1988). Ela é baseada na resposta da pele frente à exposição à radiação UV solar através da queimadura e do bronzeamento (Leme, 2023). Os fototipos foram divididos de I a VI, sendo o fototipo VI classificado como pele negra (Quadro 1). Entretanto, mesmo essa classificação tem controvérsias, pois os fototipos de pele nem sempre apresentam correlação linear com a cor da pele (Gupta; Sharma, 2019).

Quadro 1 – Classificação de Fitzpatrick dos fototipos de pele baseada em tendência auto-referida de queimaduras solares e bronzeamento

Fototipo de pele	Reação da pele
I	Sempre queima, nunca bronzeia
II	Usualmente queima, se bronzeia menos que a média
III	Às vezes se queima, se bronzeia igual a média
IV	Raramente se queima, se bronzeia mais que a média
V	Pele morena
VI	Pele negra

Fonte: Fitzpatrick (1988).

A pele negra possui algumas peculiaridades biológicas, funcionais e estruturais em relação aos outros tipos de pele. A quantidade de melanina na epiderme é maior, porém sem diferença no número de melanócitos. Na pele negra, os melanossomas são maiores, não agregados, com número aumentado na camada basal e distribuídos por todas as camadas da epiderme (Alchorne; Abreu, 2008; Brown-Korsah et al., 2022). Os melanossomas são organelas celulares encontradas nos melanócitos, onde a melanina é sintetizada a partir do aminoácido tirosina. Eles se comunicam com os queratinócitos para que a melanina seja transferida e exerça sua função de proteção contra a radiação UV (Moreiras; Seabra; Barral, 2021). O conteúdo de melanina oferece um fator de proteção solar (FPS) natural de 13,4 para a pele negra (Alchorne; Abreu, 2008).

O estrato córneo na pele negra possui mais camadas de células do que na pele branca, porém é mais compacto devido à maior coesão intracelular (Alchorne; Abreu, 2008). Na literatura ainda não há um consenso sobre o impacto das diferenças de raça na função barreira do estrato córneo (Brown-Korsah et al., 2022), porém a pele negra possui menos lipídeos e ceramidas (Jungersted et al., 2010) e,

segundo Sugino, Imokawa e Maibach (1993), esses níveis se relacionam de maneira inversamente proporcional com a TEWL, maior na pele negra do que na pele branca, e diretamente proporcional à quantidade de água, menor na pele negra.

Em relação à derme, os fibroblastos são maiores, bi ou multinucleados, em maior quantidade e hiperativos, o que aumenta a propensão ao desenvolvimento de queloides. Além disso, há redução na atividade da enzima colagenase (Girardeau-Hubert et al., 2009).

De acordo com Brown-Korsah e colaboradores (2022), as evidências na literatura não são conclusivas quanto à atividade das glândulas sebáceas e a produção de sebo. Todavia, existe relato de que as glândulas sudoríparas apócrinas são maiores, mais numerosas e produzem maior quantidade de secreção na pele negra e, embora não exista diferença no número de glândulas sebáceas na pele negra, elas são maiores e produzem maior quantidade de sebo (Alchorne; Abreu, 2008).

Quanto aos folículos pilosos, o número total de folículos terminais nos indivíduos negros é menor em comparação aos indivíduos de pele branca (Franbourg et al., 2003), além disso são curvados em forma espiral e possuem poucas fibras elásticas ancorantes na derme (Alchorne; Abreu, 2008).

Tais especificidades reportadas para a pele negra estão relacionadas com os tipos mais frequentes de dermatoses encontrados nesse tipo de pele, como as discromias, com alta incidência de hiperpigmentação perioral (Nijhawan; Alexis, 2011), hiperpigmentação pós-inflamatória (Davis; Callender, 2010) e o melasma (Nijhawan; Alexis, 2011), além da maior propensão ao desenvolvimento da acne (Alchorne; Abreu, 2008).

## 2.2 DESENVOLVIMENTO DE COSMÉTICOS

De acordo com a ANVISA (2015):

Os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são definidos como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externas, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Além da definição anteriormente apresentada, também podem ser produtos multifuncionais que visam oferecer diversos benefícios para a saúde da pele, além daqueles oferecidos pelos cosméticos simples, sendo nomeados como cosmecêuticos (Khater et al., 2021). Eles são formulados a partir de ingredientes bioativos naturais ou sintéticos, incluindo matéria-prima vegetal, vitaminas, antioxidantes, hidroxiácidos, peptídeos e outros (Martin; Glaser, 2011) e são considerados um nicho entre os produtos farmacêuticos e os cosméticos (Kaul et al., 2018).

Os cosméticos representam um setor crescente na indústria, principalmente os produtos de cuidados com a pele relacionados à hidratação, ao combate ao fotoenvelhecimento, à hiperpigmentação, às rugas, além de outras aplicações (Khater et al., 2021). O conceito de cuidados com a pele (*skin care*) engloba a limpeza, o perfume, o efeito calmante, a mudança de aparência e a proteção da pele; a alteração de odor do corpo; a manutenção do estado da pele em boa condição; a melhora e a restauração da função barreira da pele e da sua integridade (Surber; Kottner, 2017). Os produtos para cuidados com a pele possuem funcionalidades variáveis, desde monofuncionais, como os cremes para a restauração de função barreira da pele até os polifuncionais, a exemplo dos produtos de limpeza calmantes e restauradores da pele (Kouassi; Grisel; Gore, 2022).

O processo de desenvolvimento de formulações cosméticas para o cuidado com a pele envolve uma pesquisa detalhada e uma seleção criteriosa das matérias-primas (Penachin et al., 2022). Nessa etapa, algumas propriedades como estabilidade, pH dos insumos ativos, possíveis interações entre os ingredientes, características sensoriais e seleção de matérias-primas biocompatíveis de acordo com o tipo de pele, devem ser levadas em consideração (Calixto; Campos, 2017).

Um produto eficaz para o cuidado da pele contém um ou mais insumos ativos (por exemplo: antioxidantes, hidratantes, inibidores de melanina, antimicrobianos e anti-inflamatórios) que são incorporados em diferentes veículos, como gel, creme, sérum, loção, entre outros (Surber; Kottner, 2017). Dentre tais insumos pode-se citar as vitaminas A, C e E, os minerais selênio, zinco e cobre, os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 e 6, além dos polifenóis e carotenoides. Essas substâncias bioativas podem atuar restaurando e protegendo a função barreira da pele, protegendo contra os fatores externos e os danos induzidos pela inflamação. Além

disso, os antioxidantes atuam na captação das espécies reativas de oxigênio, diminuindo o dano oxidativo e desempenham papel importante no combate ao envelhecimento da pele (Michalak et al., 2021).

No processo de desenvolvimento de cosméticos diferentes tecnologias podem ser utilizadas, sendo importante destacar o emprego de microemulsões, nanoemulsões, nanopartículas e lipossomas, com o objetivo principal de obter uma entrega mais eficaz dos componentes ativos no sítio alvo (epiderme, derme) a fim de potencializar os benefícios esperados, assim como melhorar a estabilidade desses componentes ativos na formulação final (Das et al., 2020), uma vez que são geralmente sensíveis a diferentes fatores externos como luz, temperatura, oxigênio e pH (Kouassi; Grisel; Gore, 2022).

### **2.2.1 Fórmulas para hidratação da pele**

A função barreira da pele reside no estrato córneo, de modo que os corneócitos são rapidamente e continuamente renovados para manter a hidratação e a flexibilidade da pele, assim como a integridade estrutural e o reparo da pele danificada (Kahraman et al., 2019). Uma barreira cutânea disfuncional leva ao ressecamento da pele e pode ser causada por diversos fatores, dentre eles: predisposição genética, patologias (eczema e psoríase, por exemplo), agressões ocasionadas por condições ambientais oriundas do sol, vento ou ar-condicionado, exposição frequente a agentes químicos, como sabões e detergentes, utilização de medicamentos e envelhecimento (Barnes et al., 2021).

A pele seca apresenta processo de descamação defeituoso, onde os corneócitos são eliminados na forma de escamas visíveis, ocasionando textura áspera (cosmeticamente não atrativa) e com excessiva TEWL (Elias, 2005; Verdier-Sévrain; Bonté, 2007). Como consequência, esse tipo de pele é incapaz de ligar e reter a água de maneira eficiente, o que favorece a penetração de irritantes, alérgenos e microrganismos, gerando desconforto, coceira, irritação visível e vermelhidão (Umehara et al., 2021). Dessa forma, é importante a proteção eficaz tanto da pele saudável quanto da seca, a fim de preservar e/ou restaurar suas integridades funcional e estrutural (Verdier-sévrain; Bonté, 2007).

Os produtos cosméticos utilizados para a hidratação da pele atuam por diferentes mecanismos, são eles: umectação, emoliência, oclusão e hidratação ativa (Barnes et al., 2021; Souza et al., 2018). Os cosméticos umectantes penetram facilmente no estrato córneo e atuam como “esponjas biológicas” na atração e retenção da água na pele, seja pelo deslocamento de água da derme para epiderme ou do ambiente, quando a umidade atmosférica é maior que 80% (Barnes et al., 2021). São substâncias higroscópicas que se comportam de maneira similar ao fator de hidratação natural da pele (Spada; Barnes; Greive, 2018).

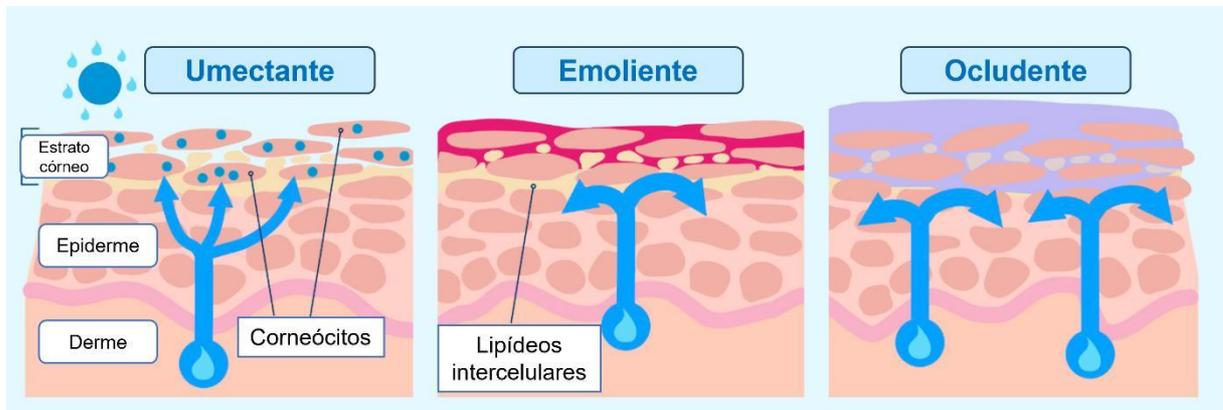
Os cosméticos que atuam por emoliência simulam a bicamada intracelular do estrato córneo. Eles melhoram a sensação da pele preenchendo os espaços entre os corneócitos e fornecem sensação de deslizamento da pele ou lubricidade, gerando suavidade e plasticidade na pele. Alguns emolientes comuns incluem os ácidos graxos essenciais (ácidos linoleico, esteárico e oleico, por exemplo) (Barnes et al., 2021).

No processo de hidratação ativa, as substâncias atravessam o estrato córneo e se ligam a moléculas de água dessa camada, diminuindo a TEWL. Para exercer tal ação, os cosméticos hidratantes que atuem por esse mecanismo devem empregar substâncias que possuem características físico-químicas que permitem permear o estrato córneo (Souza, 2018).

Por fim, os cosméticos ocludentes agem como sebo e lipídeos naturais encontrados na pele. Eles reduzem a TEWL através da formação de uma película de barreira hidrofóbica sobre a superfície da pele para prevenir a evaporação da água a partir do estrato córneo, retendo a água nas camadas superiores da pele. Algumas substâncias ocludentes comuns incluem parafina e vaselina branca, lanolina, silicones, ceras e os óleos vegetais (Pavlou et al., 2021). Dentre as desvantagens mais comuns dos oclusores pode-se citar a sensação gordurosa, a alergenicidade potencial e o odor (Barnes et al., 2021).

Na Figura 3 é apresentado um esquema ilustrativo que resume alguns dos mecanismos de hidratação da pele abordados anteriormente.

Figura 3 – Esquema ilustrativo dos principais mecanismos de ação dos cosméticos hidratantes



Fonte: Adaptado de Barnes et al. (2021).

Nos últimos anos, foi demonstrado também um novo mecanismo pelo qual alguns cosméticos aumentam o grau de hidratação da pele, especificamente desencadeado pelo emprego de ceramidas, que agem adicionando lipídeos que mimetizam os lipídeos do estrato córneo. As ceramidas representam os principais lipídeos do estrato córneo (30-40%) e desempenham papel importante na função barreira da epiderme, sendo que alterações na composição das ceramidas do estrato córneo resultam em desordens da pele com defeito na sua função barreira, como ocorre na dermatite atópica, psoríase e ictiose (Bziouche et al., 2023; Kahraman et al., 2019).

## 2.2.2 Tendências mercadológicas

No cenário de representatividade do setor de cosméticos na indústria brasileira e internacional, o Brasil representa o quarto maior mercado consumidor do mundo, segundo dados apresentados no relatório da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC, 2023). Além desse aspecto econômico, o mercado de cosméticos tem uma representatividade muito maior, pois define gerações e contribui na compreensão da história individual de cada um sob uma perspectiva de beleza e aceitação social (Infante; Melo; Campos, 2018).

A pesquisa e o desenvolvimento de produtos cosméticos estão atrelados às modificações da sociedade. Mais do que consumidores, as pessoas estão buscando cada vez mais produtos que expressam a sua individualidade. Há mais de 1 século, a indústria de cosméticos é responsável pelo desenvolvimento destes produtos para atender consumidores com diferentes necessidades (Infante; Melo; Campos, 2018).

Dentro desse cenário, é importante destacar que a pandemia de COVID-19 gerou mudanças em relação ao perfil de consumo dos indivíduos, que desenvolveram uma consciência de que a beleza do corpo está ligada ao bem-estar, tanto externo quanto interno. Como resultado, a preferência para os produtos de cuidados com a pele tem aumentado e diminuído a busca por produtos de maquiagem (Dini; Laneri, 2021).

Consoante os dados do relatório anual do Cosmetics Italia (2020), a partir de 2020, o setor de beleza e cuidados com a pele teve que se reinventar para responder rapidamente às novas necessidades do mercado. O maior desafio estabelecido com tais mudanças é encontrar um ponto de equilíbrio entre o “natural” e a “química do produto cosmético”. Segundo esse relatório, as palavras-chave futuras no setor de cosméticos são “sustentabilidade”, “natural/orgânico”, “cuidado”, “ética”, “e-commerce”, “beleza social”, “personalização” e “segurança”.

A utilização de cosméticos naturais tem crescido drasticamente, principalmente devido aos efeitos adversos dos compostos sintéticos na saúde e no meio ambiente (Mohd-Setapar et al., 2022). Um cosmético pode ser nomeado como natural quando a sua formulação possui ingredientes de origem natural e não insumos análogos quimicamente produzidos em laboratório. Entretanto, não existe ainda uma definição na legislação da porcentagem mínima de ingredientes naturais requeridos (Bozza et al., 2022). É importante destacar que existem diferenças entre os cosméticos naturais, sendo importante distinguir entre ingrediente natural e ingrediente naturalmente derivado (Dini; Laneri, 2021).

Entende-se por ingrediente natural, as substâncias químicas não processadas ou processadas por meios mecânicos, manuais, gravitacionais, com solventes naturalmente derivados, dissolução em água e vapor, aquecimento para remoção da água, flutuação e extração do ar por qualquer meio. Já a definição de ingredientes derivados naturalmente, engloba: (i) qualquer componente derivado dos reinos mineral, vegetal ou animal e de microrganismos, cuja matéria-prima tenha sido processada quimicamente; (ii) qualquer substância cujo material base é de origem

vegetal, mineral, animal ou microbiana tratado quimicamente e misturado com outros ingredientes; e (iii) ingredientes gerados a partir de uma matéria-prima vegetal e biomanufaturada por processos como saponificação, fermentação, condensação ou esterificação, com o objetivo de facilitar a criação de ingredientes eficientes, econômicos, sustentáveis ou biodegradáveis. Vale ressaltar que o petróleo e os ingredientes derivados do petróleo não englobam o conceito de ingredientes derivados naturalmente (Lourenço-Lopes et al., 2020). De maneira complementar, é interessante que o produto seja fabricado de uma maneira ecologicamente sustentável, através de métodos de processamento que respeitem a natureza (Dini; Laneri, 2021; Mohd-Setapar et al., 2022).

No Brasil e no mundo não existe, até o momento, regulamentação oficial que diferencie os cosméticos naturais, orgânicos ou com conceito vegano (Flor; Mazin; Ferreira, 2019; Kalil et al., 2022). Eles são categorizados dentro do mercado cosmético de acordo com os seus ingredientes funcionais e excipientes com as porcentagens permitidas não quantificadas. Dessa forma, a identificação dos produtos é realizada por meio de selos fornecidos por empresas certificadoras (Bozza et al., 2022). No cenário brasileiro, pode-se citar o Selo Vegano Brasileiro (SBV) e o Instituto Biodinâmico de Desenvolvimento Rural (IBD) (Flor; Mazin; Ferreira, 2019; Kalil et al., 2022).

Na Europa, existem organismos de certificação privados que fornecem padrões para cosméticos naturais e orgânicos em diversos países. Nos últimos anos, a harmonização desses variados padrões nacionais originou o *COSMetrics Organic Standard* (COSMOS), que atualmente é aceito como um padrão internacional para cosméticos naturais e orgânicos. Para o desenvolvimento de cosméticos que atendam ao padrão COSMOS, várias exigências relacionadas à origem dos insumos, ao processo produtivo e à sustentabilidade de toda a cadeia devem ser atingidos (Bozza et al., 2022). Segundo este padrão, pelo menos 95% dos ingredientes fisicamente processados de origem agrícola devem ser orgânicos. Por fim, pelo menos 20% do produto total deve conter ingredientes orgânicos, exceto alguns tipos específicos de produtos, como os enxaguantes, aquosos não emulsionados ou com alto teor de conteúdo mineral (maior ou igual a 80%). Para tais produtos, é exigido o mínimo de 10% de ingredientes orgânicos (COSMOS, 2020).

A *The International Natural and Organic Cosmetic Association* (NATRUE) é outra certificadora para cosméticos naturais e orgânicos, criada na Europa em 2007

como associação internacional sem fins lucrativos, com a finalidade de padronizar o desenvolvimento de cosméticos naturais e orgânicos internacionalmente (Bozza et al., 2022). O padrão NATRUE se refere à Química Verde e avalia o processo de produção e embalagem, além da origem dos ingredientes. Os produtos cosméticos orgânicos com certificado NATRUE possuem, no mínimo, 95% de substâncias naturais e substâncias derivadas naturalmente com certificação de agricultura orgânica ou que provenha de coleções silvestres certificadas por autoridade competente (NATRUE, 2021).

Outra tendência observada no mercado de cosméticos é a busca por fórmulas veganas (Lee; Kwon, 2022). Para as entidades certificadoras, a definição de cosmético vegano é aquele que não é testado em animal e cuja composição não inclui matérias-primas de origem animal ou que tenham sido testadas em animais (*cruelty-free*). Dentre as certificadoras para cosméticos veganos, destacam-se as italianas *Environmental Ethical Certification* (ICEA), VEGAN e VEGANOK, que não são específicas para o setor de cosméticos, ambas abrangendo o setor alimentício e, no caso da última, o setor têxtil (Bozza et al., 2022).

Os cosméticos *clean beauty* representam outro nicho desse novo mercado e referem-se aos produtos que não contenham ingredientes sobre os quais não se conhece o impacto no organismo humano ou seu potencial dano ambiental. A tendência *clean beauty* busca cada vez mais cosméticos naturais, com foco na redução de impactos ambientais e priorizando a sustentabilidade. Dessa forma, faz-se necessário pensar em toda a cadeia de produção, distribuição, venda e descarte de resíduos, que devem estar atrelados ao conceito (Kalil et al., 2022).

### **2.2.3 Aspectos regulatórios: estabilidade e controle de qualidade**

Um cosmético é definido como estável quando possui a capacidade de manter as características e propriedades desde a sua fabricação até o prazo final da sua utilização. Essas propriedades não são resultantes do acaso, mas de um desenvolvimento racional da formulação e podem ser classificadas como químicas, físicas, microbiológicas, toxicológicas e de funcionalidade (Maia, 2002).

O estudo de estabilidade de produtos cosméticos gera informações sobre o grau de estabilidade relativa de um produto em diferentes condições desde a sua

fabricação até o seu prazo de validade. Ele contribui no conhecimento do produto que está sendo desenvolvido (formulação e material de acondicionamento adequado), gerando informações para o aperfeiçoamento das formulações, para a definição do prazo de validade e para o monitoramento de propriedades organolépticas, físico-químicas e microbiológicas (Brasil, 2004).

Cada componente da formulação (excipiente ou ativo) pode impactar na estabilidade dela. Da mesma forma, variáveis relacionadas ao processo de fabricação, às condições ambientais e de transporte e ao material de armazenamento também podem influenciar na estabilidade do produto. As alterações que podem surgir em uma formulação cosmética são classificadas como extrínsecas (determinadas por fatores externos) ou intrínsecas (determinadas por fatores inerentes à formulação) (Brasil, 2004). Dentre os fatores externos, pode-se citar: tempo, temperatura, luz, oxigênio, umidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração. Por sua vez, dentre os fatores intrínsecos estão as incompatibilidades física e química, sendo essa última representada pelo pH, reações de óxido-redução e hidrólise, interação entre os ingredientes da formulação e interação entre os ingredientes da formulação e o material de acondicionamento (Santos; Bender, 2022).

Durante o desenvolvimento do estudo de estabilidade, os parâmetros que serão avaliados dependem das características da formulação desenvolvida, porém, de uma maneira geral, são classificados em: organolépticos (aspecto, cor, odor e sabor, quando aplicável), físico-químicos (pH, viscosidade, densidade e, em algumas situações, o acompanhamento dos ingredientes da formulação) e microbiológicos (contagem microbiana e teste de desafio do sistema conservante) (Brasil, 2004).

Uma vez que as formulações foram definidas, os ensaios de controle de qualidade dos produtos cosméticos são importantes para assegurar requisitos pré-estabelecidos para os produtos, através de um conjunto de testes adequados para cada forma farmacêutica desenvolvida (Brasil, 2008).

O Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da ANVISA estabelece os ensaios requeridos para as diversas formas farmacêuticas, possuindo um compilado de informações utilizadas para a seleção dos ensaios, os princípios de cada um deles e quais são as metodologias recomendadas de acordo com as características do produto em análise (Brasil, 2008).

É importante destacar ainda que, durante a definição dos ensaios a serem realizados para cada forma farmacêutica, a classificação do produto cosmético (grau I ou II) deve ser avaliada. Entende-se como cosméticos grau I aqueles que possuem características básicas ou elementares, cuja comprovação não seja necessária e que não requerem particularidades quanto ao modo de utilização e restrições de uso. Já os cosméticos grau II possuem indicações específicas, ou seja, suas características intrínsecas exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, assim como informações de cuidado, modo e restrição de uso (Brasil, 2015; Ferreira et al., 2022).

### 2.3 BIODIVERSIDADE BRASILEIRA E OS ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos vegetais têm ganhado importância notória no mercado mundial. Inicialmente utilizados apenas na nutrição humana, os estudos mais aprofundados desses insumos, levando a uma caracterização química mais detalhada, ampliaram as possibilidades de utilização. Assim sendo, hoje são vistos como matéria-prima essencial no desenvolvimento de cosméticos, o que coloca o Brasil em posição privilegiada, uma vez que o país possui vasta biodiversidade (Neto; Batista; Meirelles, 2020), destacando-se, por exemplo, a utilização dos óleos de macaúba, coco e pracaxi (Souza et al., 2022). Vale ressaltar também que a região Amazônica é rica em plantas oleaginosas, cujos óleos geralmente não são investigados. Dentre as espécies que merecem destaque, devido ao alto conteúdo de óleo, estão: açaí (*Euterpe oleracea* Mart.), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), babaçu (*Attalea speciosa* Mart.), buriti (*Mauritia flexuosa* L.f.), copaíba (*Copaifera officinalis* L.), cumaru (*Dipteryx odorata* Aubl.), patauá (*Oenocarpus bataua* Mart.), pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.), pracaxi (*Pentaclethra macroloba* Willd.) e tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) (Narvaez et al., 2022).

A utilização sustentável de óleos vegetais provenientes da biodiversidade brasileira contribui no estímulo da autonomia nacional no que se refere ao desenvolvimento e produção de cosméticos, bem como incentiva a economia e as comunidades produtoras locais (Souza et al., 2022). De maneira complementar, a elaboração de fórmulas com essa matéria-prima vai ao encontro das novas

tendências do mercado de cosméticos, onde a busca por cosméticos naturais é cada vez maior (Bozza et al., 2021).

Os óleos vegetais são obtidos por extração a frio dos grãos, sementes, cereais, frutas e outras partes das plantas (Lima et al., 2021). Outros métodos de obtenção são a maceração, a centrifugação ou a extração da parte gordurosa da planta (Orchard; Vuuren, 2019). São constituídos, majoritariamente, por triglicerídeos com uma variedade de ácidos graxos que diferem no tamanho da cadeia, grau de saturação, posicionamento das ligações duplas na cadeia e geometria de cada ligação dupla (isômeros *cis* e *trans*) (Abdulkarim et al., 2007). Além desses, compostos fenólicos e carotenoides também são encontrados (Dario et al., 2018).

De acordo com a presença ou a ausência de ligações duplas, os ácidos graxos podem ser classificados em saturados, monoinsaturados e poli-insaturados (Poljsak; Glavac, 2022), sendo os dois últimos mais susceptíveis à oxidação, conferindo uma menor estabilidade para os óleos vegetais que os contenham. Os ácidos oleico (C18:1), linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3), popularmente conhecidos como ômega 9, 6 e 3, respectivamente, são os principais ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais (Guidoni et al., 2019).

A diversidade de composição fitoquímica é responsável por conferir a esses óleos diferentes propriedades, tais como as ações anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e cicatrizante (Masiero et al., 2021; Orchard; Van Vuuren, 2019). Do ponto de vista cosmético, o filme oclusivo formado sobre a pele, que resulta em diminuição da TEWL e maior hidratação, é uma propriedade geralmente comum entre os diferentes óleos vegetais (Poljsak; Glavac, 2022).

Apesar das potencialidades e do uso crescente, o desenvolvimento de formulações cosméticas contendo esses óleos ainda apresenta uma série de desafios, destacando-se o delineamento das fórmulas, a estabilidade físico-química e a demonstração de eficácia nos testes de *performance* (Masiero et al., 2021).

### **2.3.1 Mistura de óleos vegetais CBA®**

Atualmente, no mercado de cosméticos, uma mistura de óleos vegetais provenientes da biodiversidade brasileira, principalmente da região Amazônica, vem ganhando destaque. É um insumo vegetal desenvolvido e patenteado pela empresa

Beraca em 2020, recentemente incorporada ao grupo Clariant, uma empresa multinacional com sede na Suíça. CBA<sup>®</sup> é a sigla utilizada para tal insumo e significa *Cannabinoid Active System*. Trata-se de uma mistura de dois óleos vegetais: o óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) proveniente da resina de copaíba e o óleo da semente do maracujá (*Passiflora edulis*) (Figura 4), com a proposta de atuação canabinoide-like, ou seja, com capacidade de modulação do Sistema Endocanabinoide (ECS, do inglês *Endocannabinoid System*). Do ponto de vista de constituição fitoquímica, os principais compostos encontrados são o  $\beta$ -cariofileno, o  $\alpha$ -humuleno (oriundos do óleo de copaíba) e o ácido linoleico, um ácido graxo poli-insaturado oriundo do óleo de passiflora (Clariant, 2023). As estruturas químicas das principais substâncias são apresentadas na Figura 5.

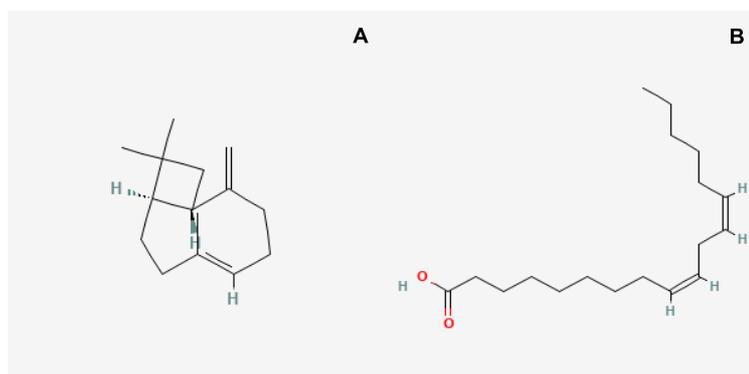
Figura 4 – Árvore da copaíba (*Copaifera officinalis*) e fruto do maracujá (*Passiflora edulis*)



Fonte: Clariant (2023).

A: Árvore da copaíba. B: fruto do maracujá.

Figura 5 – Estruturas químicas do  $\beta$ -cariofileno e ácido linoleico



Fonte: Pubmed Compound (2023).

A:  $\beta$ -cariofileno. B: ácido linoleico.

O CBA<sup>®</sup> aparece como uma alternativa natural ao canabidiol (CBD), um fitocanabinoide isolado a partir de *Cannabis* sp. que possui diversas propriedades medicinais (Pisanti et al., 2017), porém cuja utilização na produção de formulações tópicas é proibida pela legislação sanitária brasileira vigente (Brasil, 2019). Nesse contexto, a utilização de canabinoides-*like* representa um vasto campo de pesquisa a ser explorado (Cavalli; Dutra, 2021; Gonçalves et al., 2020a; Gonçalves et al., 2020b).

No Brasil, atualmente, diferentes produtos cosméticos vêm sendo desenvolvidos com a utilização do CBA<sup>®</sup>, direcionados principalmente para os cuidados com a pele (linha *skin care*) e o cabelo (linha *hair care*). Dentre as empresas que desenvolveram produtos com esse insumo desde o seu lançamento em 2020, pode-se destacar: (i) a Simple Organic, que desenvolveu um *balm* facial chamado CB2<sup>®</sup> para a rotina de *skin care* de peles sensíveis (linha Sensitive Set<sup>®</sup>); (ii) a Lola Cosmetics, que desenvolveu uma linha *hair care* para cabelos quimicamente tratados denominada Danos Vorazes<sup>®</sup>, compreendendo shampoo fortificante, *booster* de recuperação imediata, *leave in* e óleo reparador; (iii) a Haskell que lançou uma linha *hair care* com shampoo, condicionador, tônico capilar, máscara de tratamento e óleo multifuncional, que foi chamada de CBA Amazônico<sup>®</sup>; (iv) a linha *hair care* CBA Plants<sup>®</sup> da Portier Cosméticos para alisamento capilar (shampoo preparatório e creme de realinhamento capilar); e (v) a linha Vou de CBA<sup>®</sup> da Griffus, englobando shampoo, multifuncional capilar (condicionador, finalizador e anti-frizz), máscara, tônico e óleo capilar (Figura 6) (Santos, 2021).

Figura 6 – Cosméticos encontrados no mercado contendo CBA®



Fonte: A: Simple Organic (2023). B e E: Santos (2011). C: Lola Cosmetics (2023). D: Portier Cosméticos (2023).

A: Balm facial. B, C e E: Linha para cuidado de cabelos. D: Linha para alisamento capilar.

### 2.3.1.1 Canabinoides-like

O ECS é composto pelos receptores canabinoides acoplados à proteína G, seus ligantes endógenos (endocanabinoides) e enzimas responsáveis pela síntese e degradação de canabinoides (Aizpurua-Olaizola et al., 2017). Os receptores mais caracterizados do ECS são CB<sub>1</sub> e CB<sub>2</sub> (receptores acoplados a proteína G), que

demonstram diferenças particulares nos mecanismos de sinalização, distribuição tecidual e sensibilidade a agonistas e antagonistas (Starowicz; Finn, 2017). Os endocanabinoides são lipídeos sinalizadores que ativam os receptores canabinoides. Dentre eles, as moléculas mais conhecidas são o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e a anandamida (*N*-araquidonoil etanolamina; AEA) (Chen; Mackie, 2020).

Os receptores canabinoides são descritos em diversos órgãos do corpo humano com potencial para modulação no tratamento de diversas patologias (Chen; Mackie, 2020). Na pele, esses receptores já foram encontrados em queratinócitos (Meo et al., 2022; Tóth et al., 2011), fibroblastos (Fede et al., 2016), células de folículo capilar, glândulas sebáceas e sudoríparas, neurônios sensoriais, células imunes e mastócitos (Correia-Sá et al., 2020; Dobrosi et al., 2018; Stander et al., 2005; Telek et al., 2007), atuando principalmente nos processos inflamatório (Gegotek et al., 2021; Proksch et al., 2019) e de proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (Proksch et al., 2019; Tóth et al., 2011).

O termo canabinoide se refere a um vasto grupo de compostos capazes de modular os receptores canabinoides e, conseqüentemente, o ECS. São divididos em três categorias: (i) endógenos, (ii) sintéticos e (iii) fitocanabinoides (Gonçalves et al., 2020b). Nesse último grupo, alguns compostos se destacam, como o  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC), o CBD e o canabinol. Particularmente, os fitocanabinoides são constituintes fenólicos ou terpênicos derivados de *Cannabis* sp., porém podem ser encontrados em outras plantas (não canabinoides) e ainda assim induzir propriedades canabinoides-*like* (ligantes canabimiméticos). As moléculas canabinoides-*like*, de origem natural ou sintética, podem atuar como agonistas ou antagonistas dos receptores e enzimas do ECS. Dentre tais moléculas, destacam-se os terpenos, os polifenóis e os flavonoides, tais como terpineol, citral,  $\beta$ -cariofileno, terpineno, limoneno, pineno, elemeno, falcarinol, celastrol, eufol, nerolidol, salvinatorina A, amorfrutinas, ferrugineno, amirina, pristimerina, ácido betulínico, magnolol, kaempferol, quercetina e perrotineno (Cavalli; Dutra, 2021).

O CBA<sup>®</sup> foi desenvolvido com a proposta de oferecer um efeito semelhante ao fitocanabinoide CBD, pela presença dos terpenos canabimiméticos  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, visando o ECS da pele como alvo e ativando receptores CB<sub>2</sub> (Clariant, 2023), principal via responsável pelas ações antioxidante e anti-inflamatória (Gegotek et al., 2021). Em estudos *ex vivo* e clínicos reportados pela companhia

Clariant (2023), os resultados evidenciaram um aumento da produção de  $\beta$ -endorfina, propiciando um efeito calmante da pele. Em paralelo, foi observada a modulação da liberação de interleucina 6 (IL-6), um mediador de irritação, resultando em uma redução na vermelhidão e sensibilidade da pele.

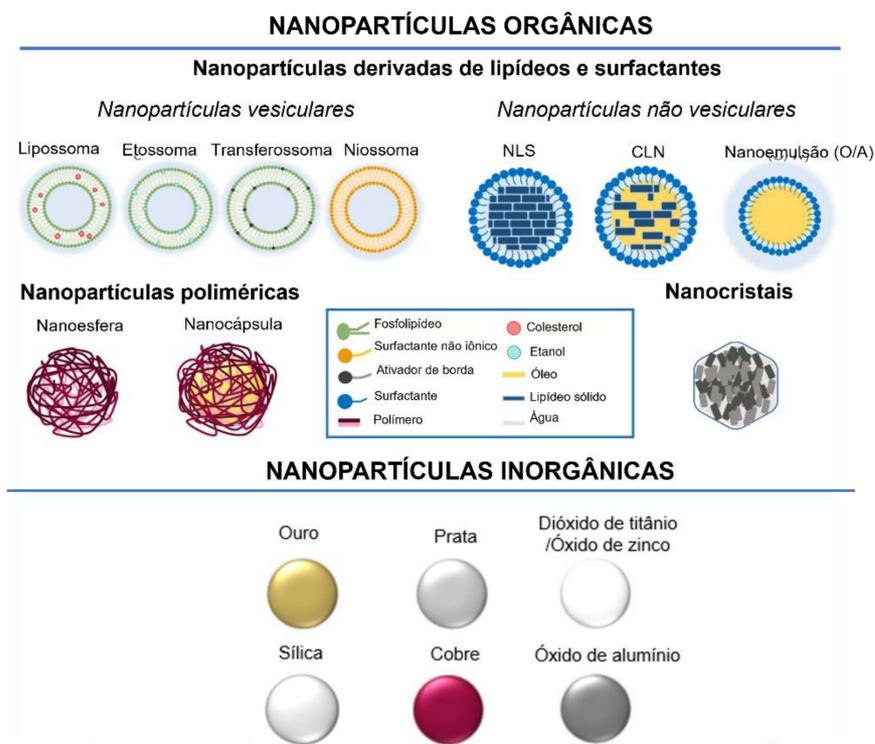
O CBD é conhecido pelas suas propriedades biológicas, como a modulação do crescimento de cabelo, a ação sebostática, as ações antimicrobiana (Ferreira et al., 2023), antioxidante e anti-inflamatória (Atalay; Jarocka-Karpowicz; Skrzydlewska, 2019), antipruriginosa, antitumoral, cicatrizante (Filipiuc et al., 2023) e inibição da proliferação de queratinócitos (Wilkinson; Wiliamson, 2007), podendo ser aplicado no tratamento de diversas patologias dermatológicas, tais como a dermatite atópica e seborreica (Baswan et al., 2020), acne, psoríase (Eagleston et al., 2018), alopecia androgênica e melanoma cutâneo (Ferreira et al., 2023). No contexto da Cosmetologia, Ikarashi e colaboradores (2021) demonstraram um efeito hidratante sobre a pele, através do aumento da expressão da proteína aquaporina 3 (AQP3), que possui um papel importante na retenção de água na pele.

## 2.4 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é reconhecida como uma tecnologia capaz de manipular a matéria em escala nanométrica (um bilionésimo de metro:  $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$ ) (Dias et al., 2021). Por definição, um material nanoestruturado apresenta, pelo menos, uma das suas dimensões na escala nanométrica, sendo intencionalmente fabricado. Nessa escala, os materiais adquirem novas propriedades inerentes ao tamanho diminuto (Ferreira; Rangel, 2009).

A nanotecnologia é um domínio multidisciplinar com aplicação nas mais diversas áreas, sendo as Ciências Farmacêuticas uma delas (Dias et al., 2021). O setor de cosméticos vem desenvolvendo diferentes produtos com o emprego da nanotecnologia, explorando ampla variedade de nanomateriais de diferentes composições, formas e tamanhos. Os nanomateriais mais empregados em cosméticos se dividem em dois grandes grupos: nanopartículas orgânicas e nanopartículas inorgânicas (Figura 7) (Salvioni et al., 2021).

Figura 7 – Esquema ilustrativo dos nanomateriais utilizados nos cuidados com a pele



Fonte: Adaptado de Salvioni et al. (2021).

NLS: Nanopartícula Lipídica Sólida. CLN: Carreador Lipídico Nanoestruturado. O/A: Óleo/Água.

As nanopartículas orgânicas são biodegradáveis e possuem baixa toxicidade, sendo obtidas por meio de materiais naturais ou sintéticos. Algumas são vesiculares, ou seja, possuem o núcleo interno oco, como os lipossomas, etossomas, transferossomas e niossomas, enquanto as demais não são vesiculares, uma vez que possuem núcleo lipídico. Alguns exemplos são as nanopartículas lipídicas (nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados) e as nanoemulsões (Ealias; Saravanakumar, 2017; Salvioni et al., 2021).

Dentro do grupo das nanopartículas orgânicas, também são encontradas as nanopartículas poliméricas e os nanocristais. As nanopartículas poliméricas podem ser sintetizadas com o emprego de polímeros naturais ou sintéticos. Dependendo dos componentes da formulação e dos métodos de preparação, dois sistemas podem ser obtidos, a saber: nanocápsulas e nanoesferas. As nanocápsulas são constituídas por núcleo líquido geralmente preenchido com óleo e estabilizado por revestimento surfactante, rodeado por uma parede polimérica. As nanoesferas são constituídas por matriz polimérica, onde diversos componentes ativos podem ser

aprisionados ou adsorvidos (Deng et al., 2020). Os nanocristais são nanopartículas submicrométricas ( $< 1 \mu\text{m}$ ) compostas de fármaco na forma 100% cristalina, geralmente envoltos por uma camada estabilizadora, sendo utilizados com o objetivo principal de aumentar a solubilidade de substâncias pouco solúveis em água (Chary et al., 2024).

As nanopartículas inorgânicas são aquelas que são obtidas com a utilização de metais e óxido de metais (Ealias; Saravanakumar, 2017). Geralmente se comportam como partículas insolúveis e devido às suas características intrínsecas, não se desintegram ou sofrem alterações substanciais quando aplicadas na pele (Salvioni et al., 2021). Possuem propriedades que melhoram o desempenho cosmético e, por isso, são utilizadas como carreadores e modificadores de reologia, principalmente como ingredientes ativos para proteção antimicrobiana e UV. Alguns exemplos desse grupo compreendem as nanopartículas de: ouro e prata, dióxido de titânio e óxido de zinco, sílica, cobre e óxido de alumínio (Gupta et al., 2022).

As nanopartículas lipídicas são as mais empregadas na obtenção de produtos tópicos, seja para ação cosmética, dermocosmética ou mesmo transdérmica, devido às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade, versatilidade, capacidade de escalonamento, baixos custo e toxicidade (Khater et al., 2021). As nanopartículas lipídicas são essencialmente compostas de lipídeos e surfactantes, de forma que as substâncias ativas podem ser encapsuladas, incorporadas e/ou adsorvidas na superfície. São divididas em nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLNs) (Viegas et al., 2023).

As NLSs são compostas por um lipídeo sólido à temperatura ambiente e corporal (concentração de 0,1 a 30%, v/v), disperso em meio aquoso e estabilizado por um agente surfactante (concentração de 0,5 a 5%, v/v). O núcleo sólido da nanopartícula é hidrofóbico revestido com uma monocamada de tensoativo, sendo que o fármaco é geralmente disperso ou dissolvido no núcleo. Dentre os lipídeos utilizados pode-se citar os esteroides, di- ou triglicerídeos, misturas de glicerídeos e até mesmo as ceras (Viegas et al., 2023).

Os CLNs compreendem a segunda geração de nanopartículas lipídicas e foram desenvolvidos para resolver os problemas relacionados às principais desvantagens das NLSs, que estão relacionadas ao alto grau de organização da matriz lipídica devido à cristalinidade atribuída pelo lipídeo sólido (Sala et al., 2018). Eles são formados a partir de uma mistura de lipídeos líquido e sólido dispersos

numa fase aquosa contendo surfactante, sendo que os lipídeos podem variar quanto a sua própria composição, como a presença de ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia, por exemplo (Sharma; Baldi, 2018; Viegas et al., 2023). A incorporação de lipídeos líquidos ao sistema diminui os padrões de cristalinidade da matriz atribuídos principalmente pelos lipídeos sólidos. Conseqüentemente, são produzidas nanopartículas com melhor *drug loading* (massa de nanopartículas que contribuíram para o encapsulamento do fármaco) e menor grau de expulsão do fármaco, resultando em maior estabilidade físico-química do sistema (Gordillo-Galeano; Mora-Huertas, 2018).

As nanopartículas lipídicas são geralmente consideradas seguras para a aplicação tópica, uma vez que não é esperado que o conteúdo lipídico impacte na viabilidade celular (Salvioni et al., 2021). Além disso, elas não requerem a utilização de solventes orgânicos no seu processo de produção em larga escala nem a utilização de grandes quantidades de tensoativo para a estabilização da sua estrutura. A preocupação com os tensoativos é maior, pois eles podem apresentar ação citotóxica, sendo a escolha do surfactante uma etapa crítica no desenvolvimento desse tipo de nanopartícula (Viegas et al., 2023).

Os métodos de obtenção das nanopartículas lipídicas são diversos, tais como: a homogeneização de alto cisalhamento, a ultrassonicação ou homogeneização em alta velocidade, a homogeneização a quente, a homogeneização a frio, métodos baseados em: microemulsão, fluido supercrítico, emulsificação/evaporação de solvente, emulsão dupla e, por fim, métodos empregando *spray drying* (Khater et al., 2021; Mishra et al., 2018).

No processo de obtenção por homogeneização de alto cisalhamento, as nanodispersões lipídicas são inicialmente obtidas em função do alto cisalhamento. Trata-se de um método de fácil manuseio, porém a presença de micropartículas pode afetar a qualidade da dispersão. Portanto, diferentes parâmetros do processo precisam ser otimizados, como a velocidade de agitação, condição de resfriamento e tempo de emulsificação (Mishra et al., 2018).

A ultrassonicação é outro método para obtenção de nanopartículas que utiliza alta energia. Após a obtenção de uma emulsão, o ultrassom é aplicado com o auxílio de um sonotrodo em contato direto com a dispersão. A redução do tamanho da gota na emulsão ocorre devido ao processo de cavitação acústica. A principal

desvantagem descrita para essa técnica é o risco de contaminação do sistema com metais (Sharma; Baldi, 2018).

Após a etapa de preparação das nanopartículas, deve-se caracterizar o sistema obtido. A caracterização físico-química das nanopartículas é a base inicial para o estabelecimento de possíveis aplicações futuras, assim como pode auxiliar no entendimento do seu comportamento *in vivo*. Nesse contexto, diferentes técnicas podem ser adotadas para a caracterização físico-química, sendo que alguns parâmetros devem ser considerados, como o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e a sua distribuição, a carga superficial, a eficiência de encapsulação (EE), o grau de cristalinidade e a morfologia da partícula (Hallan et al., 2021; Mubeen et al., 2021).

#### **2.4.1 Nanotecnologia aplicada a cosméticos**

A nanotecnologia é empregada como um sistema de entrega dos componentes bioativos durante o desenvolvimento de formulações cosméticas, com o objetivo de promover melhora na *performance* do cosmético (Aziz et al., 2019). A utilização da nanotecnologia permite conferir algumas vantagens aos produtos cosméticos, como o efeito duradouro e o aumento da estabilidade. A área superficial elevada dos nanomateriais permite um transporte mais eficiente dos ingredientes através da pele, confere novos elementos de cor (batons e esmaltes), transparência (protetores solares), liberação de fragrâncias e efeitos de longa duração (maquiagem) (Fytianos; Rahdar; Kyzas, 2020). Atualmente, o uso mais comum de nanomateriais no setor de cosméticos é no desenvolvimento de produtos para cuidados com a pele e em protetores solares (Dubey et al., 2022).

Apesar das propriedades vantajosas atribuídas a um cosmético desenvolvido com base na nanotecnologia, algumas preocupações relacionadas à escalabilidade, toxicidade e custo são também ponto de discussão e estudos. Isso porque o tamanho menor de partícula, o aumento da área superficial e a carga superficial positiva aumentam a capacidade de interação desses materiais com o microambiente biológico, porém sabe-se que possuem toxicidade dependente de dose através de diferentes vias de administração (Gupta et al., 2022).

Uma ampla diversidade de nanomateriais tem sido empregada na obtenção de produtos cosméticos. No Quadro 2 é apresentado um compilado dos principais, assim como as suas propriedades e aplicabilidade em produtos cosméticos.

Quadro 2 – Principais nanomateriais utilizados na obtenção de cosméticos e suas propriedades

Nanomaterial	Propriedades	Formulação cosmética
Partículas inorgânicas (TiO <sub>2</sub> , ZnO)	Filtros de radiação UV inorgânicos (absorção/reflexão da luz UV)	Protetor solar
Partículas inorgânicas (SiO <sub>2</sub> )	Preenchimento para aumento do <i>bulk</i> da formulação cosmética	Batom
Negro de carbono	Pigmento	Máscara facial
Nano-orgânica (tris-bifeniltriazina)	Filtros UVA 2 e UVB mais eficientes	Protetor solar
Nano-hidroxiapatita	Dessensibilizante e remineralizante dental	Pasta de dente
Nanopartículas de ouro e prata	Atividade antimicrobiana e estabilidade química	Máscara facial e creme antienvelhecimento
Lipossomas	Habilidade de se compartimentar e solubilizar materiais hidrofóbicos e hidrofílicos	Hidratante e creme antirruca
Niossomas e Etossomas	Maior eficiência, penetração cutânea e estabilidade de substâncias ativas	Crema antienvelhecimento e hidratante
Nanopartículas lipídicas sólidas	Aumento da duração de ação, biodisponibilidade, biodegradabilidade e facilidade de produção em larga escala	Perfume e crema
Carreador lipídico nanoestruturado	Aumento do prazo de validade e facilidade de produção em larga escala	Crema
Nanocápsulas	Formação de micelas e natureza anfifílica, mascaramento de odores, liberação controlada	Crema antirrugos e produtos para cuidado com o cabelo
Nanoemulsões	Estabilização físico-química de cremes (ausência de problemas como floculação, coalescência ou sedimentação)	Loção corporal, crema para a pele, bálsamo, pomada, gel e hidratante
Nanocristais	100% <i>drug loading</i> , aumento da adesividade e penetração de substâncias hidrofóbicas na pele	Hidratante e pastas de dente

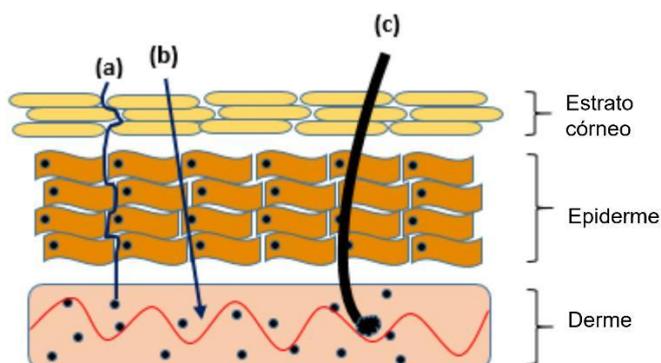
Fonte: Adaptado de Gupta et al. (2022).

TiO<sub>2</sub>: Dióxido de titânio; ZnO: Óxido de zinco; SiO<sub>2</sub>: Dióxido de silício.

No que concerne ao processo de penetração na pele por nanopartículas, é importante compreender sobre as rotas existentes. O estrato córneo é a principal barreira física de proteção da pele contra a penetração de substâncias externas, sendo a etapa limitante do fluxo. Além disso, as características físico-químicas das substâncias, como lipofilicidade e tamanho molecular, também influenciam nesse processo. Um composto ativo é transportado através do estrato córneo por difusão passiva considerando três rotas possíveis: a transcelular (intracelular), a intercelular

(paracelular) e a de apêndices (folículos pilosos e glândulas sudoríparas) (Figura 8) (Bolzinger et al., 2012).

Figura 8 – Ilustração das rotas prováveis de penetração de nanopartículas através da pele incorporadas em cosméticos



Fonte: Adaptado de Ahmad (2021).

(a): intercelular através da bicamada lipídica. (b): transcelular através dos corneócitos. (c): apêndice através dos folículos pilosos e glândulas sudoríparas.

A via intracelular requer a passagem através dos corneócitos firmemente confluentes e a partição sucessiva nas bicamadas lipídicas intercelulares, o que retarda a penetração de substâncias hidrofóbicas através dessa rota (Sala et al., 2018). A via de apêndices aparece como um contribuinte menor na penetração de fármacos, já que os apêndices ocupam apenas 0,1% da área total da pele humana. Entretanto, ela aparece como uma rota potencial para uma variedade de compostos, desde moléculas carregadas e de alto peso molecular até nanomateriais (Khater et al., 2021). Por sua vez, as substâncias apolares com peso molecular menor que 500 Da e valor de Log P entre 1-4 se difundem facilmente através da via intercelular, ou seja, via matriz lipídica (Sala et al., 2018). Após a entrega do composto ativo pela formulação tópica e partição no estrato córneo, ele se difunde via matriz lipídica e atinge uma interface, onde sofre um processo de difusão passiva a partir dos lipídeos do estrato córneo para a epiderme viável, seguido pela difusão através da epiderme viável e derme (Khater et al., 2021).

A penetração de nanopartículas através da pele pode ocorrer por intermédio das três rotas descritas anteriormente, sendo que o tamanho da nanopartícula desempenha o papel mais importante nesse processo (Salazar et al., 2023). A

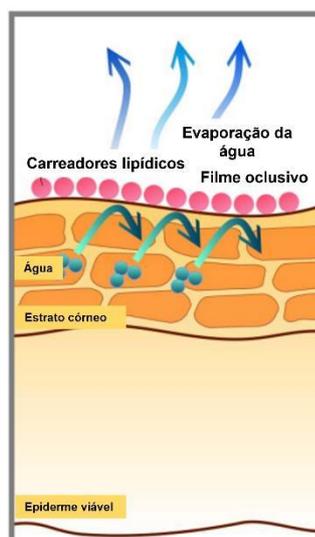
princípio, a penetração através de poros aquosos (diâmetro superficial 0,4-36 nm) pode ocorrer para nanopartículas abaixo de 36 nm, enquanto a penetração pela via intercelular aumenta quando tais partículas são menores que 5-7 nm. Ademais, o grande espaço folicular (10-210  $\mu\text{m}$ ) permite o acúmulo de nanopartículas que são capazes de se dispersar no suor e no sebo (Salvioni et al., 2021). As nanopartículas intactas acima de 100 nm não são consideradas para atravessar o estrato córneo (Fang, C.-L.; Al-Suwayeh; Fang, J.-Y., 2013).

Além do tamanho, outros fatores também influenciam na penetração das nanopartículas através da pele, bem como na cinética de liberação das substâncias ativas a partir delas, são eles: composição, estabilidade coloidal, propriedades do veículo onde essas nanopartículas estão inseridas (Salvioni et al., 2021), morfologia da superfície, carga superficial (potencial zeta) e o balanço hidrofílico-lipofílico do surfactante empregado (Ahmad, 2021).

Quando nanopartículas baseadas em lipídeos são aplicadas sobre a pele, aquelas que são mais flexíveis (transferossomas e etossomas, por exemplo) penetram mais profundamente que as rígidas (NLSs e CLNs). Alguns mecanismos de penetração foram propostos para esse tipo de nanopartícula, como trocas lipídicas, alteração de polaridade, fluidização do estrato córneo seguido pelo aumento de hidratação (Zhai, Y.; Zhai, G., 2014) e penetração através dos folículos e glândulas sebáceas (Fang, C.-L.; Al-Suwayeh; Fang, J.-Y., 2013), sendo que as NLSs e CLNs são geralmente incorporadas nas camadas superiores do estrato córneo, onde exercem efeitos de filme oclusivo e de suporte à função barreira da pele (Salvioni et al., 2021).

Os CLNs possuem função peculiar de oclusão da epiderme diminuindo a TEWL e, conseqüentemente, contribuindo para o aumento da hidratação da pele (Figura 9) (Chauhan et al., 2020) e redução na compactação dos corneócitos, alargando as lacunas entre eles (Fang, C.-L.; Al-Suwayeh; Fang, J.-Y., 2013). Por sua vez, a hidratação também influencia o particionamento das substâncias ativas no estrato córneo (Chauhan et al., 2020).

Figura 9 – Esquema ilustrativo do efeito oclusivo dos carreadores lipídicos nanoestruturados



Fonte: Adaptado de Fang, C.-L.; Al-Suwayeh; Fang, J.-Y. (2013).

A propriedade oclusiva dos CLNs depende de dois fatores principais: (i) tamanho de partícula, sendo que quanto menor esse valor maior o efeito oclusivo e (ii) a cristalinidade e a concentração de lipídeos, visto que elevada concentração de lipídeos (50-60%) promove maior retenção de umidade no estrato córneo e a concentração de, pelo menos, 35% de lipídeos de alta cristalinidade também aumenta o efeito oclusivo. Portanto, é esperado que o menor conteúdo de lipídeos líquidos resulte na penetração mais profunda nas camadas da pele, pois o aumento do efeito oclusivo implica também em melhor difusão das substâncias ativas (Chauhan et al., 2020). Por esse motivo, as NLSs tendem a penetrar mais profundamente nas camadas da pele, enquanto os CLNs tendem a penetrar até a epiderme viável apenas (Sala et al., 2018).

#### 2.4.2 Segurança e eficácia de nanocosméticos: novas abordagens

A segurança e a eficácia dos produtos e ingredientes cosméticos são dois requisitos importantes para todos os envolvidos na rede de produção e utilização, como fabricantes, importadores, varejistas e consumidores (Zerbinati et al., 2021). Cosméticos cujo sistema de entrega de substâncias é baseado em nanotecnologia são denominados de nanocosméticos. Eles são categorizados em vários tipos

dependendo das características do sistema, do método de preparo, dos componentes envolvidos e da finalidade de aplicação (Dubey et al., 2022).

Acerca dos nanocosméticos, a agência regulatória americana *Food and Drug Administration* (FDA) publicou, em 2014, um guia para a segurança de nanomateriais utilizados nos produtos cosméticos. Segundo esse guia, por apresentar propriedades químicas, físicas e biológicas distintas das partículas em escala maior com a mesma composição química, os nanomateriais terminam por gerar questionamentos relacionados à segurança do produto para o uso pretendido. Então, de acordo com esse guia, as recomendações para avaliação de segurança de nanocosméticos englobam fatores como: (i) a caracterização do nanomaterial, compreendendo a avaliação de propriedades físicas e químicas, bem como a avaliação de impurezas, se presentes; e (ii) as considerações de toxicologia e absorção, distribuição, metabolismo e excreção do nanomaterial, considerando a via de administração e os testes de toxicidade (FDA, 2014).

No que tange ao cenário brasileiro, a ANVISA recentemente publicou o Guia nº63/2023, que aborda a avaliação da segurança biológica de materiais de uso em saúde com base nanotecnológica. Esse guia apresenta diretrizes regulatórias nacionais para a avaliação de materiais de uso em saúde (tais como cateteres, *stents* farmacológicos, *scaffolds*, implantes médicos, entre outros) que contenham ou sejam constituídos de sistemas nanotecnológicos. Nesse contexto, são apresentadas estratégias para a caracterização físico-química de tais sistemas, assim como ensaios de segurança biológica baseados em metodologias *in vitro* e *in vivo* (Brasil, 2023).

No cenário de testes em cosméticos, a 7ª emenda à Diretiva Europeia de Cosméticos proibiu testes em animais para produtos cosméticos e ingredientes cosméticos em 2004 e 2009, respectivamente (European Parliament, 2009). Seguindo a mesma tendência, no Brasil, a Resolução nº 58, de 24 de fevereiro de 2023, proibiu o uso de animais em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (Brasil, 2023). Por conseguinte, diversos testes alternativos ao uso de animais vêm sendo desenvolvidos e validados (Barthe et al., 2021).

A proibição da utilização de animais no cenário de cosméticos vem ao encontro da política dos 3 Rs (*Replace, Reduce, Refine*) introduzida por Russel e Burch (1959), que significa Redução, Substituição e Refinamento da utilização de

animais em ensaios, buscando, sempre que possível, o uso de outros modelos (como o *in vitro* e o *ex vivo*, por exemplo) ou, no mínimo, a utilização do menor número de animais possíveis, quando a substituição não é possível (Brasil, 2012). Nos últimos anos, a incorporação do quarto “R” (4 Rs, *Responsability*) foi sugerida, relacionado à responsabilidade social e científica no emprego de animais em experimentos (Lee, K.H.; Lee, D.W.; Kang, 2020).

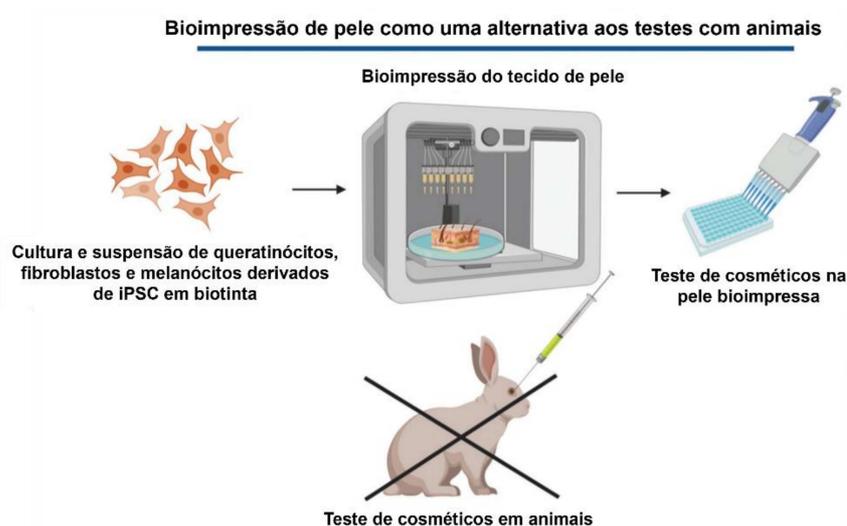
Um modelo que foi desenvolvido nos últimos anos é o de pele artificial produzida *in vitro*. Dentre algumas fornecidas comercialmente estão EpiDerm™, EpiSkin™ e SkinEthic™. Todos esses modelos apresentam grande similaridade com a pele humana natural, evidenciado pela presença dos estratos córneo, espinhoso, granuloso e basal, com uma espessura relativa do estrato córneo entre 12 e 37 µm, que é um pouco maior quando comparada à espessura do estrato córneo da pele humana natural (10 a 12 µm), devido à ausência do processo de descamação cutânea nos modelos *in vitro* (Chiari et al., 2012; Nabarretti, 2022). O modelo SkinEthic™ é reconstruído a partir do cultivo de queratinócitos humanos para formar uma epiderme tridimensional totalmente diferenciada em um filtro de policarbonato inerte de superfície 0,5 cm<sup>2</sup> na interface ar-líquido em um meio quimicamente definido (Pellevoisin et al., 2018). É histologicamente semelhante à epiderme humana *in vivo* e possui diversas aplicações, incluindo testes de irritação e corrosão na pele, exposição UV, danos ao DNA, adesão bacteriana, estudos *omics* (genômica, metabolômica e proteômica), avaliações de permeabilidade e sensibilização cutânea (Episkin, 2023).

Os estudos *in vitro* com cultura de células aparecem como um método alternativo ao uso de animais na pesquisa e desenvolvimento de cosméticos (Filaire et al., 2022). Para essa finalidade, podem ser utilizadas: (i) linhagens celulares imortalizadas, comuns nos laboratórios de pesquisa e que se caracterizam por serem obtidas a partir de células transformadas ou cancerosas e possuir alta capacidade de divisão celular (Zerbinati et al., 2021); (ii) linhagens primárias obtidas a partir de um tecido por um processo de digestão enzimática (Zonari et al., 2023) e (iii) célula-tronco pluripotente induzida (iPSC, do inglês *Induced Pluripotent Stem Cell*) (Filaire et al., 2022).

As iPSCs são obtidas através de uma tecnologia em que uma célula adulta é desdiferenciada para seu estado de célula-tronco pluripotente. Então, essa célula pode ser diferenciada em outro tipo celular desejado por meio de estímulos

adequados em laboratório. O processo tecnológico de bioimpressão utilizando iPSC como célula fonte permite a fabricação de modelos de pele artificiais mais realistas que os disponíveis comercialmente, permitindo o desenvolvimento de diferentes modelos de pele com respeito à raça (asiático, caucasiano, entre outros), características (seca, oleosa, entre outros) ou outro tipo específico desejado, dependendo do uso pretendido do cosmético (Figura 10) (Soman; Vijayavenkataraman, 2020).

Figura 10 – Ilustração da bioimpressão de modelos de pele humana para substituir os procedimentos com testes em animais



Fonte: Adaptado de Soman; Vijayavenkataraman (2020).

iPSC: Célula Tronco Pluripotente Induzida (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cell*).

Ao se abordar a cultura de células, é importante destacar que, além da diferença dos tipos de cultura quanto à origem celular abordado anteriormente, podem ser utilizados métodos de cultura 2D ou 3D. Nas culturas de células 2D é formada uma monocamada em superfícies plásticas otimizadas para cultura de células. As culturas 3D são aquelas resultantes da engenharia de tecidos que se aproximam mais à organização celular de um tecido ou órgão, sendo representada pelos esferoides, organoides (Langhans, 2008) e órgãos-em-chip (Filaire et al., 2022).

Dentre outros estudos realizados na comprovação da segurança de um produto cosmético, estão as avaliações de irritação da pele e dos olhos. A irritação dérmica é definida como a produção de dano reversível da pele, após a aplicação de

uma substância teste por até 4 horas (OECD, 2015). Já a irritação ocular é aquela caracterizada pela ocorrência de alterações no olho após a aplicação da substância teste na superfície anterior desse órgão, sendo totalmente reversível dentro de 21 dias de aplicação (OECD, 2020). O modelo animal para esses estudos, antes amplamente empregado, hoje vem sendo substituído pela utilização dos modelos de epiderme humana reconstruída para o teste de irritação cutânea e, no caso do teste de irritação ocular, o modelo baseado no epitélio semelhante à córnea humana reconstruída, ambos aprovados pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) (Barthe et al., 2021). Para o potencial de irritação ocular, outra abordagem desenvolvida é o teste em membrana corioalantoide de ovos de galinha (Vinardell; Mitjans, 2017).

Para os ensaios de sensibilização da pele, novos métodos de abordagem *in vitro* também estão disponíveis, como o ensaio de reatividade peptídica direta, o ensaio de reatividade derivado de aminoácido e os ensaios baseados em linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT) (Nabarretti, 2022). Os agentes sensibilizadores da pele são substâncias químicas que têm o potencial intrínseco de induzir um estado de hipersensibilidade em humanos que, após a exposição tópica repetida, pode resultar no desenvolvimento de dermatite de contato alérgica (Daniel et al., 2018). Trata-se de um método particularmente importante para fragrâncias, conservantes e tinturas de cabelo (Vinardell; Mitjans, 2017).

Outros alvos de metodologias alternativas são os estudos de genotoxicidade, com dois ensaios *in vitro* já aprovados pela OECD: o teste de mutação reversa bacteriana e o teste de micronúcleos para a avaliação de dano cromossômico; e os estudos de fototoxicidade, com um método *in vitro* baseado na absorção de vermelho neutro por linhagem celular de fibroblasto 3T3 (Vinardell; Mitjans, 2017). A fototoxicidade é definida como uma reação aguda desencadeada após a exposição às radiações solar, UV ou visível devido à aplicação de um produto topicamente ou sistematicamente (Brasil, 2012).

No âmbito dos testes toxicológicos, muitos dados dos ingredientes cosméticos são obtidos a partir de resultados de estudos em animais realizados previamente à proibição do uso ou, após a proibição, em estudos de ingredientes para os ramos das indústrias de medicamentos e alimentos, quando não são exclusivos do setor de cosméticos. Para todos os outros casos, a segurança deve ser demonstrada por testes *in silico* ou *in vitro*. O desenvolvimento de testes *in vitro* para avaliação de

carcinogenicidade, toxicidade de dose repetida e toxicidade reprodutiva, para os quais não existem métodos disponíveis atualmente, é um nicho importante de pesquisas, o que aumenta o desafio de comprovação de ausência de toxicidade desses insumos, assim como a sua utilização segura (Brasil, 2012; Barthe et al., 2021; Vinardell; Mitjans, 2017).

Os explantes de pele humana *ex vivo* representam um modelo experimental que reproduz mais de perto a fisiologia da pele doente e saudável. Toda a população nativa de células da pele permanece presente, assim como a matriz dérmica, mimetizando de maneira mais satisfatória as condições *in vivo* da pele humana. Esse modelo pode ser aplicado em diversas análises, como os estudos de efeito da exposição solar, dermatite atópica, dano aos folículos capilares e retenção/permeação cutânea (Eberlin et al., 2020).

Os estudos de retenção/permeação cutânea são adequados para prever o comportamento das formulações nas condições *in vivo* e permitem determinar quantitativamente a penetração das substâncias de interesse nas diversas camadas da pele e verificar se possuem potencial de absorção para a corrente sanguínea (efeito transdérmico). Diferentes tipos de formulações podem ser avaliados nesse tipo de estudo, tais como cremes, géis, pomadas, suspensões, *patches*, shampoo, base, hidratante, sabonetes, protetores solares, entre outros (Barthe et al, 2021).

Um dos dispositivos utilizados para a avaliação da permeação/retenção é a célula de difusão de Franz (Neupane et al., 2020; Zsikó et al., 2019), em conformidade com as diretrizes da OECD (OECD, 2004). Esse sistema pode ser usado como uma configuração estática ou de fluxo contínuo, ambos de acordo com a OECD, porém o sistema estático é o mais simples, de menor custo e mais amplamente utilizado (Iliopoulos; Chapman; Lane, 2021). Ele consiste em um compartimento receptor preenchido pela solução tampão, na qual o composto será quantificado caso consiga permear por todas as camadas da pele. No que concerne ao meio receptor, o mesmo deve ser escolhido de maneira a mimetizar as condições *in vivo* e garantir a solubilidade suficiente da substância ativa (Flaten et al., 2015). Uma dosagem finita de formulação é topicamente aplicada no compartimento doador e o sistema permanece em agitação constante e incubação a 32°C (temperatura da pele humana) (Barthe et al., 2021). A amostra de pele *ex vivo* é posicionada entre os compartimentos doador e receptor, de modo que o estrato córneo permaneça

voltado para o compartimento doador e a derme em contato com o compartimento receptor (Supe; Takudage, 2021).

Para os nanocosméticos, a utilização de bioensaios para a predição da toxicidade das nanopartículas é uma abordagem alternativa ao uso de animais e uma etapa importante de avaliação dentro da nanotoxicologia (Rajabi et al., 2015). Eles se caracterizam pela exposição de organismos vivos (procariontes e eucariontes) a determinadas substâncias e a avaliação do efeito no seu comportamento (Gueretz et al., 2017). Os bioensaios apresentam diversas vantagens como a resposta rápida, simplicidade, especificidade, sensibilidade e custo-benefício e vêm sendo empregados para a avaliação da ação de contaminantes sobre o meio ambiente (Ecotoxicologia) (Ghosh; Thakur; Kaushik, 2017). Os organismos mais comumente empregados para a avaliação de toxicidade em água e esgotos incluem peixes, invertebrados (*Daphnia magna*, *Brachionus calyciflorus*, *Brachionus plicatilis* e *Artemia salina*, principalmente), plantas, algas e microrganismos (Hassan et al., 2016). Além desses, organismos não convencionais também são bastante utilizados, dentre eles o nematoide *Caenorhabditis elegans*, que possui um genoma completamente sequenciado, órgãos rudimentares semelhantes aos encontrados em mamíferos e vias de sinalização celular altamente conservadas (Bianchi et al., 2015).

Portanto, diante de todo o cenário exposto, é evidente que o desenvolvimento de formulações tópicas inovadoras, minimalistas e veganas constitui uma lacuna no setor de cosméticos. É importante também destacar a importância da valorização da biodiversidade nacional, já que o Brasil possui vasta riqueza natural. Com essa proposta, a mistura dos óleos vegetais de copaíba e maracujá, apresentado como CBA<sup>®</sup>, representa um insumo natural potencial para o desenvolvimento de formulações. Destaca-se a busca por cosméticos que cumpram os requisitos citados e que sejam providos de estabilidade e segurança, atendendo também ao propósito de utilização de metodologias alternativas ao uso animal. Por fim, é importante salientar que, apesar da utilização de um insumo comercial, o presente trabalho não possui conflito de interesses, possuindo caráter independente.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Desenvolver três formas farmacêuticas (bruma, sérum e creme) para cuidados faciais da pele negra, empregando uma mistura de óleos vegetais provenientes da biodiversidade brasileira nanoencapsulados.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar o perfil fitoquímico da mistura de óleos vegetais;

Desenvolver um CLN contendo a mistura de óleos vegetais;

Realizar a caracterização físico-química das nanopartículas lipídicas obtidas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão (do inglês *Polydispersity Index* – PI), potencial zeta, eficiência de encapsulação e morfologia;

Avaliar a estabilidade físico-química das nanopartículas;

Realizar uma triagem de avaliações *in vitro* do carreador lipídico nanoestruturado e da nanopartícula controle através dos ensaios antioxidante, toxicidade aguda empregando *Artemia salina* e viabilidade celular em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929);

Desenvolver três formas farmacêuticas diferentes (bruma, sérum e creme) veganas com propriedades cosméticas para cuidados faciais da pele negra;

Avaliar a estabilidade físico-química da bruma e do sérum, por intermédio dos testes de estabilidade preliminar e estabilidade acelerada;

Conduzir os ensaios de controle de qualidade físico-químico da bruma e do sérum;

Realizar ensaio *in vitro* de espalhabilidade da formulação sérum;

Realizar ensaio *in vitro* de oclusividade para demonstração do potencial de hidratação dos CLNs desenvolvidos e incorporados na formulação sérum.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA, REAGENTES, PADRÃO ANALÍTICO E EQUIPAMENTOS

Para as análises cromatográficas foram empregados metanol e hexano grau cromatográfico (Scharlab, Espanha). O preparo dos meios de cultura para o ensaio de viabilidade celular empregou DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Nutricell – Nutrientes Celulares, Brasil), Soro Fetal Bovino (SFB; Invitrogen, EUA), os antibióticos penicilina e estreptomicina, tampão ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanossulfônico (HEPES), corante azul de trypan e brometo de [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico] (MTT), todos provenientes da Sigma Aldrich (EUA). Para o preparo da água marinha artificial para o ensaio de toxicidade aguda foram utilizados cloreto de sódio (NaCl), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de magnésio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), brometo de potássio (KBr), cloreto de potássio (KCl) e bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), todos provenientes da Vetec (Brasil). As nanopartículas foram preparadas utilizando Pluronic F-127 (Sigma Aldrich, EUA) e manteiga de cupuaçu (Bielus Ingredientes, Brasil). Para os demais ensaios foram empregados sulfato de sódio anidro, tween 80 (Neon, Brasil), dimetilsulfóxido (DMSO), etanol grau analítico (Vetec, Brasil) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (Sigma Aldrich, EUA). Timol (Sigma Aldrich, EUA) foi utilizado como controle positivo no ensaio de toxicidade aguda e ácido fosfotúngstico (Isofar, Brasil) como agente de contraste negativo na microscopia eletrônica de transmissão.

A mistura de óleos vegetais (CBA<sup>®</sup>) empregada no preparo dos nanocarreadores e nos ensaios de atividade biológica e toxicidade *in vitro* foi proveniente da Beraca (Grupo Clariant, Brasil, lote J2135010, densidade 0,906 g/cm<sup>3</sup>). Como padrão analítico interno para as análises por Cromatografia Gasosa foi utilizado (-)-linalol (Sigma Aldrich, EUA, pureza 98,4%, lote BCBW8867).

Para o desenvolvimento dos produtos cosméticos, as seguintes matérias-primas foram selecionadas: Optiphen<sup>®</sup> (Fagron, Brasil), Lecigel<sup>®</sup> (AQIA Química Inovativa, Brasil) e EDTA (SM Empreendimentos, Brasil).

Durante a condução dos experimentos as pesagens foram realizadas em balança analítica Marte, modelo 279159 (Brasil) e Sartorius, modelo TE 2145 (Alemanha). Além disso, foram empregados banho ultrassônico Ultrasonic Cleaner,

modelo USC 1400 (Unique, Brasil) e vórtex Genie, modelo G560 (Scientific Industries, Brasil).

O creme foi manipulado com silicone Belsil® EG 6000, DUB® ININ, cera Meghcare SEW 200 e microcápsulas Deepercaps® oriundos da Alianza magistral (Brasil). Os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico (TACC) e a fragrância foram da Engenharia das Essências (Brasil). Por fim, o emulsionante emulium® illustro foi proveniente da Chemyuniun (Brasil).

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DO CBA® QUANTO AO PERFIL FITOQUÍMICO

Para o início do estudo, foi realizada análise da matéria-prima (insumo CBA®) com a finalidade de estabelecer um perfil cromatográfico para a determinação da sua constituição fitoquímica. Baseado nas características físico-químicas do material (uma mistura de óleos vegetais) e do perfil esperado de substâncias químicas (ácidos graxos e compostos terpênicos), optou-se por trabalhar com a Cromatografia Gasosa com detecção por Espectrometria de Massas (CG-EM).

As análises foram realizadas empregando cromatógrafo GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu, Japão). Para tanto, um método analítico desenvolvido por Viccini e colaboradores (2014) foi empregado. As amostras foram injetadas utilizando um injetor automático (AOC-5000) em modo *split* (1:10) com volume de injeção de 1 µL. A coluna cromatográfica utilizada foi uma coluna capilar RTX-5MS®, recheio de 5% difenil ligado a polisiloxano, dimensões 30 m x 0,25 mm, espessura do filme 0,25 µm (Restek, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL min<sup>-1</sup>). Para fins de separação dos constituintes, foi empregado gradiente de temperatura, onde a temperatura foi mantida a 50°C por 5 minutos e, então, elevada a uma taxa de 4°C min<sup>-1</sup> até 200°C. Essa temperatura foi mantida por mais 5 minutos para expulsar possíveis componentes semivoláteis aderidos à coluna. O tempo total de corrida cromatográfica foi de 47,5 minutos. A temperatura da fonte de íons foi mantida a 200°C e a interface CG-EM foi mantida a 220°C. O tempo de corte antes do início da detecção do CG-EM foi de 5 minutos. A energia de ionização por impacto de elétrons foi de 70 eV e os espectros de massa foram escaneados entre 40 e 500 AMU. A identificação dos componentes foi realizada com base nos perfis de

fragmentação gerados pelo EM que foram comparados à biblioteca do equipamento (NIST08 *Mass Spectral Library*).

O preparo da amostra para a determinação do perfil cromatográfico foi realizado através da solubilização de 1 mL do insumo CBA<sup>®</sup> em 1 mL de metanol. A solução foi homogeneizada e 1 µL foi injetado no sistema em modo *split* (1:10) (concentração final do óleo = 906 µg mL<sup>-1</sup>).

#### 4.3 DESENVOLVIMENTO DO CLN

Para desenvolver o CLN, foram empregadas fase aquosa contendo tensoativo não iônico (Pluronic F-127) solubilizado em água ultrapura e a fase oleosa composta por lipídeo sólido (manteiga de cupuaçu). O lipídeo líquido empregado foi o próprio CBA<sup>®</sup>.

A fim de estabelecer a proporção ótima dos constituintes citados para a obtenção do CLN, tanto o diâmetro hidrodinâmico médio quanto o PI das nanopartículas foram avaliados. Entretanto, para a escolha da condição ótima, os valores de PI foram adotados como referência (menor que 0,3) (Ahuja; Jena; Paidi, 2015). As análises foram realizadas através da técnica de espalhamento de luz dinâmico (do inglês *Dynamic Light Scattering* – DLS) em equipamento Zetatrak (Microtrac, EUA).

Para o delineamento do experimento foi empregado um planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, cujos níveis escolhidos foram: 0,70 e 0,68% (m/v) para a proporção do tensoativo e 0,66 e 0,68% (m/v) para a proporção do lipídeo sólido (manteiga de cupuaçu). A proporção do lipídeo líquido (CBA<sup>®</sup>) não foi alterada. A definição das proporções foi baseada em estudos prévios realizados com nanopartículas lipídicas (Junqueira et al., 2022; Mockdeci et al., 2022; Soldati et al., 2018). Na Tabela 1 é apresentada a matriz de planejamento do experimento para estabelecimento da condição ótima.

Tabela 1 – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para estudar o efeito da proporção do tensoativo e do lipídeo sólido sobre o carreador lipídico nanoestruturado

Ensaio	Pluronic F-127 (% m/v)	Manteiga de cupuaçu (% m/v)	Óleo CBA® (% m/v)
1	0,70	0,66	
2	0,68	0,66	
3	0,70	0,68	4,12
4	0,68	0,68	

Fonte: Elaborado pela autora (2024).  
% m/v: porcentagem massa/volume.

Os cálculos estatísticos foram realizados de acordo com Barros Neto, Scarminio e Bruns (2010). Dessa forma, os principais efeitos do planejamento foram calculados conforme as Equações 1 e 2, assim como a interação entre eles (Equação 3).

$$T = \frac{(\bar{y}_2 + \bar{y}_4)}{2} - \frac{(\bar{y}_1 + \bar{y}_3)}{2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$L = \frac{(\bar{y}_3 + \bar{y}_4)}{2} - \frac{(\bar{y}_1 + \bar{y}_2)}{2} \quad (\text{Equação 2})$$

$$T \times L = \left( \frac{\bar{y}_1 + \bar{y}_4}{2} \right) - \left( \frac{\bar{y}_2 + \bar{y}_3}{2} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:  $\bar{y}_i$  é a resposta média obtida de cada ensaio (1, 2, 3 e 4),  $T$  é o efeito decorrente do tensoativo e  $L$  é o efeito proveniente do lipídeo sólido.

A estimativa conjunta das variâncias experimentais foi calculada conforme Equação 4 a seguir.

$$s^2 = \frac{v_1 s_1^2 + v_2 s_2^2 + \dots + v_m s_m^2}{v_1 + v_2 + \dots + v_m} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:  $m$  é o número de ensaios diferentes,  $n$  é o número de repetições de cada ensaio,  $v_i = n_i - 1$  é o número de graus de liberdade de  $s_i^2$ , a estimativa da variância do  $i$ -ésimo ensaio.

Através da estimativa da variância experimental, foi possível determinar o erro padrão  $\hat{V}$  de cada efeito, assim como o erro padrão  $\hat{V}$  da média (Equações 5 e 6).

$$\hat{V}(\text{efeito}) = \sqrt{\frac{s^2}{2}} \quad (\text{Equação 5})$$

$$\hat{V}(\text{média}) = \sqrt{\frac{s^2}{n}} \quad (\text{Equação 6})$$

Por fim, uma vez estimados os erros padrão, é possível estabelecer intervalos de confiança para os valores dos efeitos utilizando a distribuição t de Student com 95% de confiança (Equação 7).

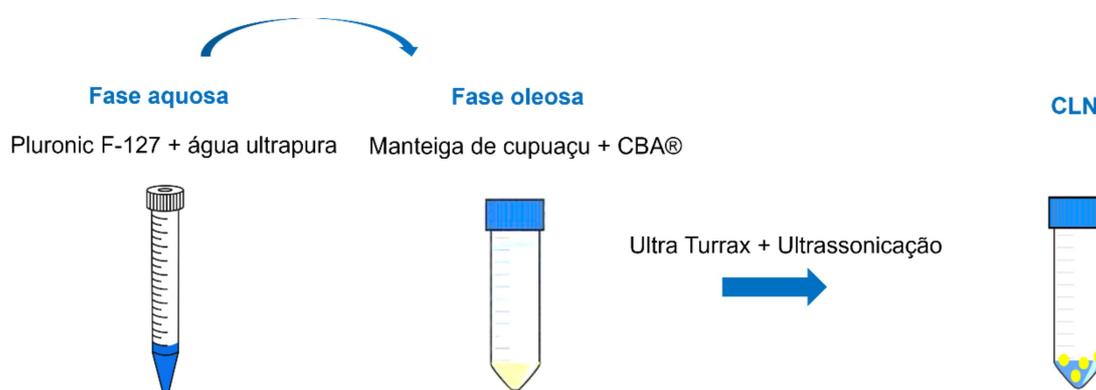
$$\hat{\eta} - t_v \times s_{(\text{efeito})} < \eta < \hat{\eta} + t_v \times s_{(\text{efeito})} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:  $\eta$  representa o verdadeiro valor de um efeito (valor populacional), sendo o acento circunflexo para indicar a estimativa desse valor a partir dos ensaios,  $t_v$  a distribuição t de Student e  $s_{(\text{efeito})}$  o erro padrão de um efeito.

A metodologia utilizada para a obtenção dos nanocarreadores foi a homogeneização por alto cisalhamento seguido de ultrassonicação (Junqueira et al., 2022; Mockdeci et al., 2022; Soldati et al., 2018). Nesse sentido, a fase oleosa (manteiga de cupuaçu) contida em frasco de 50 mL foi fundida em banho maria (Solidsteel, Brasil) a 45°C e o tensoativo foi solubilizado em 4,4 mL de água ultrapura com o auxílio de um vórtex em um tubo de 15 mL. Então, o lipídeo líquido (CBA®) foi adicionado ao frasco de 50 mL contendo a fase oleosa. Após, a fase aquosa foi aquecida na mesma temperatura que a fase oleosa com o auxílio do banho maria e foi vertida sobre a fase oleosa fundida com o CBA®. Esse sistema foi então levado para o Ultra Turrax (SilentCrusher M, Heidolph, Alemanha) a 12.000

rpm por 10 minutos, seguido por ultrassonicação em sonda ultrassônica por 10 minutos (6 mm de diâmetro, Vibra Cell, Sonics, EUA) com amplitude de 30% e temperatura de 25°C. Após a finalização do processo, a dispersão obtida foi mantida sob refrigeração (4°C) por 24 horas para solidificação do núcleo lipídico. Um resumo do procedimento de obtenção dos nanocarreadores é descrito na Figura 11.

Figura 11 – Esquema ilustrativo do preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados



Fonte: Elaborado pela autora (2024).  
CLN: Carreador Lipídico Nanoestruturado.

Após a determinação da condição ótima para o CLN contendo o CBA® (CLN-OC), a nanopartícula lipídica controle (NL-C) também foi produzida para ser utilizada nos experimentos. Para tal, utilizou-se o mesmo preparo descrito anteriormente, com exceção da adição da fase de lipídeo líquido (CBA®). Portanto, a nanopartícula controle foi composta apenas pela fase aquosa (tensoativo e água ultrapura) e o lipídeo sólido (manteiga de cupuaçu), sendo classificada como nanopartícula lipídica sólida (pela ausência da fração de lipídeo líquido).

### 4.3.1 Caracterização físico-química do CLN

#### 4.3.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, PI e potencial zeta

O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas, o PI e o potencial zeta foram determinados 24 horas após o preparo empregando a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento Zetasizer Nano series

(Malvern Instruments, Reino Unido), utilizando um ângulo de incidência do laser em relação à amostra de 173°.

Para analisar as amostras, foi necessário realizar uma diluição de 1:400 (v/v) em água ultrapura para que não ocorresse impacto no movimento browniano das nanopartículas e, por conseguinte, no espalhamento da luz e na mobilidade eletroforética das nanopartículas. Todas as determinações foram realizadas na temperatura de 25°C.

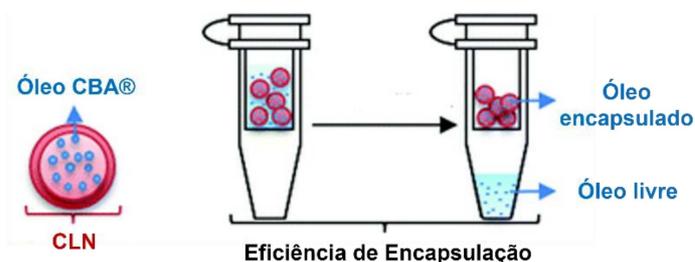
Foram produzidos dois lotes independentes de CLN, sendo que cada um deles foi analisado em triplicata no equipamento de DLS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). O teste *t* de Student foi empregado para a avaliação de diferença estatística significativa entre as médias dos grupos (lote 1 x lote 2 e amostra x controle). Para isso, foi utilizado o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4.3.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação

A EE representa a quantidade de substância de interesse (CBA<sup>®</sup>) que foi encapsulada no nanocarreador (López-Cabeza et al., 2021). Para tanto, a EE foi avaliada, indiretamente, utilizando o método de ultrafiltração em centrifuga, por intermédio da quantificação do sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno não encapsulado (livre) presente na fase aquosa da dispersão, que é separada do sistema com auxílio de uma membrana. O  $\beta$ -cariofileno foi estabelecido como marcador químico para as quantificações das amostras de CLN por ser o constituinte majoritário do CBA<sup>®</sup>, conforme observado na caracterização realizada para o insumo.

O método empregado foi aquele descrito por Mockdeci e colaboradores (2022) que aplicaram a técnica de ultrafiltração em centrifuga para a quantificação da fração livre do terpin-4-ol proveniente do óleo essencial de *Malaleuca alternifolia* Cheell. Assim, a dispersão de CLN foi diluída em água ultrapura (1:100, v/v) e alíquotas de 2 mL ( $n = 3$ ) foram transferidas para unidades de ultrafiltração Amicon<sup>®</sup> (NMWL 10.000 Millipore, Alemanha) e centrifugadas a 4.000 rpm por 30 minutos (Eppendorf 5810 R, Alemanha) (Figura 12). A diluição da amostra é uma etapa importante na determinação da EE, pois evita a possibilidade de deposição de cristais da substância de interesse na superfície do CLN, o que ocasionaria uma superestimativa do valor da EE (López-Cabeza et al., 2021).

Figura 12 – Esquema ilustrativo da técnica de ultrafiltração em centrífuga



Fonte: Adaptado de López-Cabeza et al. (2021).  
CLN: Carreador Lipídico Nanoestruturado.

Segundo informações do fabricante, com a utilização desse sistema, que é classificado de acordo com o peso molecular limite (do inglês *Nominal Molecular Weight Limit* - NMWL), a unidade de filtração classificada como NMWL 10.000 irá excluir moléculas com peso de até 10.000 Da. Portanto, como o  $\beta$ -cariofileno possui peso molecular de  $204,35 \text{ g mol}^{-1}$  não será retido pela membrana, porém as nanopartículas permanecerão retidas porque o tamanho do poro é de 1 nm (Merck, 2023).

Após a etapa de centrifugação e separação das fases, uma alíquota de 1,5 mL do filtrado (fase aquosa) foi transferida para tubos tipo eppendorf. Então, 1,0 mL desse material foi submetido à extração com 1 mL de hexano em frasco de vidro com tampa de teflon seguido por agitação manual vigorosa com o auxílio de um vórtex (1 minuto). Posteriormente, procedeu-se para a separação de fases da mistura, onde a fração orgânica (superior) foi recolhida e filtrada em um sistema preparado em pipeta de Pauster para esgotamento de qualquer resíduo de água do extrato hexânico. Esse sistema foi preparado pela imobilização de um pequeno pedaço de algodão na pipeta de Pauster com uma pequena quantidade de sulfato de sódio anidro. O extrato limpo foi então acondicionado em *vial* cromatográfico e 1  $\mu\text{L}$  foi injetado no CG-EM em modo *split* (1:10) conforme condições cromatográficas descritas no item 4.2.

A eficiência de encapsulação foi determinada por intermédio da Equação 8.

$$EE = \frac{C_{t_{OC}} - C_{livre_{OC}}}{C_{t_{OC}}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde:  $EE$  = Eficiência de Encapsulação,  $C_{tOC}$  a concentração total de CBA<sup>®</sup> adicionada ao sistema (em termos de  $\beta$ -cariofileno) e  $Clivre_{OC}$  a concentração de CBA<sup>®</sup> livre quantificada no ultrafiltrado (em termos de  $\beta$ -cariofileno).

#### 4.3.1.2.1 Estudo de solubilidade do $\beta$ -cariofileno em água

Diante da necessidade de realizar o ensaio de EE, um parâmetro importante que deve ser considerado é o limite de quantificação (LQ) do método analítico, uma vez que concentrações muito baixas de  $\beta$ -cariofileno podem estar presentes na fase aquosa do sistema de ultrafiltração em centrífuga, descrito anteriormente.

O LQ corresponde à menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (Brasil, 2017).

Nesse contexto, primeiramente foi executado o estudo de solubilidade do  $\beta$ -cariofileno em água. Partindo da informação de que a sua solubilidade em água é de 0,05011 mg L<sup>-1</sup> a 25°C (Pubmed Compound, 2023), uma solução saturada do CBA<sup>®</sup> em água purificada foi preparada. Uma alíquota de 200  $\mu$ L do óleo foi volumetricamente transferida para um tubo de 15 mL, onde 5 mL de água ultrapura foram adicionados com o auxílio de uma pipeta automática. Esse sistema foi levado para um vórtex onde permaneceu em agitação vigorosa por 5 minutos. Após esse tempo, ocorreu a formação de uma emulsão óleo/água que foi separada com o auxílio de uma centrífuga a 4.000 rpm por 40 minutos (Eppendorf 5810 R, Alemanha).

Obtendo-se a separação de fases do sistema, a extração com hexano foi iniciada. Para tal, uma alíquota de 2 mL da fração aquosa saturada foi volumetricamente transferida para um tubo de ensaio de vidro com tampa de teflon, onde 2 mL de hexano foram volumetricamente adicionados. O sistema foi agitado manualmente de maneira vigorosa e com o auxílio de um vórtex por 1 minuto. Então, aguardou-se a separação de fases e a fração orgânica (superior) foi submetida ao processo de eliminação do resíduo de água utilizando o mesmo aparato montado em pipeta de Pauster descrito no item 4.3.1.2. Por fim, após o recolhimento da fração hexânica limpa, 500  $\mu$ L do extrato hexânico foram volumetricamente transferidos para um *vial* cromatográfico, onde 500  $\mu$ L de uma solução padrão interno de linalol (concentração final = 536,28  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) foram volumetricamente

adicionados. Uma alíquota de 1  $\mu\text{L}$  dessa solução foi então injetada em modo *split* (1:10) no CG-EM conforme condições cromatográficas descritas no item 4.2.

O sinal analítico obtido para o  $\beta$ -cariofileno foi comparado ao ruído da linha de base do equipamento, de modo que novos preparos foram realizados a partir do mesmo extrato hexânico obtido, com a finalidade de obter o menor sinal analítico possível para o composto químico com uma razão sinal ruído de, no mínimo, 10:1 (Brasil, 2017).

Para as análises de quantificação realizadas por CG-EM foi empregado o método de adição de padrão interno. Na escolha de uma substância química como padrão interno, alguns requisitos devem ser levados em consideração, a saber: o pico cromatográfico referente ao padrão interno deve estar bem resolvido em relação aos picos dos outros componentes da amostra, não deve reagir com nenhuma substância da amostra e deve possuir estrutura química semelhante à substância de interesse que se deseja quantificar (Ligiero et al., 2009). Nesse sentido, foi adotado o linalol como padrão interno, um monoterpene presente no óleo essencial de diversas plantas. Durante o processo, uma quantidade conhecida desse padrão é adicionada cuidadosamente nas amostras e a razão entre as áreas do pico do padrão interno e do analito funciona como parâmetro analítico na quantificação.

#### 4.3.1.2.2 Determinação do limite de quantificação do método

Partindo dos resultados referentes ao estudo de solubilidade do  $\beta$ -cariofileno em água, foi realizado o ensaio de determinação do LQ propriamente dito. Para esse propósito, foi preparada uma nova solução saturada do CBA<sup>®</sup> em água purificada seguindo o mesmo procedimento descrito previamente no item 4.3.1.2.1. Da mesma forma, todo o procedimento de extração e obtenção da fração hexânica seguiu o preparo do item 4.3.1.2.1.

Para fins de determinação do LQ, o procedimento foi realizado em quintuplicatas independentes ( $n = 5$ ) e optou-se por adotar a abordagem estabelecida pela *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) para o cálculo (IUPAC, 1997) em substituição à determinação pelo método visual. Segundo a IUPAC (1997), o LQ pode ser determinado a partir de 10 vezes o valor do DP da média dos resultados de uma replicata de injeções do branco da amostra com adição da menor concentração aceitável do analito. Por se tratar de uma matriz

analítica complexa, inviabilizando a obtenção de um branco (todos os componentes da amostra exceto o analito), considerou-se como branco a solução preparada a partir do extrato hexânico de modo a obter a menor concentração do  $\beta$ -cariofileno com razão sinal ruído de 10:1, determinada previamente pelo método visual.

Portanto, 10  $\mu$ L do extrato hexânico foram volumetricamente transferidos para um vial cromatográfico, onde foram volumetricamente adicionados: 490  $\mu$ L de hexano e 500  $\mu$ L de uma solução de padrão interno de linalol (concentração final = 477,24  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). Uma alíquota de 1  $\mu$ L dessa solução foi então injetada em modo *split* (1:10) no CG-EM, conforme condições cromatográficas descritas no item 4.2. Então, o LQ foi determinado consoante Equação 9.

$$LQ = 10 \cdot DP \quad \text{(Equação 9)}$$

Onde: *LQ* corresponde ao limite de quantificação e *DP* ao desvio padrão da média dos valores de concentração experimental de  $\beta$ -cariofileno da quintuplicata de análise.

Um Coeficiente de Variação (CV) de até 20% foi adotado como especificação para as réplicas preparadas no LQ considerando a complexidade da matriz vegetal em análise, ou seja, uma mistura de óleos vegetais com grande número de constituintes (Guia Q2R1 do ICH; do inglês *International Conference on Harmonization*) e a necessidade de uma etapa prévia de extração da amostra (Gachumi et al., 2021).

#### 4.3.1.3 Determinação da morfologia do CLN por Microscopia Eletrônica

##### 4.3.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras do CLN-OC e NL-C foram preparadas conforme o procedimento descrito no item 4.3. Após 24 horas, foram submetidas ao processo de liofilização (JJ Científica, LJJ04F, Brasil) para possibilitar a análise por MEV. As condições de liofilização empregadas foram temperatura de -51,3°C por 24 horas sob vácuo. Então, as mesmas foram acondicionadas em dessecador até a análise por MEV.

O material dessecado foi analisado por MEV (Hitachi, TM 3000, Japão) com aceleração de feixe de elétrons de 15 kV em aumento de 1000x. Para isso, uma pequena quantidade de cada amostra foi fixada em uma fita de carbono, que foi depositada em uma haste de metal e encaminhada para o microscópio.

A análise foi realizada tanto para a nanopartícula controle quanto para a nanopartícula contendo o CBA<sup>®</sup>, com a finalidade de comparar diferenças na superfície entre elas.

#### 4.3.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise de MET, 24 horas após a obtenção das nanopartículas, a dispersão de CLN-OC foi diluída em água ultrapura (1:5, v/v) e 10 µL foram depositados sobre uma grid coberta com filme de carbono (formvar) (Ted Pella, EUA), por 10 minutos, para permitir a aderência sobre o substrato de carbono. Posteriormente, o excesso da dispersão foi removido com papel filtro e procedeu-se à adição de 10 µL do agente de contrastação negativa (solução aquosa de ácido fosfotúngstico 2%, m/v) por 1 minuto. Da mesma forma, o remanescente da solução foi retirado com papel filtro. A amostra foi deixada em temperatura ambiente por 24 horas para secagem e analisada por MET (Hitachi, HT 7800, Japão), sob fonte de aceleração de elétrons de 100 kV.

#### 4.3.2 Avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas

Após o preparo, as nanopartículas com o CBA<sup>®</sup> e as nanopartículas controle foram armazenadas em tubos de 50 mL e ao abrigo da luz em geladeira (4°C). Então, uma estabilidade de curto prazo (90 dias) foi realizada, onde as amostras foram avaliadas nos tempos inicial, 15, 30, 60 e 90 dias. Os parâmetros adotados para a análise foram: diâmetro hidrodinâmico médio, PI e aspectos macroscópicos da dispersão. Para tanto, um dos dois lotes de CLN-OC produzidos foi aleatoriamente selecionado para o estudo de estabilidade, assim como a NL-C.

Os resultados foram avaliados utilizando Análise de Variância (ANOVA) de um fator, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação de grupos a 95% de

confiança. O *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA) foi utilizado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4.3.3 Determinação da densidade da dispersão aquosa dos CLNs

A densidade da dispersão dos CLNs foi determinada empregando-se a metodologia de densidade relativa utilizando picnômetro de vidro. A análise foi conduzida em temperatura de 20°C. Um picnômetro de vidro de 25 mL vazio e seco foi pesado e seu peso anotado. Em seguida, ele foi preenchido completamente com a dispersão de nanopartículas, evitando-se a formação de bolhas de ar e seu peso foi novamente anotado. Por fim e após a sua lavagem e secagem, ele foi novamente preenchido com água purificada, evitando a formação de bolhas, e pesado. O cálculo da densidade foi realizado de acordo com a Equação 10. A análise foi realizada em triplicata (resultado expresso como média  $\pm$  DP).

$$\text{Densidade (g/cm}^3\text{)} = \frac{M_2 - M_0}{M_1 - M_0} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:  $M_0$  corresponde à massa do picnômetro vazio (em gramas),  $M_2$  à massa do picnômetro com a amostra (em gramas) e  $M_1$  à massa do picnômetro com a água (em gramas).

#### 4.3.4 Cálculo da proporção óleo/sistema nanoparticulado na condição ótima

Considerando que a pesquisa foi conduzida com a dispersão de nanopartículas em água e não com o sistema liofilizado delas, a fim de facilitar os cálculos, a proporção de CBA<sup>®</sup> para o sistema nanoparticulado como um todo (proporção v/m) foi determinada. Esse procedimento foi realizado no intuito de estabelecer um valor que pudesse ser empregado nos cálculos de concentração das soluções preparadas com as nanopartículas nos ensaios *in vitro*, de maneira que os resultados pudessem ser expressos todos em termos de CBA<sup>®</sup>. Assim, foi realizado um cálculo de proporção (v/m) tomando como base o volume total de CBA<sup>®</sup> adicionado (200  $\mu$ L) e a massa total do sistema (4,4608 g). Esse valor foi empregado

nos cálculos de concentrações, assim como a densidade obtida para a dispersão dos CLNs.

#### 4.4 TRIAGEM DE AVALIAÇÕES *IN VITRO* DOS CLNs

##### 4.4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do CBA<sup>®</sup>, da nanopartícula controle (NL-C) e do carreador lipídico nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup> (CLN-OC) foram avaliados utilizando o método de sequestro de espécies reativas de oxigênio, através da redução do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (do inglês *1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil* - DPPH), conforme descrito por Qin e colaboradores (2014) com pequenas modificações.

Uma solução de DPPH foi preparada através da pesagem de 1 mg de DPPH, transferência para um balão volumétrico de 50 mL, solubilização em etanol com auxílio de banho ultrassônico por 3 minutos e aferição do volume com o mesmo solvente (concentração final = 20 µg mL<sup>-1</sup>).

A solução estoque da amostra de CBA<sup>®</sup> foi preparada através da transferência de 10 µL do óleo para um frasco de vidro com tampa de teflon, seguido pela adição volumétrica de 10 µL de uma mistura de tween 80/DMSO (1:1, v/v) e 1980 µL de etanol (concentração final = 4530 µg mL<sup>-1</sup> de CBA<sup>®</sup> *in natura*, com a correção pela densidade do óleo de 0,906 g cm<sup>-3</sup>). A solução estoque da amostra de CLN-OC foi preparada a partir da transferência volumétrica de 224 µL da dispersão para um frasco de vidro com tampa de teflon, seguido pela adição volumétrica de 1776 µL de etanol (concentração final = 4530 µg mL<sup>-1</sup> de CBA<sup>®</sup> nanoencapsulado). A solução estoque da amostra de NL-C foi obtida da mesma forma que a solução estoque de CLN-OC.

Após o preparo e homogeneização das soluções estoque, as mesmas foram diluídas através da transferência volumétrica de 200 µL para tubo tipo eppendorf, seguido pela adição de 800 µL de etanol, de maneira a obter soluções na concentração de 906 µg mL<sup>-1</sup>. Então, diluições seriadas (1:2, v/v, n = 12) em tubos tipo eppendorf foram realizadas utilizando etanol como diluente. Após, em placa de 96 poços, alíquotas de 50 µL de cada uma das concentrações foram adicionadas e

150  $\mu\text{L}$  da solução estoque de DPPH. Dessa forma, a seguinte faixa de concentração final foi obtida na placa: 0,111 a 226,500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , em termos de CBA® *in natura* ou nanoencapsulado (CLN-OC). Para cada uma das concentrações um branco foi preparado por meio da transferência volumétrica de 50  $\mu\text{L}$  das amostras teste e 150  $\mu\text{L}$  de etanol para a placa de 96 poços, a fim de eliminar possíveis interferências nos resultados obtidos. Cada concentração foi testada em triplicata na placa.

As placas de 96 poços foram submetidas à agitação em agitador de placas (SI-0400, Genie Scientific, EUA) por 3 minutos, seguido por repouso à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 30 minutos. Por conseguinte, a leitura de absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível em comprimento de onda de 510 nm (Multiskan Go-1510, Thermo Fisher Scientific, EUA). Então, para a determinação da atividade antioxidante nas concentrações testadas foi empregada a Equação 11.

$$\text{Atividade antioxidante (\%)} = \frac{(A_{\text{amostra}} - A_{\text{controle}})}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad (\text{Equação 11})$$

Onde:  $A_{\text{amostra}}$  corresponde à absorvância da amostra contendo o DPPH,  $A_{\text{controle}}$  corresponde à absorvância do branco (amostra com etanol apenas) e  $A_{\text{DPPH}}$  corresponde à absorvância da solução etanólica de DPPH.

A partir dos valores obtidos, uma curva que relaciona a concentração com a porcentagem de atividade antioxidante foi construída para cada amostra. Na presença de uma resposta dose dependente, os valores de Concentração Inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) são obtidos, ou seja, a concentração capaz de diminuir ou reduzir a concentração inicial do radical DPPH em 50%.

ANOVA de um fator, seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação de grupos a 95% de confiança, foi empregada na análise dos resultados. O *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA) foi utilizado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4.4.2 Toxicidade aguda

O modelo de bioensaio *in vitro* empregando o organismo invertebrado *Artemia salina* Leach foi escolhido para a predição da toxicidade aguda. O ensaio foi realizado conforme descrito por Meyer e colaboradores (1982) com algumas modificações. Os ovos encistados do microcrustáceo foram obtidos da empresa Maramar Aquacultura (Rio de Janeiro, Brasil) e incubados por 48 horas com água marinha artificial (pH entre 8 e 9) à temperatura ambiente e com luminosidade adequada, obtida com o auxílio de uma lâmpada. A água marinha artificial foi preparada conforme metodologia descrita por Martins e colaboradores (2019), compreendendo: NaCl 24,0 g L<sup>-1</sup>; CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1,5 g L<sup>-1</sup>; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 11,0 g L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4,0 g L<sup>-1</sup>; KBr 0,1 g L<sup>-1</sup>; KCl 0,7 g L<sup>-1</sup>; NaHCO<sub>3</sub> 0,3 g L<sup>-1</sup>. Na Figura 13, é mostrado *A. salina* após a eclosão dos ovos em água marinha artificial.

Figura 13 – *Artemia salina* em água marinha artificial



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: Imagem retirada em fundo escuro para facilitar a visualização dos microcrustáceos.

Três soluções estoque distintas foram preparadas (Tabela 2), compreendendo as amostras do óleo *in natura* e das nanopartículas (CLN-OC e NL-C). Uma mistura de tween 80/DMSO (1:1, v/v) foi utilizada para o preparo do óleo. Tomando como base as soluções estoque, diluições de cada uma delas foram realizadas em tubo de 50 mL através da transferência volumétrica de 2,5 mL seguido pela adição volumétrica de 12,5 mL de água marinha artificial (concentração final = 1000 µg mL<sup>-1</sup>). Então, a partir dessas, uma diluição seriada (1:2, v/v, n = 5) em tubos de 50 mL foi realizada para cada uma das amostras, de maneira a obter a seguinte faixa de concentração final: 10 a 1000 µg mL<sup>-1</sup> de CBA<sup>®</sup> *in natura* ou nanoencapsulado.

Todas as concentrações testadas foram preparadas em triplicata (n = 18 preparos ao total para cada amostra).

Tabela 2 – Preparo das soluções estoque de CBA<sup>®</sup> *in natura* e nanopartículas para o ensaio de toxicidade aguda

Solução estoque	Volume inicial (mL)	Tween 80/DMSO (1:1) (mL)	Água marinha artificial (mL)	Volume final (mL)	Concentração final (CBA <sup>®</sup> )
CBA <sup>®</sup>	0,066	0,054	9,88		6000 µg mL <sup>-1</sup>
CLN-OC	1,34	-	8,66	10,00	6000 µg mL <sup>-1</sup>
NL-C	1,34	-	8,66		-

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>; NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle; DMSO: Dimetilsulfóxido.

Como controle positivo do ensaio foi utilizado timol preparado na mesma faixa de concentração (n = 6) das amostras. Para o preparo da solução estoque de timol, 50,0 mg do mesmo foram pesados e transferidos para um gral, seguido por trituração. Posteriormente, ocorreu a solubilização com 0,054 mL de tween 80/DMSO (1:1, v/v) e 10 mL de água marinha artificial. O conteúdo foi cuidadosamente transferido para um balão volumétrico de 50 mL e deixado em um banho ultrassônico durante 15 minutos para completa solubilização. Após o resfriamento à temperatura ambiente, novas lavagens do gral foram realizadas com água marinha artificial, seguido pela transferência para o balão volumétrico de 50 mL. Então, o volume foi aferido com água marinha artificial (concentração final = 1000 µg mL<sup>-1</sup>). Após, preparou-se a diluição seriada para a obtenção da mesma faixa de concentração final: 10 a 1000 µg mL<sup>-1</sup> de timol, sendo que todas as concentrações foram preparadas em triplicata (n = 18 preparos ao total).

Como controle negativo, foram utilizados a água marinha artificial e a mistura de tween 80/DMSO (1:1, v/v) na proporção final empregada para a solubilização do óleo e do timol.

Para a realização do ensaio, 10 unidades do microcrustáceo foram cuidadosamente coletadas com o auxílio de uma lupa, uma pipeta de Pauster e iluminação adequadas e transferidas para uma placa suporte com poços numerados, onde 5 mL das soluções preparadas em cada concentração foram volumetricamente

adicionados. Então, após essa etapa de tratamento, os microcrustáceos foram deixados em incubação por 24 horas em temperatura ambiente e iluminação natural. Transcorrido esse período, o número de larvas mortas foi contado para cada concentração de cada amostra avaliada, utilizando uma lupa e iluminação adequada.

A letalidade (%) foi calculada através da comparação do número de larvas de *A. salina* sobreviventes nos poços controle em relação aos poços tratados, de acordo com a Equação 12.

$$L (\%) = \frac{(N^{\circ} \text{larvas vivas Amostra} - N^{\circ} \text{larvas vivas Controle})}{N^{\circ} \text{larvas vivas Controle}} \times 100 \quad (\text{Equação 12})$$

Onde: *L* equivale à letalidade (em porcentagem) e *N*° corresponde a número.

Foi utilizado o método de análise de probitos, onde os valores de porcentagem de letalidade foram empregados na determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>) por interpolação no gráfico do logaritmo da concentração *versus* probitos, através de uma análise de regressão linear utilizando o *software* Microsoft Excel 2308 (Microsoft, EUA). A DL<sub>50</sub> é definida como a concentração necessária para causar a morte de 50% das larvas de *A. salina* (Martins et al., 2019). Os intervalos de confiança a 95% também foram calculados para os valores médios de DL<sub>50</sub> obtidos, usando o mesmo *software*.

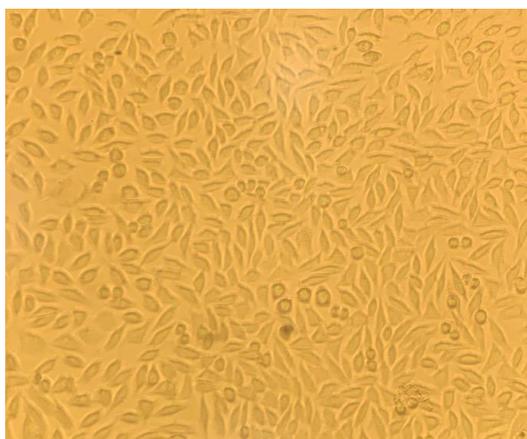
#### 4.4.3 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado conforme protocolo descrito por Mosmann (1983) com modificações empregando a metodologia do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico]). Trata-se de um sal tetrazólico de cor amarela que é reduzido e adquire coloração azul em função da atividade oxidativa das células, funcionando como um indicador da função mitocondrial e, portanto, da viabilidade celular (Mosmann, 1983).

A linhagem celular imortalizada de fibroblastos murinos (L929) foi empregada (Figura 14). O cultivo das células foi realizado em placas de Petri contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB inativado, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina,

100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de estreptomicina e 10 mM de tampão HEPES, pH 7,4, mantidas em estufa com atmosfera umidificada a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  (Thermo Fisher Scientific, modelo 3111, EUA).

Figura 14 – Linhagem celular L929 de fibroblasto murino em microscópio invertido



Fonte: Elaborado pela autora (2024). Objetiva de 20x.

Após atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e cultivadas em placas de 96 poços com densidade celular de  $5 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ , estimada a partir da contagem realizada em câmara de Neubauer empregando o corante azul de trypan. Após o plaqueamento, as células foram incubadas em estufa com atmosfera modificada a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24 horas para aderência celular. Então, o meio de cultura foi substituído pelos tratamentos. As soluções estoque das amostras avaliadas foram preparadas de acordo com a Tabela 3. Cada concentração foi avaliada em quintuplicata nas placas.

Tabela 3 – Preparo das soluções estoque de CBA<sup>®</sup> *in natura* e nanopartículas para o ensaio de viabilidade celular

Solução estoque	Volume inicial ( $\mu\text{L}$ )	DMSO 0,5% (v/v, $\mu\text{L}$ )	Meio de cultura ( $\mu\text{L}$ )	Volume final ( $\mu\text{L}$ )	Concentração final (CBA <sup>®</sup> )
CBA <sup>®</sup>	11	10	1979		5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
CLN-OC	247	-	1753	2000	5000 $\mu\text{g mL}^{-1}$
NL-C	247	-	1753		-

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>; NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle; DMSO: Dimetilsulfóxido; v/v: volume/volume.

Então, uma diluição de cada uma das soluções estoque foi preparada transferindo-se, volumetricamente, 0,8 mL para criotubo seguido pela adição de 1,2 mL de meio de cultura (concentração final = 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir dessas soluções, diluições seriadas (1:2, v/v, n = 12) foram realizadas de maneira a obter a seguinte faixa de concentração final na placa: 0,49 a 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CBA<sup>®</sup> *in natura* ou nanoencapsulado. Após a adição dos tratamentos, as placas foram novamente incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Como controle negativo do experimento foi utilizado apenas o meio de cultura e como controle de solvente foi avaliado o DMSO 0,5%.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com 100  $\mu\text{L}$  de Tampão Fosfato Salino (TFS) seguido pela adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução de MTT a 10% em meio de cultura (10  $\mu\text{L}$  de MTT a 5 mg  $\text{mL}^{-1}$  e 90  $\mu\text{L}$  de DMEM). As placas foram novamente incubadas por 3 horas e, posteriormente, os cristais de formazana formados foram dissolvidos com 100  $\mu\text{L}$  de DMSO. Por fim, a absorvância foi medida em espectrofotômetro com leitor de placas (Multiskan Go-1510, Thermo Fisher Scientific, EUA) em comprimento de onda de 540 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade celular (Equação 13) para cada concentração (média  $\pm$  DP). A CI<sub>50</sub>, ou seja, concentração que reduz a viabilidade celular em 50% foi determinada através da plotagem de gráfico correlacionando a mortalidade celular com as concentrações (Microsoft Excel 2308, Microsoft, EUA).

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (\text{Equação 13})$$

Onde:  $A_{\text{amostra}}$  corresponde à absorvância das células tratadas após a reação com o MTT,  $A_{\text{controle}}$  corresponde à absorvância das células não tratadas após a reação com o MTT.

Os resultados foram avaliados empregando ANOVA de um fator seguido do pós-teste de Tukey para comparação de grupos, utilizando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 4.5 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

Três formas farmacêuticas diferentes para aplicação facial foram desenvolvidas contendo os CLNs-OC. Para tanto, optou-se por trabalhar com fórmulas minimalistas (o menor número possível de constituintes) e veganas. As formas farmacêuticas desenvolvidas foram uma bruma e um sérum facial, formulações de base aquosa, além de um creme facial (emulsão do tipo água/óleo).

Durante a etapa de desenvolvimento das formulações foram observados aspectos como a obtenção de um produto macroscopicamente homogêneo, pH compatível com o da pele (4,0 a 6,0) (Proksch, 2018) e características organolépticas adequadas (cor, aspecto e odor).

##### 4.5.1 Desenvolvimento da bruma e sérum faciais

As composições quali e quantitativa das formulações-teste sérum e bruma (% p/p) estão descritas nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Composição da formulação cosmética bruma facial

Matéria-prima	INCI Name	(% p/p)	Função
Água destilada	<i>Water</i>	q.s.p.	Veículo
EDTA dissódico	<i>Disodium EDTA</i>	0,1	Agente quelante
Álcool etílico P.A.	<i>Alcohol</i>	10,0	Agente para secagem
CLN-OC	-	2,0	Ativo
Optiphen®	<i>Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol</i>	1,0	Conservante

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

INCI: *International Nomenclature Cosmetic Ingredient*. %p/p: porcentagem em peso.

q.s.p.: quantidade suficiente para. EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*.

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA®.

Tabela 5 – Composição da formulação cosmética sérum facial

Matéria-prima	INCI Name	(% p/p)	Função
Água destilada	<i>Water</i>	q.s.p.	Veículo
EDTA dissódico	<i>Disodium EDTA</i>	0,1	Agente quelante
Lecigel®	<i>Sodium Acrylates Copolymer (and) Lecithin</i>	1,3	Agente de viscosidade
CLN-OC	-	5,0	Ativo hidratante
Optiphen®	<i>Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol</i>	1,0	Conservante

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

INCI: *International Nomenclature Cosmetic Ingredient*. %p/p: porcentagem em peso.

q.s.p.: quantidade suficiente para. EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic Acid*.

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA®.

Durante o preparo da bruma, em béquer de vidro de 50 mL, todos os componentes foram pesados, iniciando-se pela pesagem do EDTA (do inglês *Ethylenediaminetetraacetic Acid*), seguido pela sua solubilização em água destilada, adição do álcool etílico, o sistema nanoparticulado e, por fim, o agente conservante. A formulação foi homogeneizada com auxílio de um bastão de vidro.

Para o preparo do sérum, em béquer de 50 mL, pesou-se inicialmente o EDTA, seguido pela adição da água destilada para a solubilização. O lecigel® foi pesado separadamente e adicionado aos poucos e sob agitação vigorosa em agitador magnético com temperatura controlada (45°C). A agitação e temperatura foram mantidas constantes até a total dispersão do polímero. Posteriormente ao resfriamento do sistema em temperatura ambiente, o carreador lipídico nanoestruturado e o conservante foram pesados e adicionados, seguido por homogeneização com o auxílio de um bastão de vidro.

O primeiro lote das formulações sérum e bruma foi submetido ao teste de estabilidade físico-químico preliminar.

#### **4.5.2 Desenvolvimento do creme facial**

Para a obtenção do creme (Tabela 6), os ingredientes da fase aquosa (glicerina e eletrólitos) foram pesados separadamente e transferidos para béquer de vidro de 50 mL. Os mesmos foram solubilizados em água destilada. Paralelamente, a fase oleosa foi preparada. Os ingredientes líquidos foram pesados separadamente e transferidos para béquer de vidro de 50 mL. Eles foram manualmente homogeneizados e as matérias-primas sólidas (manteiga de cupuaçu e Megh®Care SEW 200) foram pesadas e adicionadas ao mesmo béquer. O sistema foi aquecido em agitador magnético sob temperatura controlada (50°C) até a fusão de tais ingredientes. Então, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e imediatamente submetida a agitação mecânica em Ultra Turrax (SilentCrusher M, Heidolph, Alemanha) a 8.000 rpm por 15 minutos (sem a utilização de temperatura). O pH foi aferido e, após o resfriamento do sistema em temperatura ambiente, os nanocarreadores, o conservante e a fragrância foram acrescentados. O pH foi determinado através de fita de pH (Macherey-Nagel, pH-fix 0-14).

Por fim, os pigmentos foram misturados entre si e lentamente incorporados na formulação com o auxílio de um agitador mecânico (Fisatom 713D, Brasil) a 150 rpm utilizando hélice naval. O pH da emulsão final foi novamente aferido.

Tabela 6 – Composição da formulação cosmética creme facial

<b>Matéria-prima</b>	<b>INCI Name</b>	<b>(% p/p)</b>	<b>Função</b>
Água destilada	<i>Water</i>	q.s.p.	Veículo
Glicerina	<i>Glycerin</i>	3,0	Umectante
Sulfato de magnésio heptahidratado	<i>Magnesium sulfate</i>	1,0	Eletrólito
Cloreto de sódio	<i>Sodium chloride</i>	1,0	Eletrólito
Silicone Belsil® 6000	<i>Dimethicone (and) Divinyldimethicone/Dimethicone Crosspolymer</i>	10,0	Espessante e emoliente
Manteiga de cupuaçu	<i>Theobroma Grandiflorum Seed Butter</i>	5,0	Agente de consistência
DUB® ININ	<i>Isononyl Isononanoate</i>	5,0	Éster emoliente
TACC	<i>Caprylic/capric Triglyceride</i>	10,0	Éster emoliente
Vitamina E oleosa	<i>Tocopheryl acetate</i>	1,0	Antioxidante
Emulium® illustro	<i>Polyglyceryl-6 Polyhydroxystearate (and) Polyglyceryl-6 Polyricinoleate</i>	5,0	Agente emulsionante
Meghcare SEW 200	<i>Synthetic beeswax</i>	7,0	Reestruturante
CLN-OC	-	2,0	Ativo
Optiphen®	<i>Phenoxyethanol (and) Caprylyl Glycol</i>	0,75	Conservante
Fragrância	-	0,5	Fragrância
Deepercaps® yellow	<i>Zinc Oxide &amp; Iron oxide (CI 77492) &amp; Boron Nitride &amp; Magnesium Stearate &amp; Shea Butter &amp; Ethyl Cellulose &amp; Titanium Dioxide &amp; Cellulose Acetate</i>	1,85	Pigmento
Deepercaps® red	<i>Zinc Oxide &amp; Iron oxide (CI 77491) &amp; Boron Nitride &amp; Magnesium Stearate &amp; Shea Butter &amp; Ethyl Cellulose &amp; Titanium Dioxide &amp; Cellulose Acetate</i>	1,0	Pigmento
Deepercaps® black	<i>Zinc Oxide &amp; Iron oxide (CI 77499) &amp; Boron Nitride &amp; Magnesium Stearate &amp; Shea Butter &amp; Ethyl Cellulose &amp; Titanium Dioxide &amp; Cellulose Acetate</i>	2,15	Pigmento

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

INCI: *International Nomenclature Cosmetic Ingredient*. %p/p: porcentagem em peso.

q.s.p.: quantidade suficiente para. TACC: triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico.

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA®.

O creme facial não foi submetido aos ensaios de estabilidade, controle de qualidade e *performance*, que serão detalhados a seguir, sendo uma lacuna do presente estudo e alvo de investigações para futuros trabalhos.

### 4.5.3 Estabilidade físico-química da bruma e do s rum

#### 4.5.3.1 Avalia o da estabilidade preliminar

Após a obten o das formula es de s rum e bruma, elas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente por 24 horas para a realiza o do ensaio de estabilidade preliminar. Segundo a ANVISA, esse ensaio   utilizado na triagem das fórmulas desenvolvidas, ou seja, na fase inicial de desenvolvimento do produto. Ele utiliza condi es extremas no sentido de acelerar possíveis altera es e rea es entre os componentes das formula es (Brasil, 2004). Nesse sentido, foram conduzidos os testes de centrifuga o e de estresse térmico.

Para o teste de estresse térmico, as formula es foram submetidas a aquecimento sequencial (Solidsteel, Brasil) a 40 C e 50 C em banho maria termostatzado, mantendo-se por 30 minutos em cada temperatura, conforme estabelecido por Baby e colaboradores (2008). Para tanto, 4,0 g das formula es foram pesados e acondicionados em frascos de vidro do tipo *headspace* com, pelo menos, um terço do frasco vazio para que trocas gasosas pudessem ocorrer.

No teste de centrifuga o, 3,0 g das formula es foram pesados e transferidos para tubos de 15 mL, que foram centrifugados (Eppendorf 5810 R, Alemanha) a 3.000 rpm por 30 minutos (Brasil, 2004).

As amostras foram deixadas em temperatura ambiente para o resfriamento antes da realiza o dos testes (pH e características organolépticas) e todas as análises foram conduzidas em triplicata.

O pH das formula es foi avaliado antes e após os testes de estabilidade preliminar, empregando o método de potenciometria com potenciômetro digital (PG 1800, Gehaka, Brasil) previamente calibrado (solu es tampão pH 4,0 e 7,0) através da imersão direta dos eletrodos na amostra. Os resultados de pH foram expressos como média  $\pm$  DP e o teste *t* de Student foi empregado para a compara o entre as condi es inicial e final, empregando o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

Na potenciometria, o pH   determinado através da diferença de potencial entre dois eletrodos imersos na amostra a ser analisada, sendo dependente da atividade dos íons hidrogênio na soluço (Brasil, 2008).

Adicionalmente, as características organolépticas das fórmulas também foram avaliadas (cor, odor e aspecto) antes e após as condições de estresse. Os ensaios organolépticos objetivam verificar alterações como separação de fases, precipitação e turvação (Brasil, 2008).

#### 4.5.3.2 Avaliação da estabilidade acelerada

Uma vez que as formulações se mantiveram estáveis no teste de estabilidade preliminar, elas foram submetidas ao teste de estabilidade acelerada. Trata-se de um teste também empregado na fase de desenvolvimento do produto que fornece dados sobre a sua estabilidade, estimação do prazo de validade e da compatibilidade dos componentes da fórmula com o tipo de material utilizado na embalagem de acondicionamento (Brasil, 2004; Ferreira; Brandão, 2011).

Para a realização desse teste, 5,0 g das amostras foram pesados e transferidos para frasco *headspace* de vidro neutro e transparente onde, pelo menos, um terço do frasco foi mantido vazio para que trocas gasosas pudessem ocorrer. Além disso, utilizou-se tampas que garantissem uma boa vedação, evitando a perda de gases ou vapor para o meio. O teste foi conduzido pelo período de 90 dias.

As condições selecionadas para o ensaio de estabilidade acelerada basearam-se nos requisitos preconizados pela ANVISA (Brasil, 2004), a saber: (i) resfriamento em geladeira a 4°C, (ii) aquecimento em estufa a 45 ± 2°C (Novatecnica, NT522, Brasil) e (iii) exposição à radiação luminosa em câmara de fotoestabilidade (Farma, 424CF, Brasil) com temperatura de 30 ± 2°C. Além disso, amostras armazenadas em temperatura ambiente (exposição à luz visível, porém ao abrigo da luz solar) também foram avaliadas. As análises foram realizadas inicialmente no tempo zero, 24 horas e aos 7°, 15°, 30°, 60° e 90° dias de ensaio.

Para os testes de fotoexposição, empregou-se uma câmara de fotoestabilidade na configuração horizontal, na qual a bandeja de amostras permaneceu estacionária e na posição inferior, com o sistema de irradiação instalado na parte superior e uma estrutura interna de espelhos permitindo uma distribuição homogênea da luz (Figura 15) (Granizo, 2012). As configurações de lâmpada desse modelo pertencem à opção 2 do Guia Q1B do ICH (lâmpada

fluorescente branca fria e radiação UV próxima com uma distribuição espectral de 320 a 400 nm com emissão máxima de energia entre 350 e 370 nm).

Figura 15 – Câmara de fotoestabilidade utilizada no ensaio de exposição à radiação luminosa



Fonte: Ethick (2023).

C: gabinete da câmara. F: fontes de luz. A: área de exposição das amostras.

Os parâmetros adotados para a avaliação do comportamento das amostras foram pH e características organolépticas (cor, odor e aspecto). Para cada formulação e cada condição testada, as análises foram conduzidas em triplicata. Uma escala para a avaliação dos resultados dos testes do estudo de estabilidade acelerada em termos de características organolépticas foi elaborada, compreendendo: N = normal, sem alteração, LA = levemente alterado e IM = intensamente modificado.

Os resultados de pH foram expressos como média  $\pm$  DP e foram determinados consoante descrito anteriormente nos itens 4.5 e 4.5.1.1. O *software* Microsoft Excel 2308 (Microsoft, EUA) foi empregado para a construção dos gráficos de variação de pH ao longo dos 90 dias de estudo. O critério estabelecido para a avaliação do pH foi que o mesmo se mantivesse dentro da faixa de compatibilidade com a pele (4,0 a 6,0) (Proksch, 2018; Sasidharan; Joseph; Junise, 2014).

Quanto à avaliação das características organolépticas, as amostras do próprio produto armazenadas em temperatura ambiente foram estabelecidas como amostras de referência. Essa escolha se deu pelas características peculiares delas, com um número pequeno de constituintes (fórmulas minimalistas), diferenciando-se daquelas disponíveis comercialmente, cujo número de constituintes é elevado e, portanto,

diferente da proposta do presente estudo, sendo essa abordagem permitida pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Brasil, 2004). É importante reforçar que, ao longo do estudo de estabilidade, as amostras armazenadas em temperatura ambiente foram monitoradas quanto à manutenção das características organolépticas e de pH iniciais, com a finalidade de garantir a ausência de alterações significativas.

Um segundo lote das formulações foi produzido para a realização dos ensaios de estabilidade acelerada, bem como aqueles que serão descritos adiante nos itens 4.5.2 e 4.5.3, seguindo o mesmo processo de preparo detalhado na seção 4.5.

#### **4.5.4 Controle de qualidade físico-químico da bruma e do sérum**

Os ensaios de controle de qualidade físico-químico para as formulações bruma e sérum facial foram conduzidos consoantes o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Brasil, 2008). Nesse sentido, foram realizados os ensaios requeridos por esse Guia considerando cada tipo de forma farmacêutica desenvolvida.

##### *4.5.4.1 Determinação das características organolépticas*

As características organolépticas avaliadas foram aspecto, cor e odor com o objetivo de possibilitar um reconhecimento primário dos produtos. As análises foram realizadas empregando frascos de vidro transparentes do tipo *headspace*, em condição de boa luminosidade e utilizando fundo branco.

##### *4.5.4.2 Determinação do pH*

A determinação do pH foi realizada empregando o método de potenciometria. Para isso, utilizou-se um potenciômetro digital (PG 1800, Gehaka, Brasil) previamente calibrado com as soluções de calibração e limpo, cujos eletrodos foram inseridos diretamente sobre o produto. Um tempo de estabilização foi aguardado e, então, realizou-se a leitura do pH da amostra. A análise foi conduzida em triplicata e o resultado expresso como média  $\pm$  DP.

#### 4.5.4.3 Determinação da densidade

Com o intuito de determinar a densidade da bruma e do sêrum, utilizou-se o método da densidade relativa, que consiste na relação entre a densidade absoluta de uma substância e a densidade absoluta de outra substância utilizada como padrão (água destilada). Para isso, um picnômetro de vidro de 25 mL foi empregado. O teste foi conduzido em temperatura de 20°C.

Primeiramente, o picnômetro vazio foi pesado e seu peso anotado. A seguir, ele foi preenchido completamente com a amostra, evitando-se a introdução de bolhas e novamente pesado. Após secá-lo cuidadosamente, ele foi preenchido com água destilada e seu peso foi anotado. Então, a densidade foi calculada conforme Equação 10 descrita no item 4.3.3. O ensaio foi realizado em triplicata para cada formulação e os resultados expressos como média  $\pm$  DP.

#### 4.5.4.4 Determinação da viscosidade do sêrum

A viscosidade corresponde à medida de resistência de um produto à deformação ou ao fluxo. O teste de viscosidade consiste em medir a resistência de um material ao fluxo por meio da fricção ou do tempo de escoamento. É realizada utilizando um viscosímetro. Existem diferentes tipos de viscosímetro, a saber: rotativo, orifício e capilar. Cada um deles utiliza um método de análise diferente e é adequado para um tipo específico de amostra (Brasil, 2008).

Para a determinação da viscosidade do sêrum, empregou-se o viscosímetro rotativo do tipo Brookfield (Quimis, Q860M21, Brasil). Esse viscosímetro é indicado para a análise de fluidos com comportamento newtoniano e não newtoniano (Ferreira; Brandão, 2011) e baseia-se na medição do torque requerido para rodar um fuso imerso em um fluido para análise (Brasil, 2008).

Primeiramente, foi necessário selecionar o rotor e a velocidade adequados para a faixa de viscosidade da amostra. Para isso, as informações de seleção fornecidas no manual do equipamento (Quimis, 2013) foram adotadas, sendo necessária a escolha dos parâmetros que forneçam a leitura que mais se aproxima à escala de 50% do equipamento (correspondente ao desempenho ótimo do fio de torção “espiral”). O rotor de número 3 a 2 rpm foi selecionado. Então, ele foi inserido diretamente em 100 mL de amostra até a margem (sulco) da haste do rotor,

evitando-se a formação de bolhas. Após o nivelamento adequado, a leitura de viscosidade foi realizada e o resultado foi lido diretamente no *display* do painel do equipamento.

A temperatura da amostra durante o ensaio foi de 21,6°C, sendo que a especificação de temperatura para esse tipo de ensaio é fundamental, uma vez que influencia diretamente sobre os resultados de viscosidade (Ferreira; Brandão, 2011).

#### **4.5.5 Testes de *performance in vitro* da formulação sérum facial**

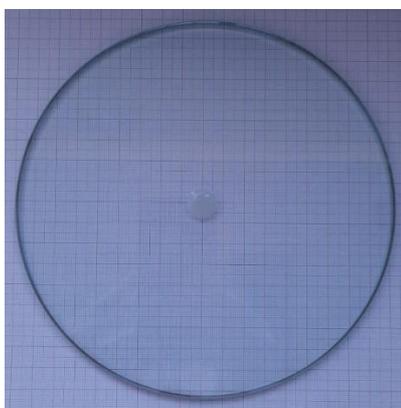
Os ensaios de *performance* são aqueles que avaliam o desempenho da formulação desenvolvida, fornecendo evidências *in vitro* de como elas podem se comportar *in vivo* (Brasil, 2021), ressaltando que esses ensaios não são aplicáveis à bruma, devido às suas características farmacotécnicas (forma farmacêutica líquida).

##### *4.5.5.1 Avaliação da espalhabilidade*

Com o objetivo de avaliar a espalhabilidade do sérum, foi utilizada a metodologia descrita originalmente por Knorst (1991) com algumas modificações, que se baseia na determinação da espalhabilidade em superfície lisa (placa de vidro).

Uma placa molde, circular, de vidro (diâmetro = 18 cm e espessura 5 mm) com orifício central de 1,2 cm de diâmetro (moldado por um suporte circular) foi posicionada sobre uma escala milimetrada. A amostra (0,15 g) foi cuidadosamente introduzida no orifício da placa moldado pelo suporte circular, sua superfície foi nivelada com uma espátula e, então, o suporte circular foi retirado (Figura 16). Após, uma placa de vidro de peso conhecido foi colocada sobre a amostra. Depois de 1 minuto foi realizada a leitura dos diâmetros abrangidos pela amostra (posições vertical e horizontal) para cálculo posterior do diâmetro médio. O procedimento foi repetido adicionando-se sucessivamente novas placas de peso conhecido e registrando, a cada determinação, a superfície de abrangência da amostra (diâmetros horizontal e vertical). A análise foi realizada em triplicata para cada placa de vidro de peso conhecido adicionada.

Figura 16 – Amostra depositada sobre placa de vidro lisa para análise de espalhabilidade



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Uma vez que a figura formada após a espalhabilidade da amostra é um círculo, os resultados foram expressos em espalhabilidade em função do peso aplicado, conforme Equação 14 adiante.

$$E_i = d^2 \times \pi/4 \quad (\text{Equação 14})$$

Onde:  $E_i$  corresponde à espalhabilidade da amostra para um determinado peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ ) e  $d$  ao diâmetro médio (mm).

Os resultados foram plotados em gráfico no Microsoft Excel 2308 (Microsoft, EUA) relacionando a espalhabilidade obtida ( $\text{mm}^2$ ) em função da massa de carga adicionada (g) e correspondem à média de três determinações  $\pm$  DP.

#### 4.5.5.2 Avaliação da oclusividade

A fim de comprovar a hipótese de utilização dos CLNs-OC como ativo hidratante no sérum facial, a capacidade oclusiva foi avaliada através do teste *in vitro* utilizando a metodologia de Vringer (Wissing; Muller, 2002), que é baseada na avaliação da evaporação de água a partir de uma membrana e na determinação do fator de oclusão (F).

O experimento foi conduzido com três amostras distintas: (i) a formulação sérum sem nenhuma nanopartícula, (ii) a formulação sérum com a NL-C e (iii) a

formulação sérum proposta no presente trabalho com os CLNs-OC. Cada uma delas foi avaliada em triplicata e um branco do ensaio foi empregado como controle.

Béqueres de vidro de 100 mL foram preenchidos com 50 mL de água destilada. Então, papéis de filtro qualitativos (acetato de celulose, 0,16 mm, retenção de partículas 4-12  $\mu\text{m}$ , Unifil, Brasil) foram separados e, sobre eles, foi realizada uma delimitação do círculo correspondente ao tamanho da abertura do béquer, que teve sua área calculada. Posteriormente, as amostras foram aplicadas, com o auxílio de uma espátula, de maneira a obter 13,3  $\text{mg cm}^{-2}$  de formulação espalhada na área delimitada no papel filtro, evidenciada através da formação de um filme fino. Após essa etapa, os papéis de filtro foram cuidadosamente colocados sobre a área de abertura do béquer de forma a vedá-lo com a superfície contendo a amostra voltada para a porção interna do béquer. Uma fita de teflon foi utilizada para auxiliar na vedação final do sistema. Eles foram levados para uma estufa com temperatura controlada a  $32 \pm 2^\circ\text{C}$  (temperatura da pele) pelo período de 48 horas (Novatecnica, NT522, Brasil).

As amostras foram pesadas no início da análise e nos intervalos de tempo de 6, 24 e 48 horas, com o intuito de avaliar a evaporação da água. O controle utilizado no experimento (branco) foi preparado da mesma forma, com exceção da etapa de aplicação de qualquer tipo de formulação no papel filtro. Para cada intervalo de tempo avaliado, o fator de oclusão ( $F$ ) foi determinado por intermédio da Equação 15 adiante.

$$F = \frac{A-B}{A} \times 100 \quad (\text{Equação 15})$$

Onde:  $F$  é o fator de oclusão (em porcentagem),  $A$  corresponde à perda de massa (g) do controle (branco) e  $B$  corresponde à perda de massa (g) da amostra testada.

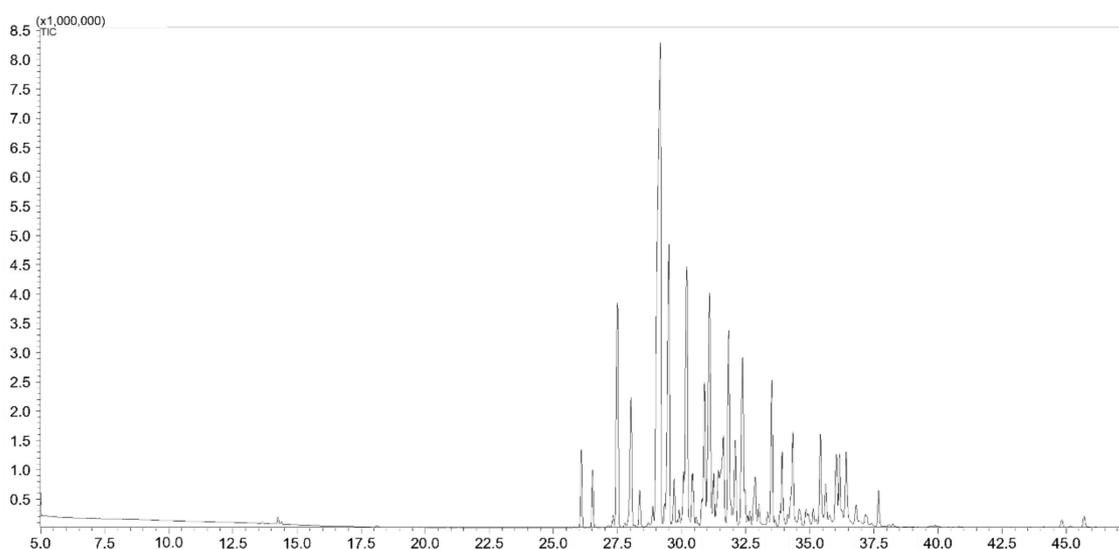
Os resultados foram plotados em um gráfico correlacionando as amostras e os fatores de oclusão ( $F$ ) obtidos em cada intervalo de tempo analisado. Ademais, teste  $t$  de Student a 95% de confiança foi aplicado, a fim de comparar as médias obtidas para os fatores de oclusão ( $F$ ) nas diferentes amostras ao final de 48 horas de experimento. Para tal, o *software* PRISM 5.0 (GraphPad, EUA) foi utilizado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DO CBA<sup>®</sup> QUANTO AO PERFIL FITOQUÍMICO

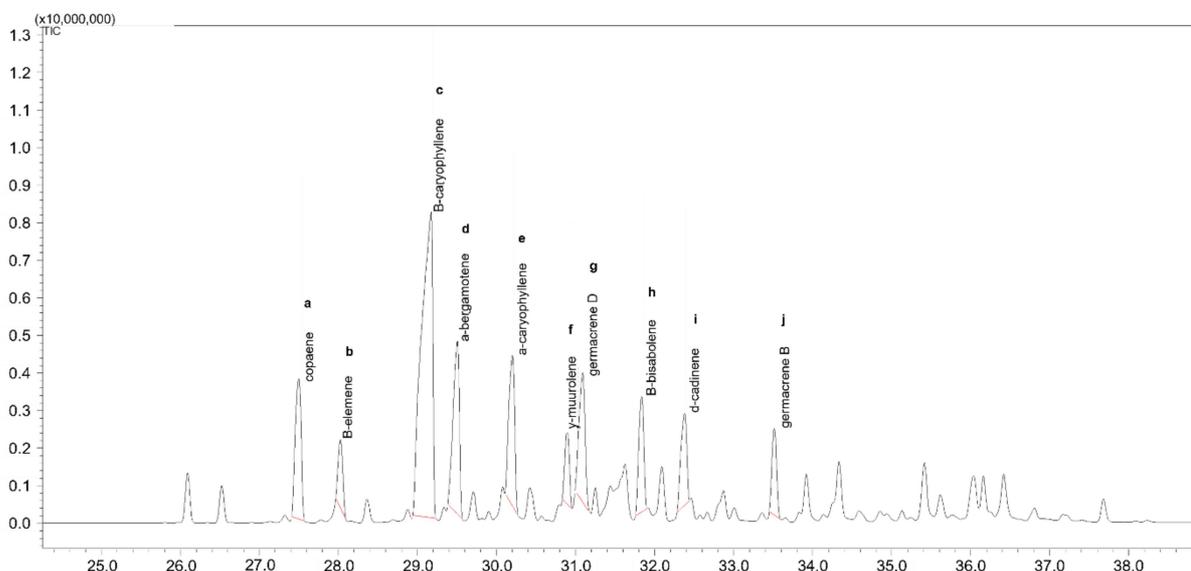
O método desenvolvido por Viccini e colaboradores (2014) para identificação e quantificação dos monoterpênicos citral e linalol foi empregado e permitiu o estabelecimento do perfil cromatográfico do CBA<sup>®</sup> como primeira etapa do desenvolvimento da pesquisa. Foi possível observar a presença de muitos constituintes, o que evidencia a composição fitoquímica complexa dessa matéria-prima (Figura 17). Adicionalmente, foi possível visualizar a composição terpênica majoritária, com diversos terpenos que foram identificados a partir da comparação dos seus espectros de massas com a biblioteca do equipamento (Figura 18 e Tabela 6). Ao avaliar a concentração dos terpenos, é notório que o  $\beta$ -cariofileno é o constituinte majoritário (37,00%), consoante definido pelo fabricante do óleo (teor mínimo de 28% segundo o certificado de análise, Anexo A), que também adota o  $\alpha$ -humuleno como marcador químico (teor mínimo de 3,7%, Anexo A). Entretanto, no presente estudo, o mesmo não foi identificado e quantificado dentro dos 10 picos principais de sesquiterpenos encontrados.

Figura 17 – *Fingerprint* obtido para o CBA<sup>®</sup> por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Figura 18 – Principais sesquiterpenos identificados por Espectrometria de Massas no CBA®



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

a: Copaeno. b:  $\beta$ -Elemeno. c:  $\beta$ -Cariofileno. d:  $\alpha$ -Bergamoteno. e:  $\alpha$ -Cariofileno. f:  $\gamma$ -Muroлено. g: Germacreno-D. h:  $\beta$ -Bisaboleno. i:  $\delta$ -Cadineno. j: Germacreno-B.

Tabela 7 – Composição sesquiterpênica obtida para o CBA®

Pico	Constituinte	Tempo de retenção (min)	% Área
a	Copaeno	27,5	9,11
b	$\beta$ -Elemeno	28,0	3,39
c	$\beta$ -Cariofileno	29,2	37,00
d	$\alpha$ -Bergamoteno	29,5	11,86
e	$\alpha$ -Cariofileno	30,2	9,59
f	$\gamma$ -Muroлено	30,9	3,63
g	Germacreno-D	31,1	8,54
h	$\beta$ -Bisaboleno	31,8	6,45
i	$\delta$ -Cadineno	32,4	5,99
j	Germacreno-B	33,5	4,44

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Uma vez que o CBA® é obtido a partir de uma mistura de dois óleos vegetais (*Passiflora edulis* – maracujá e *Copaifera officinalis* – copaíba), é esperado que constituintes de ambas as espécies estejam presentes no *fingerprint* estabelecido para a mistura.

O óleo de resina de copaíba consiste em ácidos diterpênicos que formam a fração resinosa e são dissolvidos em substâncias voláteis, os sesquiterpenos (Lima

et al., 2021). Os terpenoides são os principais constituintes de óleo resinas, com os sesquiterpenos presentes em maior concentração (Chen et al., 2009).

Todos os sesquiterpenos identificados e quantificados no perfil cromatográfico estabelecido para o CBA<sup>®</sup> são provenientes da fração do óleo de copaíba. Chen e colaboradores (2009) avaliaram o conteúdo de 31 sesquiterpenos em diferentes tecidos de *C. officinalis* em plantas com diferentes estágios de crescimento e demonstraram a composição sesquiterpênica rica e diversificada dessa espécie.

De forma diferente do óleo de *C. officinalis*, o óleo da semente de *P. edulis* possui uma constituição química de ácidos graxos, principalmente os insaturados, sendo representados pelo ácido linoleico majoritariamente, que representa cerca de 70% do total do óleo (Kawakami et al., 2021). Os constituintes provenientes da fração do óleo de maracujá não foram identificados na análise cromatográfica realizada no presente trabalho, uma vez que os ácidos graxos não são voláteis e nenhum tratamento de derivatização química foi realizado. Já os sesquiterpenos identificados no *fingerprint* realizado para o CBA<sup>®</sup> possuem a característica química de serem voláteis e, portanto, foi possível a sua análise no CG-EM sem uma etapa prévia de derivatização da amostra.

Diante da complexidade da matriz analítica da matéria-prima em análise e sabendo que o  $\beta$ -cariofileno é o constituinte majoritário da fração proveniente do óleo de copaíba, esse sesquiterpeno foi escolhido como o marcador químico para as análises cromatográficas.

É importante destacar que essa mesma metodologia cromatográfica desenvolvida por Viccini e colaboradores (2014) também foi empregada para a caracterização do óleo essencial de *Melaleuca artemifolia* Cheel e análises posteriores de eficiência de encapsulação de nanopartículas lipídicas contendo o referido óleo, além de estudo de permeação *ex vivo* de formulação com o sistema nanoparticulado incorporado, um trabalho desenvolvido por Mockdeci e colaboradores (2022). Nesse estudo, o constituinte escolhido como marcador químico para as análises cromatográficas foi terpinen-4-ol, um monoterpene. O óleo essencial de *M. artemifolia* possui uma composição fitoquímica rica e diversa em terpenos, semelhante à fração do óleo de copaíba da mistura CBA<sup>®</sup>, embora este último seja um óleo vegetal.

Os óleos essenciais se diferem dos óleos vegetais pela forma de extração (hidrodestilação do material vegetal), propriedades físico-químicas (odor e

volatilidade) e composição química (terpenoides e fenilpropanoides, principalmente). Os óleos vegetais ou óleos fixos possuem baixa volatilidade e composição química lipídica principalmente, representada por ácidos graxos e ceras, sendo obtidos por métodos como maceração, centrifugação, prensagem a frio ou extração das partes gordurosas da planta (Masiero et al., 2021). Tais características são observadas no óleo de *P. edulis* presente na mistura CBA®, porém o óleo resina de *C. officinalis* é uma exceção, uma vez que possui uma composição rica em terpenos, semelhante aos óleos essenciais.

## 5.2 DESENVOLVIMENTO DO CLN

A opção pela utilização do tensoativo Pluronic F-127 e da manteiga de cupuaçu na obtenção do nanocarreador foi estabelecida a partir de estudos preliminares de nanopartículas lipídicas (Junqueira et al., 2022; Mockdeci et al., 2022; Soldati et al., 2018) e buscando empregar uma manteiga de origem natural proveniente da biodiversidade brasileira.

A matriz X, bem como os resultados obtidos para os valores de PI do experimento conduzido no planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para otimização do CLN podem ser visualizados na Tabela 8.

Tabela 8 – Fatores, níveis e matriz de coeficientes de contraste do planejamento experimental conduzido para otimizar as proporções dos constituintes do nanocarreador

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	PI	PI médio
1	+1	-1	192,4	0,438; 0,436; 0,412	0,429
2	-1	-1	181,3	0,448; 0,399; 0,419	0,422
3	+1	+1	218,5	0,247; 0,240; 0,226	0,238
4	-1	+1	183,2	0,356; 0,355; 0,365	0,359

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

PI: *Polydispersity Index* (Índice de Polidispersão). % m/v: Porcentagem massa/volume.

X<sub>1</sub>: proporção de lipídeo sólido (% m/v) [(-1): 0,66; (1): 0,68].

X<sub>2</sub>: proporção de tensoativo (% m/v) [(-1): 0,68; (1): 0,70].

Conforme pode ser observado, a condição que forneceu melhor valor de PI para o CLN desenvolvido foi aquela referente ao ensaio número 3 (PI médio =

0,238), partindo do valor de referência adotado (PI menor que 0,3) (Ahuja; Jena; Paidi, 2015). É possível notar que pequenas variações nas concentrações do tensoativo e do lipídeo sólido refletem em variações no índice de polidispersão das nanopartículas, corroborando a importância da investigação desses parâmetros no desenvolvimento delas. Os valores de diâmetro hidrodinâmico médio para cada experimento também são apresentados na Tabela 8, embora seja possível notar que o impacto das variações realizadas sobre eles é menos relevante quando comparado ao PI. Portanto, a condição estabelecida como ótima para a produção das nanopartículas do presente trabalho foi aquela referente ao ensaio 3.

Além disso, foram calculados os principais efeitos do planejamento e suas interações com 95 % de confiança. Os resultados estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Efeitos e erros padrão calculados no planejamento experimental realizado no estudo da otimização da proporção dos constituintes do nanocarreador

	PI
<b>Média:</b>	0,362 ± 0,009
<b>Principais efeitos:</b>	
Tensoativo	0,057 ± 0,011
Lipídeo sólido	-0,127 ± 0,011
<b>Interação dos dois fatores:</b>	
Tensoativo x Lipídeo	0,064 ± 0,011
<b><math>t_v \times S_{\text{efeito}}</math>:</b>	0,025

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

PI: *Polydispersity Index* (Índice de Polidispersão).  $t_v \times S_{\text{efeito}}$ : significância do erro.

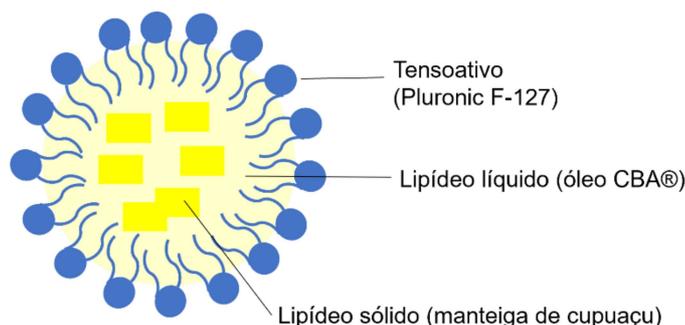
Como todos os valores de efeito foram maiores (em valor absoluto) que o valor de significância do erro a 95% de confiança, todos eles são considerados significativos, ou seja, os efeitos existem de fato. Dessa forma, foi possível corroborar estatisticamente através do planejamento fatorial que a variação da concentração tanto do tensoativo como do lipídeo sólido impactaram no índice de polidispersão das nanopartículas obtidas, ou seja, na sua amplitude de distribuição na amostra.

Conforme Wang e colaboradores (2019), os tensoativos exercem um papel importante na estabilização de nanopartículas lipídicas, especialmente em sistemas de dispersão. Quando a sua concentração é inferior a ideal, as partículas tendem a possuir um diâmetro hidrodinâmico e um PI maiores. Entretanto, acima da

concentração ideal, um efeito de agregação também pode acontecer diminuindo a estabilidade do sistema e aumentando os valores de PI.

É possível observar ainda, através da análise da Tabela 9, que a concentração de lipídeo sólido adicionada ao sistema é o fator que exerce maior impacto no PI (maior valor de efeito encontrado). Os lipídeos sólidos se caracterizam por possuir padrões de cristalinidade maiores que os lipídeos líquidos (Bahari; Hamishehkar, 2016), logo a maior cristalinidade do lipídeo sólido pode resultar em expulsão do fármaco e reorganização da matriz, gerando sistemas menos estáveis (valores de PI mais elevados). Na Figura 19 é apresentado um esquema ilustrativo do CLN desenvolvido no presente trabalho, demonstrando a mistura dos lipídeos sólidos e líquidos no núcleo.

Figura 19 – Ilustração do carreador lipídico nanoestruturado desenvolvido



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

## 5.2.1 Caracterização físico-química do CLN

### 5.2.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, PI e potencial zeta

DLS é uma técnica de análise espectroscópica não destrutiva de amostras que permite a medição correspondente à intensidade da luz espalhada pelas nanopartículas e o diâmetro hidrodinâmico de 1 a 1000 nm, quando as mesmas estão suspensas em um líquido. A medição é baseada no princípio do efeito Doppler, que afirma que a frequência da luz espalhada por uma partícula é alterada dependendo da sua velocidade. O PI foi avaliado pela mesma técnica e indica a amplitude de distribuição da população de nanopartículas da amostra (Jia et al., 2023).

Já o potencial zeta, também denominado potencial eletrocinético, corresponde ao potencial no plano de cisalhamento de uma partícula em dispersão movendo-se sob a influência de um campo elétrico (eletroforese) e representa a carga líquida da nanopartícula nessa condição. Quando uma partícula carregada se encontra em dispersão, uma camada elétrica é formada na sua superfície, composta de íons de carga oposta. Além dessa camada, uma camada difusa se desenvolve, consistindo em íons de carga igual e oposta. Durante a análise por eletroforese, a partícula se move em direção ao eletrodo de carga oposta com o plano de cisalhamento se tornando a interface entre as partículas móveis e o dispersante. Dessa forma, o potencial zeta é o potencial eletrocinético nessa interface partícula/fluido (Bhattacharjee, 2016).

Após a determinação das proporções ótimas de lipídeo sólido e tensoativo para a obtenção do CLN, a etapa de caracterização do mesmo foi iniciada. Na Tabela 10 são apresentados os resultados encontrados para os parâmetros de diâmetro hidrodinâmico médio, PI e potencial zeta. Já na Figura 20 é possível visualizar a dispersão coloidal obtida para a nanopartícula controle (NL-C) e a nanopartícula com o CBA<sup>®</sup> (CLN-OC), evidenciando uma diferença macroscópica entre os sistemas, com o segundo apresentando um aspecto mais leitoso que o primeiro.

Tabela 10 – Resultados obtidos na caracterização físico-química dos nanocarreadores

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	PI	Potencial zeta (mV)
CLN-OC Lote 1 (n = 3)	217,8 ± 2,5	0,237 ± 0,010	- 22,5 ± 3,5
CLN-OC Lote 2 (n = 3)	223,3 ± 3,7	0,236 ± 0,004	- 20,0 ± 0,2
Média (lotes 1 e 2) (n = 6)	220,5 ± 4,1	0,237 ± 0,007	- 21,3 ± 2,6
NL-C (n = 3)	101,5 ± 0,3	0,114 ± 0,006	- 17,0 ± 2,7
Lote 1 x Lote 2	p = 0,10	p = 0,88	p = 0,29
CLN-OC x NL-C	p < 0,0001*	p < 0,0001*	p = 0,02*

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

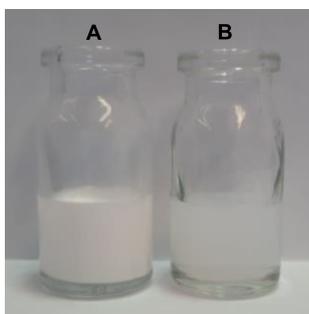
PI: *Polydispersity Index* (Índice de Polidispersão).

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>.

NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle.

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão. \*Diferença estatística significativa entre as médias (p<0,05).

Figura 20 – Dispersão coloidal obtida para a nanopartícula controle e a nanopartícula amostra



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>. B: Nanopartícula Lipídica Controle.

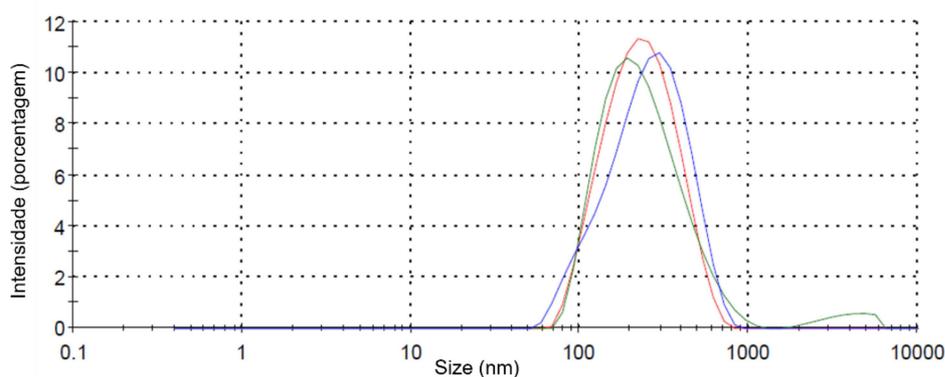
Conforme pode ser observado através da análise da Tabela 10, os CLN-OC apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de  $220,5 \pm 4,1$  nm. É possível notar que a metodologia empregada para a obtenção dos CLN (homogeneização por alto cisalhamento seguido de ultrassonicação) permitiu a obtenção de nanopartículas em tamanho adequado para a aplicação cutânea (Soldati, 2015). O diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas é um dos parâmetros relacionados ao seu grau de penetração através das camadas da pele, pois dependendo do tamanho, as nanopartículas podem seguir por diferentes vias. Nanopartículas maiores permanecem no local, enquanto as menores podem ser absorvidas e atingirem a corrente sanguínea. De uma maneira geral, tamanhos acima de 100 nm resultam em retenção cutânea, enquanto sistemas menores que 100 nm ou associados com métodos físicos de penetração cutânea podem atingir a corrente sanguínea (Garcês et al., 2018). Portanto, pensando em uma aplicabilidade cosmética para o CLN-OC desenvolvido, o diâmetro hidrodinâmico médio obtido é um indicativo de ação apenas a nível cutâneo, um fator desejado para a finalidade de aplicação no presente trabalho.

Por meio da análise da Tabela 10 é possível inferir ainda que o diâmetro hidrodinâmico médio da NL-C ( $101,5 \pm 0,3$  nm) é menor e estatisticamente diferente a 95% de confiança daquele obtido para o CLN-OC ( $220,5 \pm 4,1$  nm). Esse achado é importante, pois é um indicativo da encapsulação do CBA<sup>®</sup> no núcleo do carreador lipídico (Figura 19), o que reflete diretamente no aumento de seu tamanho.

A análise da Tabela 10 também possibilita notar um valor de PI inferior a 0,3 (Ahuja; Jena; Paidi, 2015) e, portanto, considerado adequado para o sistema

nanoparticulado desenvolvido (PI médio =  $0,237 \pm 0,007$ ). Isso indica uma distribuição homogênea da população de CLN desenvolvidos. Na Figura 21 é demonstrada a distribuição homogênea da triplicata de análise realizada para o lote 1 da amostra CLN-OC preparada, analisada por DLS.

Figura 21 – Curvas de distribuição obtidas para a análise de diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O potencial zeta é um parâmetro importante no estudo de caracterização de nanopartículas, pois pode ser um indicativo de estabilidade do sistema coloidal. No que tange à estabilidade eletrostática, consoante Patel e Agrawal (2011), as partículas podem ser classificadas em:  $\pm 0 - 10$  mV (altamente instáveis),  $\pm 10 - 20$  mV (relativamente estáveis),  $\pm 20 - 30$  mV (moderadamente estáveis) e  $\pm 30$  mV (altamente estáveis). Assim, baseado nessa classificação, o CLN-OC desenvolvido possui um indicativo de estabilidade moderada (potencial zeta médio =  $-21,3 \pm 2,6$  mV), por outro lado nota-se que a NL-C possui um indicativo de estabilidade relativa (potencial zeta médio =  $-17,0 \pm 2,7$  mV), diferença que foi considerada estatisticamente significativa a 95% de confiança pelo teste *t* de Student (Tabela 10).

Sugere-se como possível explicação para a diferença significativa entre a carga do controle e da amostra, a presença do CBA<sup>®</sup> no CLN-OC, levando a maior adsorção de íons hidroxila na interface óleo/água e, conseqüentemente, uma maior carga superficial negativa. De acordo com Liu e colaboradores (2006), a utilização de um tensoativo não iônico (como é o caso do Pluronic F-127) resulta na adsorção de íons hidroxila na interface óleo/água e ligações de hidrogênio entre os

grupamentos químicos presentes no Pluronic F-127 e os íons hidroxila, tornando a carga superficial do CLN negativa. Outra hipótese que pode justificar esse achado é a ionização dos ácidos graxos presentes na mistura de óleos vegetais nanoencapsulada, sendo que o ácido linoleico (principal ácido graxo) apresenta um valor de pKa igual a 4,77 a 25 °C (Pubmed Compound, 2023).

Para além da estabilização eletrostática, a estabilização estérica também deve ser considerada. Considerando a cadeia longa do tensoativo utilizado (peso molecular de 12600 Da), é sugerido que exista uma contribuição da estabilização estérica no sistema desenvolvido. De acordo com Honary e Zahir (2013), nanopartículas com potencial zeta  $\pm 20\text{mV}$  possuem estabilidade física de curta prazo. Entretanto, isso é válido para surfactantes de baixo peso molecular, que atuam por estabilização eletrostática apenas. Segundo esses autores, no caso de surfactantes de alto peso molecular, valores de potencial zeta iguais a 20 mV ou muito menores, podem fornecer estabilidade física adequada ao sistema.

É importante ressaltar que, apesar do potencial zeta ser um indicativo de estabilidade do sistema coloidal, existem outras propriedades que não são avaliadas através dele e que também estão relacionadas à estabilidade. O potencial zeta está relacionado à propriedade de repulsão eletrostática entre as nanopartículas, portanto, quanto maior o valor em módulo maior a repulsão eletrostática e menor a tendência a agregação. Todavia, de acordo com Bhattacharjee (2016), que realizou um trabalho extenso de revisão de literatura sobre DLS e potencial zeta, a estabilidade de um sistema coloidal não é explicada apenas pela repulsão eletrostática, mas sim pela soma da força atrativa de van der Waals e a força repulsiva eletrostática da dupla camada elétrica que surge nas nanopartículas quando estão em dispersão.

Além dos pontos abordados anteriormente, outro fato que pode explicar a boa estabilidade obtida para o sistema nanoparticulado está relacionado ao processo de formação de micelas do tensoativo. Nesse sentido, Pluronic é o nome dado para copolímeros tribloco do tipo poli (óxido de etileno)-poli (óxido de propileno)-poli (óxido de etileno), simplificado como  $\text{PEO}_m\text{-PPO}_n\text{-PEO}_m$ , onde os subscritos  $m$  e  $n$  denotam o número médio de repetições de cada bloco de cadeia. Esse arranjo  $\text{PEO}_m\text{-PPO}_n\text{-PEO}_m$  resulta em um polímero com característica anfifílica (Liu; Bao, Li, 2015). As variações na proporção PPO/PEO e no peso molecular (comprimento das cadeias das unidades PPO e PEO) conferem diferentes propriedades a eles.

Especificamente, para o Pluronic F-127, o código F-127 define que ele se apresenta na forma sólida, tem um bloco PPO de 3600 Da e 70% da sua estrutura é composta pelo monômero hidrofílico PEO (Kabanov et al., 2002). Uma propriedade conhecida do grupo Pluronic é a sua capacidade de formar micelas em meio aquoso, o que explica a sua utilização satisfatória no processo de obtenção de nanopartículas, conferindo ao sistema uma boa estabilidade (Cagel et al., 2017; Khullar et al., 2010). Em baixas concentrações do copolímero e em baixas temperaturas, os blocos PEO e PPO são solúveis em água e as cadeias PEO-PPO-PEO existem como *unimers*. Quando a concentração micelar crítica ou a temperatura micelar crítica são atingidas, os blocos PPO hidrofóbicos tendem a se agregar levando à formação de micelas (Liu; Bao, Li, 2015).

#### 5.2.1.2 Determinação da eficiência de encapsulação

Primeiramente foi realizado um estudo de solubilidade em água do marcador químico  $\beta$ -cariofileno selecionado para as quantificações por CG-EM. O menor sinal analítico obtido para o  $\beta$ -cariofileno com uma razão sinal ruído de 10:1 foi para a concentração de  $1,4296 \mu\text{g mL}^{-1}$ , determinada a partir da adição de padrão interno e demonstra a capacidade de extração de pequenas quantidades dessa substância a partir de uma solução aquosa empregando o hexano como solvente extrator (extração líquido-líquido). A partir dessa informação, foi determinado o LQ do método por CG-EM (consoante item 4.3.1.2.2), uma vez que pequenas concentrações de  $\beta$ -cariofileno livres são esperadas na análise de EE, assim o método precisa demonstrar exatidão e precisão aceitáveis para a quantificação dessa substância em níveis baixos. Na Tabela 11 são apresentados os resultados obtidos para o ensaio de limite de quantificação.

Tabela 11 – Resultados obtidos para a análise de limite de quantificação do método

Réplica	Concentração $\beta$ -cariofileno ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Desvio padrão	CV (%)	LQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Preparo 1	1,4296			
Preparo 2	1,2009			
Preparo 3	1,1079			
Preparo 4	1,3333	0,2671	19,4	2,6712
Preparo 5	1,7982			
Média (n = 5)	1,3740			

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

CV: Coeficiente de Variação. LQ: Limite de Quantificação. LQ = 10 vezes o desvio padrão obtido. Fator de Resposta ( $\beta$ -cariofileno/linalol): 1,325.

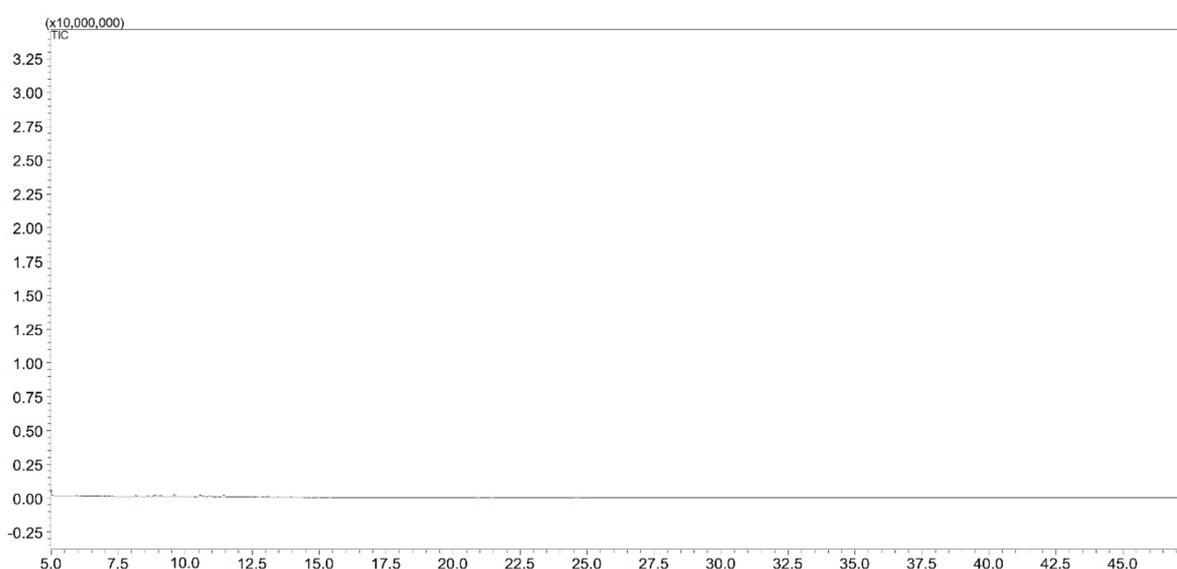
A análise dos dados da Tabela 11 anterior permite inferir que o LQ obtido para o método é de  $2,6712 \mu\text{g mL}^{-1}$ , ou seja, é a menor concentração de  $\beta$ -cariofileno que o método pode quantificar com precisão e exatidão aceitáveis nas condições estabelecidas de análise. Assim, esse valor foi adotado para os cálculos subsequentes da eficiência de encapsulação obtida para o CLN desenvolvido.

Um CV de 19,4% foi obtido entre as réplicas de preparo para a análise do LQ e foi considerado adequado (menor que 20%). Esse valor, embora alto, é considerado aceitável (Gachumi et al., 2021; ICH, 2005), já que provém da análise de uma matriz complexa (uma mistura de óleo vegetais com grande quantidade de constituintes) que requer um preparo de amostra em várias etapas, incluindo uma extração líquido-líquido que, conceitualmente, apresenta limitações, como a formação de emulsões durante o procedimento resultando em uma maior variabilidade nos resultados finais, conforme discutido por Temerdashev e colaboradores (2021) em seu trabalho de revisão de literatura sobre métodos de extração em fase sólida e líquida, mas que atendeu de maneira adequada à finalidade pretendida da análise realizada no presente trabalho.

A partir da obtenção do LQ, a EE do CLN foi determinada. Uma das características mais importantes dos nanocarreadores é a quantidade de substância de interesse que foi encapsulada no núcleo lipídico, chamada de eficiência de encapsulação. Corresponde à porcentagem de substância de interesse incorporada na matriz lipídica do CLN em relação ao total de substância de interesse adicionada ao sistema (Yongjiu et al., 2018). A determinação da EE requer a separação das nanopartículas do meio de dispersão, o que pode ser realizado empregando diferentes técnicas, sendo a ultrafiltração em centrifuga uma delas (López-Cabeza et al., 2021).

O valor obtido para a EE do CBA<sup>®</sup> no nanocarreador foi de 98,68%. Durante a análise do ultrafiltrado (fração com o CBA<sup>®</sup> livre) por CG-EM não foi observado nenhum pico de constituinte terpênico característico do óleo, incluindo o marcador químico escolhido  $\beta$ -cariofileno (Figura 22). Então, para o cálculo do valor de EE final, levou-se em consideração a concentração total de óleo adicionado ao sistema para a obtenção do CLN e o limite de quantificação obtido para o método.

Figura 22 – Cromatograma obtido na análise de eficiência de encapsulação das nanopartículas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Valores de EE acima de 70% são considerados elevados para nanopartículas lipídicas (Battaglia; Gallarate, 2012). Assim, o valor obtido no presente estudo mostrou-se alto e satisfatório, podendo estar relacionado à incorporação de lipídeos líquidos que terminam por aumentar a amorfização do núcleo da nanopartícula e contribuir para uma maior encapsulação do óleo de interesse. Segundo Viegas e colaboradores (2023), as NLSs por possuírem apenas a fração referente ao lipídeo sólido terminam por apresentar uma eficiência de encapsulação do fármaco um pouco menor, fato atribuído à maior cristalização do núcleo da nanopartícula, o que as difere dos CLNs, como o desenvolvido no presente trabalho. Além disso, a manteiga de cupuaçu empregada apresenta composição com diferentes ácidos graxos, o que termina por gerar maiores imperfeições na rede cristalina devido ao

espaço gerado entre essas cadeias de ácidos graxos (Carvalho, 2016), aumentando a encapsulação do CBA®.

Em outros trabalhos realizados empregando os mesmos componentes para a obtenção de nanopartículas (Pluronic F-127 e manteiga de cupuaçu) valores altos de EE, em diferentes proporções, também foram obtidos. Junqueira e colaboradores (2022) obtiveram um valor de EE de  $99,75 \pm 0,03\%$  para um CLN contendo vitamina D<sub>3</sub>, Mockdeci e colaboradores (2022) atingiram uma EE de  $92,74 \pm 0,01\%$  para a encapsulação de *M. artemifolia* também em CLN e Soldati e colaboradores (2018) demonstraram uma EE de  $74,12 \pm 2,17\%$  em NLS, um valor um pouco menor que os anteriores, possivelmente devido à ausência da fração referente aos lipídeos líquidos na nanopartícula.

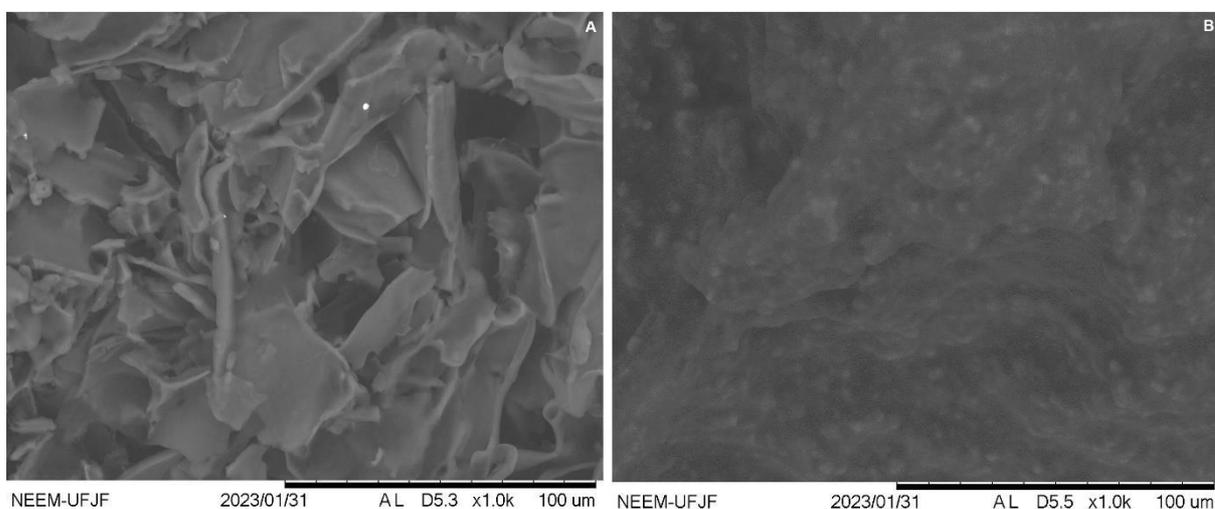
A utilização da técnica de ultrafiltração em centrífuga mostrou-se adequada para a finalidade pretendida. Essa técnica permite a separação entre os CLN e a água contida no sistema para a formação do meio de dispersão, de maneira que a fração livre (não encapsulada) do óleo permanece na fase aquosa. Segundo trabalho realizado por Yongjiu e colaboradores (2018), onde a eficiência de três diferentes técnicas para a determinação da EE (cromatografia de permeação em gel, centrifugação e ultrafiltração em centrífuga) foi avaliada, a ultrafiltração em centrífuga foi aquela que demonstrou a melhor eficiência de separação dos CLN da fração da substância ativa livre.

### 5.2.1.3 Determinação da morfologia do CLN por Microscopia Eletrônica

#### 5.2.1.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica permite a visualização direta de nanomateriais e a obtenção de informações sobre o formato, a estrutura interna e a superfície das partículas (Hallan et al., 2021). As imagens obtidas na análise de MEV são mostradas na Figura 23.

Figura 23 – Micrografias obtidas na análise de Microscopia Eletrônica de varredura das nanopartículas



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A: nanopartícula controle. B: nanopartícula com CBA<sup>®</sup>. Aumento de 1000x.

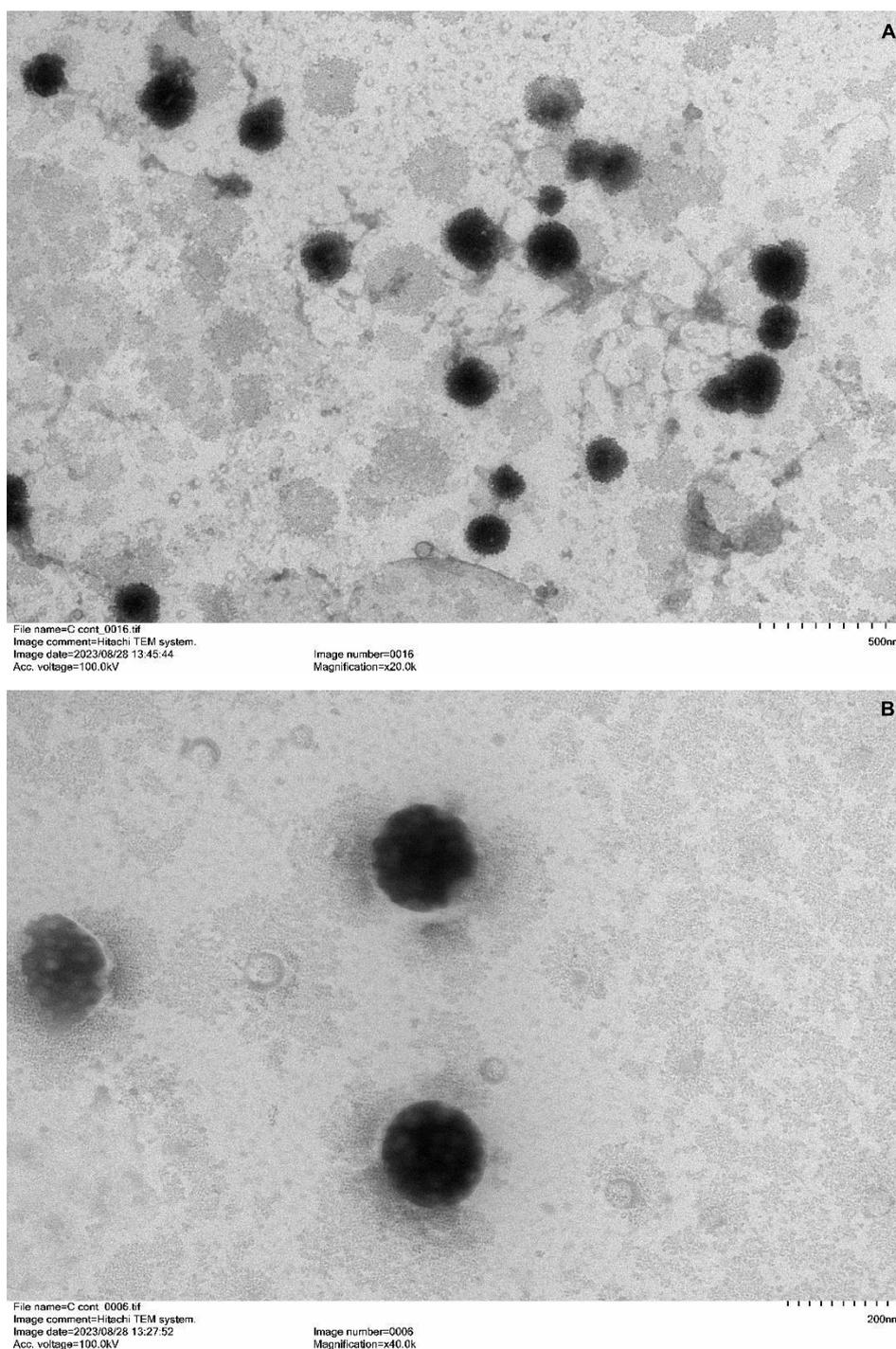
Conforme observado na Figura 23, é possível visualizar uma diferença evidente entre a nanopartícula controle (A) e a nanopartícula contendo o CBA<sup>®</sup> (B). Na imagem A observa-se uma superfície totalmente laminar, provavelmente devido à presença do tensoativo e lipídeo sólido apenas, que possuem características mais cristalinas. Por outro lado, na imagem B, nota-se a presença dos carreadores lipídicos nanoestruturados distribuídos ao longo de toda a extensão da imagem e com formato esférico.

Uma limitação da utilização da técnica de MEV para a caracterização morfológica de dispersões de nanopartículas em água é a necessidade de secagem por liofilização, o que pode levar à aglomeração com o surgimento de micropartículas no sistema, em especial quando um agente crioprotetor não é empregado no processo de liofilização (Makoni; Kasongo; Walker, 2019). Nesse sentido, uma análise complementar por MET com as nanopartículas contendo CBA<sup>®</sup> no seu sistema original (em dispersão) foi realizada, a fim de investigar melhor o formato das mesmas. Somado a isso, vale ressaltar que as imagens obtidas por MEV no presente estudo não se mostraram satisfatórias, devido à limitação do equipamento utilizado, o que reforçou a necessidade de complementação através da MET.

### 5.2.1.3.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As imagens resultantes da análise por MET são apresentadas na Figura 24.

Figura 24 – Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão para os carreadores lipídicos nanoestruturados



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A: Aumento de 20.000x (escala 500 nm). B: Aumento de 40.000x (escala 200 nm).

Conforme pode ser visualizado, em especial na imagem B da Figura 24 com ampliação de 40.000x (escala de 200 nm), os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo o CBA<sup>®</sup> possuem formato esférico bem evidenciado por MET. De maneira geral, o formato das nanopartículas lipídicas está relacionado à pureza do lipídeo utilizado, de modo que lipídeos quimicamente puros e homogêneos produzem partículas com formato cuboide, enquanto os lipídeos quimicamente polidispersos produzem partículas com formato esférico (Makoni; Kasongo; Walker, 2019). Sendo assim, a utilização da mistura da manteiga de cupuaçu (lipídeo sólido) com o CBA<sup>®</sup> (lipídeo líquido), ambos com composição fitoquímica diversa, pode explicar a obtenção do formato esférico para o CLN-OC.

Adicionalmente, a análise permitiu corroborar os resultados obtidos para o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas por DLS, conforme pode ser visualizado na imagem B da Figura 24, que demonstra uma partícula com diâmetro hidrodinâmico médio próximo a 200 nm.

### **5.2.2 Avaliação da estabilidade físico-química das nanopartículas**

Durante o armazenamento das nanopartículas em dispersão aquosa pode ocorrer a expulsão da substância ativa do núcleo e a tendência a agregação e gelificação (Andonova; Peneva, 2017), assim como a degradação química dos lipídeos, resultando também em agregação e degradação durante o armazenamento do material (Kinsey et al., 2021). Sendo assim, a avaliação da estabilidade do material é um requisito importante.

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade de curto prazo conduzido para CLN-OC e NL-C são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos no estudo de estabilidade físico-química das nanopartículas armazenadas em geladeira (4°C)

Tempo	Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	PI
Inicial	CLN-OC	217,8 ± 2,5	0,237 ± 0,010
	NL-C	101,5 ± 0,3	0,114 ± 0,006
15 dias	CLN-OC	213,3 ± 3,3	0,213 ± 0,009
	NL-C	107,2 ± 0,6	0,201 ± 0,035
30 dias	CLN-OC	209,5 ± 1,8	0,219 ± 0,009
	NL-C	109,5 ± 0,2	0,229 ± 0,008
60 dias	CLN-OC	213,0 ± 1,1	0,202 ± 0,004
	NL-C	100,7 ± 1,5	0,136 ± 0,018*
90 dias	CLN-OC	212,8 ± 3,1	0,208 ± 0,005
	NL-C	100,0 ± 1,0	0,142 ± 0,012
	CLN-OC p-valor	0,03*	0,02*
	NL-C p-valor	p<0,0001*	p<0,0001*

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

PI: *Polydispersity Index* (Índice de Polidispersão). CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA®. NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle.

Os valores são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). \*Diferença estatística significativa determinada por ANOVA um fator (p<0,05).

Conforme pode ser visualizado na Tabela 12, diferenças estatísticas significativas evidenciadas pela ANOVA um fator entre o tempo inicial e os demais tempos analisados foram encontradas tanto para o diâmetro hidrodinâmico médio quanto para o PI do CLN-OC e NL-C. Para a avaliação do parâmetro de diâmetro hidrodinâmico médio no CLN-OC, o pós-teste de Tukey, utilizado para realizar a avaliação de cada grupo e determinar quais médias são estatisticamente significativas, mostrou que o p-valor obtido na ANOVA (p-valor = 0,03) foi devido à média entre o grupo inicial e o grupo 30 dias, porém em 60 e 90 dias, os valores voltaram a não ser significantes, o que mostra que o resultado em 30 dias não impactou na análise final. Um comportamento semelhante foi obtido para a NL-C nesse mesmo parâmetro (p<0,0001), sendo que o pós-teste de Tukey evidenciou diferenças significativas entre o grupo inicial e os grupos 15 e 30 dias, porém essa diferença não ocorreu nos demais tempos de avaliação (60 e 90 dias) e, portanto, também não impactou no resultado final. Já em relação ao PI, o mesmo deve ser avaliado com critério, já que está relacionado ao grau de homogeneidade de distribuição das nanopartículas na amostra. Valores significativos pela ANOVA um fator foram encontrados tanto para CLN-OC quanto para a NL-C, mas é importante destacar que todos os resultados obtidos em todos os intervalos de tempo se encontram abaixo da referência adotada de 0,3 (Ahuja; Jena; Paidi, 2015) e, assim,

adequados ao estudo, corroborando a distribuição homogênea das nanopartículas em ambas as amostras de nanopartículas preparadas, com ausência de evidência de agregação através da análise do PI.

As dispersões também foram avaliadas quanto ao aspecto macroscópico e não foram encontradas alterações visíveis, com as mesmas mantendo o aspecto de preparo inicial durante os 90 dias de armazenamento.

Ball, Bajaj e Whitehead (2016) realizaram um estudo de estabilidade de longa duração (156 dias) de nanopartículas lipídicas com a finalidade de verificar o impacto do pH, temperatura e liofilização das dispersões. Através das análises, eles concluíram que a refrigeração (2°C) foi a melhor temperatura de armazenagem para o material, quando comparado ao freezer (-20°C) e à temperatura ambiente, sendo que as nanopartículas se mantiveram estáveis por 150 dias em refrigeração.

Mockdeci e colaboradores (2022) realizaram um estudo de estabilidade de nanopartículas lipídicas incorporadas com o óleo essencial de *M. artemifolia* mantidas sob refrigeração (4°C) e demonstraram, através dos parâmetros diâmetro hidrodinâmico médio e PI, que as nanopartículas se mantiveram estáveis por 120 dias, sem evidências de alteração do aspecto macroscópico das dispersões.

Todos esses resultados vêm ao encontro daqueles obtidos com o CLN-OC desenvolvido no presente trabalho, que se manteve estável pelo período de 90 dias avaliado, sendo a refrigeração (4°C) a temperatura de escolha para o armazenamento do material até a sua utilização, um parâmetro importante para a aplicabilidade satisfatória da dispersão do CLN-OC.

### **5.2.3 Determinação da densidade da dispersão aquosa dos CLNs**

O valor de densidade obtido para a dispersão dos CLNs desenvolvidos, empregando o método de densidade relativa com picnômetro de vidro foi  $0,996 \pm 0,002 \text{ g cm}^{-3}$  ou  $\text{g mL}^{-1}$ , portanto, bem próximo à densidade da água ( $1,000 \text{ g cm}^{-3}$  ou  $\text{g mL}^{-1}$ ), fato já esperado devido à grande proporção de água presente no sistema a fim de obter as nanopartículas.

### 5.2.4 Cálculo da proporção óleo/sistema nanoparticulado na condição ótima

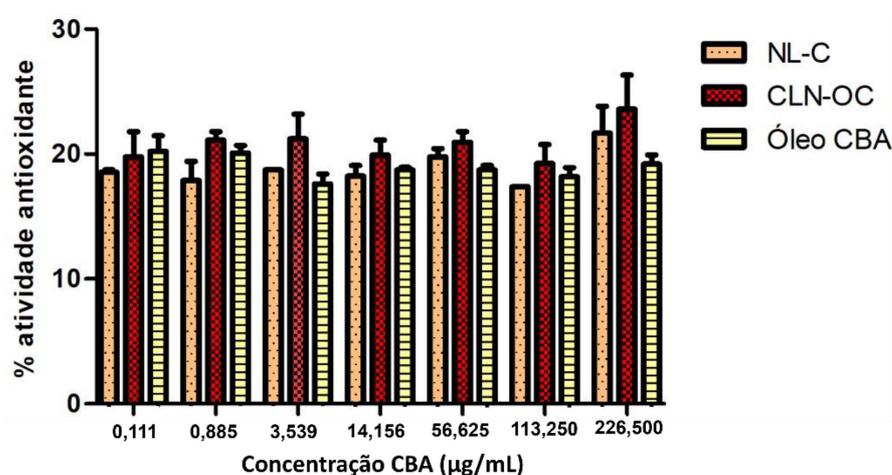
A proporção óleo/sistema nanoparticulado obtida foi de 4,48% (v/m). Dessa forma, essa proporção foi empregada nos cálculos de determinação de concentração das soluções de nanopartículas preparadas para os estudos *in vitro*, de maneira que pudessem ser expressos em termos de CBA<sup>®</sup>.

## 5.3 TRIAGEM DE AVALIAÇÕES *IN VITRO* DOS CLNs

### 5.3.1 Atividade antioxidante

No Gráfico 1 são apresentados os resultados da atividade antioxidante obtida para o CBA<sup>®</sup> in natura, CLN-OC e NL-C.

Gráfico 1 – Atividade antioxidante das nanopartículas e CBA<sup>®</sup>



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: Para efeito de apresentação gráfica, apenas 7 concentrações são representadas.

NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle. CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>. Os valores são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3).

É possível notar que não houve uma relação dose dependente no que se refere à porcentagem de atividade antioxidante, ou seja, o aumento da concentração não refletiu em aumento significativo da atividade antioxidante, uma vez que não foram observadas diferenças estatísticas significativas a 95% de confiança entre as

concentrações apresentadas no gráfico. Portanto, os valores de  $CI_{50}$  não foram calculados.

As faixas de atividade antioxidante obtidas para as amostras avaliadas foram: 17,9 a 21,7%, 19,2 a 23,6% e 17,6 a 20,1% para NL-C, CLN-OC e CBA<sup>®</sup>, respectivamente. É possível observar que o óleo *in natura* não possui uma atividade antioxidante elevada e que mesmo com a estratégia tecnológica de nanoencapsulação do mesmo em um CLN, sua atividade não aumentou de maneira estatisticamente significativa, embora através da avaliação do Gráfico 1, seja possível visualizar um aumento absoluto da atividade antioxidante do CLN-OC em relação ao óleo, em todas as concentrações, com exceção da primeira (0,111  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CBA<sup>®</sup>).

De maneira interessante, a faixa de porcentagem de atividade antioxidante obtida para a NL-C foi próxima ao óleo *in natura*, demonstrando que os componentes da nanopartícula controle, possivelmente oriundos da manteiga de cupuaçu, possuem uma atividade antioxidante independente dos componentes do óleo e muito próxima deste em termos absolutos. Uma hipótese para esse achado está relacionada à composição química rica em ácidos graxos da manteiga de cupuaçu, sendo o ácido oleico (ácido graxo insaturado) o seu componente principal (cerca de 41,8%) (Soldati, 2015). Consoante Rodriguez-Ruiz e colaboradores (2018), os lipídeos insaturados são altamente oxidados na presença de radicais livres.

Adicionalmente ao achado mencionado anteriormente, observa-se que a incorporação do CBA<sup>®</sup> ao núcleo lipídico do CLN aumenta a sua atividade antioxidante conforme pode ser visualizado em todas as concentrações apresentadas no gráfico, porém esse incremento não reflete em diferença estatística significativa com 95% de confiança. Esse aumento pode ser atribuído à composição química dos componentes do óleo somados aos constituintes da manteiga de cupuaçu. Os terpenos são conhecidos pela sua atividade antioxidante (Gutiérrez-Del-Río et al., 2021) e representam a fração majoritária do óleo em questão, com o  $\beta$ -cariofileno presente em cerca de 37%.

Soldati e colaboradores (2018) em experimento realizado de atividade antioxidante empregando a metodologia DPPH para avaliar NLSs com resveratrol, obtiveram o mesmo padrão de atividade antioxidante para a nanopartícula controle, que foi preparada com os mesmos constituintes utilizados no presente trabalho.

Todavia, para a NLS com resveratrol, o aumento da atividade antioxidante foi significativo tanto em relação à NLS controle quanto ao resveratrol isolado. Outros estudos demonstraram o aumento da atividade antioxidante de compostos naturalmente conhecidos como potentes antioxidantes (carotenoides e polifenóis) quando nanoencapsulados, comprovando que a estratégia de nanotecnologia aumenta a capacidade antioxidante quando as substâncias isoladas já possuem uma ação antioxidante elevada (Izza et al., 2022; Rodriguez-Ruiz et al., 2018).

Assim, os resultados demonstraram que o CLN-OC desenvolvido não possui ação antioxidante potente (faixa de 19,2 a 23,6%) que foi atribuída à própria atividade antioxidante baixa do óleo *in natura*. Entretanto, embora não elevada, é uma atividade biológica adicional que pode ser atribuída a fórmulas cosméticas para aplicação tópica desenvolvidas com o CLN-OC, somando propriedades importantes ao produto.

### 5.3.2 Toxicidade aguda

Os valores de DL<sub>50</sub> obtidos para as amostras avaliadas com seus respectivos intervalos de confiança a 95% são apresentados na Tabela 13. Os controles negativos do ensaio, que foram a água marinha artificial, a mistura tween 80/DMSO (1:1, v/v) e NL-C não ocasionaram a morte do microcrustáceo (letalidade de 0%) e, portanto, não impactaram nos resultados obtidos.

Tabela 13 – Resultados obtidos no ensaio de toxicidade aguda

Amostra	DL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CBA <sup>®</sup> )	Intervalo de confiança a 95% ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
CLN-OC	370,00	350,11-389,88
Óleo <i>in natura</i>	140,54	123,88-157,21
Timol	21,37	8,49-34,25

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup>®</sup>

DL<sub>50</sub>: Dose Letal 50%.

Na literatura são encontradas classificações variadas do grau de toxicidade para o ensaio de *A. salina*. No presente trabalho foi adotada a classificação do trabalho de Rajabi e colaboradores (2015), que foi desenvolvida para o estudo de toxicidade de 16 nanopartículas diferentes (incluindo as lipídicas) com o modelo *A.*

*salina*. Segundo esses autores, uma amostra é altamente tóxica quando apresenta valores de  $DL_{50}$  menores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , moderadamente tóxica para valores de 100 a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  e com baixa toxicidade ou não tóxica para valores de  $DL_{50}$  de 500 a  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Baseado na classificação definida anteriormente, pode-se dizer, a partir dos resultados obtidos, que tanto o CBA<sup>®</sup> quanto a amostra CLN-OC apresentaram toxicidade moderada, embora o valor obtido para a  $DL_{50}$  da amostra CLN-OC seja cerca de 2,2 vezes maior que aquele obtido para o óleo *in natura* ( $DL_{50}$  de 310,00 e  $140,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), evidenciando que a nanoencapsulação do óleo reduziu a sua toxicidade frente ao microcrustáceo. O controle positivo timol, independente da classificação, possui alta toxicidade para *A. salina*.

No contexto de utilização crescente da nanotecnologia para diferentes aplicações, a nanoecotoxicologia explora o impacto das nanopartículas nos organismos e seu ecossistema (Shokry et al., 2021), tornando-se um nicho importante de estudo. Por se tratar de um invertebrado naturalmente encontrado em águas salinas, o experimento com *A. salina* é descrito como um bioensaio modelo para a avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas, tais como as de prata e de óxido de zinco (An et al., 2019; Demarchi et al., 2020; Lish et al., 2019; Sarkheil et al., 2018). Nesse âmbito, nota-se que a nanoencapsulação do CBA<sup>®</sup> diminui a toxicidade aguda desse material sobre o microcrustáceo e, por sua vez, contribui para um impacto menor no ecossistema aquático, considerando o descarte de resíduos desse material em água. Além disso, chama a atenção para o cuidado no descarte do óleo *in natura*, que vem sendo usado de maneira crescente no mercado de cosméticos para o desenvolvimento de diversos produtos e apresentou um valor de  $DL_{50}$  menor que aquele obtido para o CLN-OC.

Além da predição do impacto no ecossistema aquático, o bioensaio de letalidade com *A. salina* é considerado um teste preliminar na triagem de possíveis atividades biológicas de compostos, tais como antibacteriana, antifúngica, (Niño et al., 2006), tripanossomicida (Zani et al., 1995) e destaque para a antitumoral (Arcanjo et al., 2012; El-Menshawi et al., 2010; McLaughlin; Chang; Smith, 1993). Diante disso, os resultados obtidos indicam uma possível atividade biológica do óleo *in natura* e do CLN-OC, já que ambos apresentaram grau de toxicidade moderado frente à *A. salina*. Consoante Martins e colaboradores (2019), substâncias que

demonstram toxicidade no referido ensaio possuem um alto potencial de apresentar atividade biológica.

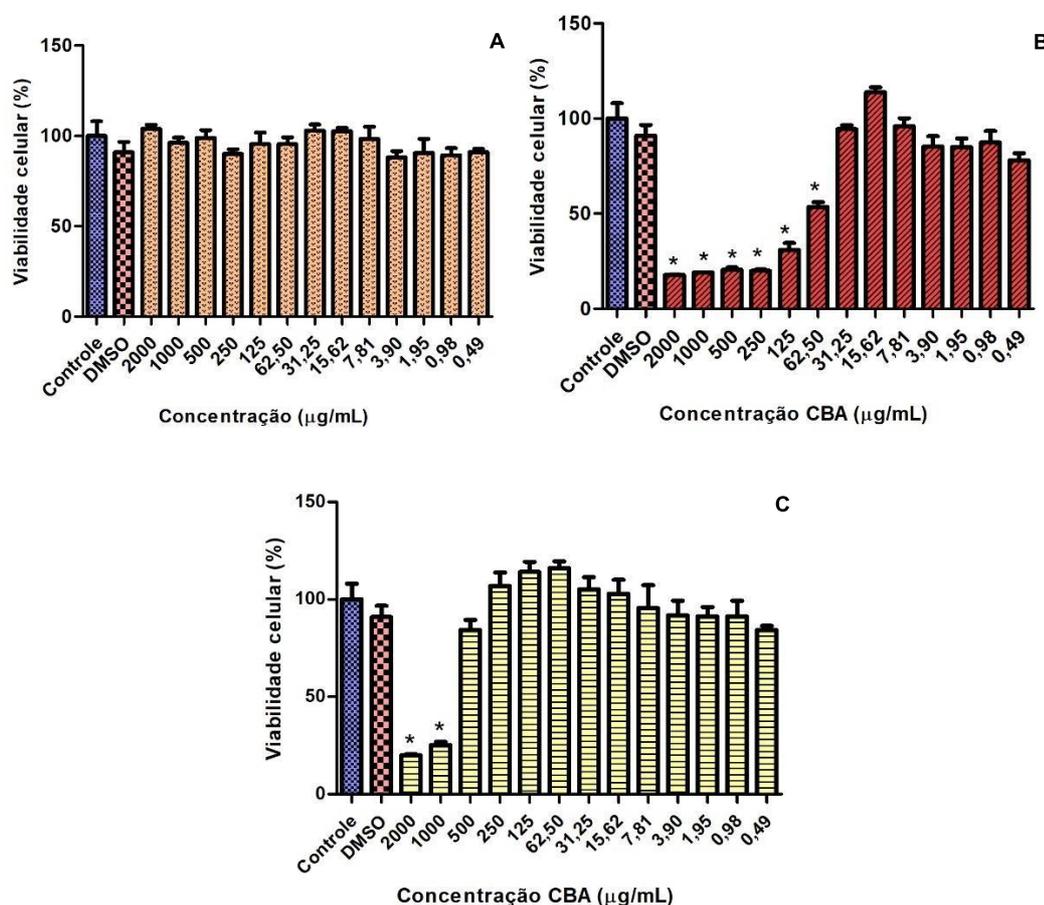
De maneira interessante, Rajabi e colaboradores (2015) realizaram um estudo correlacionando os resultados do ensaio de toxicidade aguda com *A. salina* e aqueles provenientes do ensaio de citotoxicidade em cultura de células (linhagem celular L929) empregando a metodologia do MTT. Esses autores demonstraram que os resultados entre ambos são comparáveis ao analisar 16 nanopartículas diferentes. Uma limitação apresentada por esse estudo foram os intervalos de confiança amplos obtidos para os valores de concentração em torno dos resultados médios da  $DL_{50}$  e  $CI_{50}$  dos dois ensaios que, segundo os autores, poderia ser melhorado através da realização de um número maior de experimentos independentes.

Ademais, é importante reforçar que além de acessível e de fácil execução, trata-se de um bioensaio que não utiliza nenhuma matéria-prima de origem animal, como o soro fetal bovino que é empregado na suplementação dos meios de cultura nos ensaios com cultura celular, o que vai ao encontro da política dos 4 Rs sobre a utilização de animais. Por sua vez, fornece diferentes informações sobre os achados em um único experimento, tais como a toxicidade aguda, a predição de atividades biológicas e a ecotoxicidade, reforçando ainda mais a utilização desse modelo nos estudos de triagem *in vitro* de atividades biológicas e toxicidade de diferentes nanomateriais, moléculas isoladas e demais amostras.

### **5.3.3 Viabilidade celular**

Os resultados de citotoxicidade em linhagem celular de fibroblastos murinos (L929) estão expressos no Gráfico 2.

Gráfico 2 – Resultados da análise de viabilidade celular em linhagem L929 de fibroblastos murinos



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A: nanopartícula lipídica controle. B: carreador lipídico nanoestruturado contendo CBA®. C: óleo CBA®.

DMSO: dimetilsulfóxido.

A toxicidade dos nanomateriais pode ocorrer em três níveis incluindo citotoxicidade, genotoxicidade e epigenicidade. As nanopartículas lipídicas (NLSs e CLNs) são conhecidas pela boa tolerância no organismo devido à sua composição lipídica e a produção livre de solventes. Contudo, o tipo de lipídeo e surfactante utilizados, assim como a carga superficial, são fatores importantes que podem influenciar na toxicidade desse nanomaterial (Azarnehad et al., 2020).

No presente estudo, optou-se por utilizar a linhagem celular L929, por ser uma linhagem celular imortalizada, que se divide rapidamente e atinge densidade celular elevada em cultura, além de ser amplamente descrita na literatura para estudos de viabilidade celular de nanomateriais (Bahadori et al., 2018; Li et al., 2021;

Rekha; Anila, 2019; Składanowski et al., 2016). Somado a isso, os fibroblastos são células presentes na pele humana, sendo, portanto, uma linhagem celular apropriada para a avaliação de citotoxicidade de nanopartículas que serão aplicadas topicamente.

Através da análise do Gráfico 2 A é possível observar que a nanopartícula controle não se mostrou citotóxica para a linhagem celular L929, sendo evidente que a viabilidade celular se manteve próxima a 100% com ausência de diferença estatística significativa a 95% de confiança para todas as concentrações avaliadas do NL-C. Isso demonstra que a escolha de uma manteiga natural (manteiga de cupuaçu) e do tensoativo não iônico (Pluronic F-127) foi adequada para a obtenção das nanopartículas, uma vez que não induziram citotoxicidade.

Em estudos de desenvolvimento de nanopartículas lipídicas com os mesmos materiais escolhidos no presente trabalho (manteiga de cupuaçu e Pluronic F-127), o comportamento referido anteriormente também foi observado para as nanopartículas controle (sem a substância de interesse), que não induziram citotoxicidade na linhagem celular L929 (Junqueira et al., 2022; Mockdeci et al., 2022), corroborando os resultados encontrados na pesquisa em questão.

Por outro lado, a análise dos Gráficos 2 B e 2 C demonstra que o CBA<sup>®</sup> *in natura* e o CLN-OC induziram citotoxicidade de maneira dose dependente. O óleo foi citotóxico nas concentrações de 1.000 e 2.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (viabilidade celular de 25,23 e 19,97%) com diferença estatística significativa em relação ao controle celular, bem como o CLN-OC induziu citotoxicidade nas concentrações de 62,5 a 2.000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de CBA<sup>®</sup> (viabilidade celular de 53,59 a 17,82%), também com diferença estatística em relação ao controle celular. Além disso, esses resultados estão de acordo com a ISO 10993-5 (2009), que considera um tratamento citotóxico quando a viabilidade celular é reduzida em mais de 30%. Portanto, é possível inferir que a nanopartícula contendo o CBA<sup>®</sup> encapsulado foi mais citotóxica para a linhagem celular L929 que o óleo *in natura*, achado que pode ser explicado pela maior possibilidade de endocitose celular das nanopartículas pelos fibroblastos com consequente liberação do óleo no interior das células levando à morte celular. De acordo com Azarnehad e colaboradores (2020), que realizaram uma extensa revisão de literatura sobre o perfil toxicológico de nanopartículas lipídicas, o principal mecanismo pelo qual nanocarreadores carregados atingem o interior celular é através de endocitose e não por atravessar as membranas celulares.

Adicionalmente, as  $Cl_{50}$  foram calculadas e corroboram os resultados apresentados anteriormente, uma vez que foram obtidos valores menores para o CLN-OC ( $Cl_{50}$  de  $132,02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) quando comparado ao óleo *in natura* ( $Cl_{50}$  de  $1123,40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por se tratar de um trabalho que avaliou a citotoxicidade do CBA® de maneira inédita, não foram encontrados registros na literatura dos valores de  $Cl_{50}$  para esse óleo, inviabilizando comparações com condições de ensaio adotadas em outros trabalhos.

Diante dos achados encontrados no presente estudo, vale ressaltar que, apesar da citotoxicidade observada para o óleo *in natura* e o CLN-OC, a mesma ocorreu de maneira dose dependente, que é um comportamento esperado para o ensaio de viabilidade celular *in vitro*, quando a amostra testada apresenta citotoxicidade. É importante reforçar que existem no mercado produtos cosméticos comerciais que possuem o óleo na sua composição e vêm sendo utilizados sem relatos conhecidos de dano à pele, como *balm* facial e produtos para o cabelo (shampoo, condicionador, máscara, tônico e óleo reparador).

No que tange à nanopartícula com o óleo encapsulado em específico, alvo da presente pesquisa para o desenvolvimento de fórmulas cosméticas, o aumento na citotoxicidade evidenciado pelo valor de  $Cl_{50}$  é esperado, pensando na diminuição do tamanho de partícula que aumenta a interação com as células, porém não inviabiliza a utilização desse sistema como insumo em preparações cosméticas. É necessário levar em consideração alguns aspectos importantes na avaliação dos resultados de citotoxicidade *in vitro*: (i) a translocação dos resultados para uma condição *in vivo*, que é bem mais complexa em termos de composição do tecido como um todo, (ii) parâmetros farmacocinéticos das nanopartículas no tecido, como por exemplo, o mecanismo de liberação do óleo nanoencapsulado e a dose efetiva do mesmo que atinge cada camada da pele e cada tipo celular e (iii) a utilização de um modelo de cultura de células 2D com uma monocamada celular, que não reflete a complexidade estrutural, bioquímica e fisiológica da pele como um todo.

Segundo Langhans (2018), os ensaios *in vitro* empregando células são essenciais no processo de triagem de novas substâncias e uma alternativa aos ensaios com animais, em conformidade com a política dos 4 Rs. Entretanto, não necessariamente refletem o complexo microambiente celular encontrado em um tecido, sendo a maior limitação da cultura de células 2D a ausência de mimetismo da interconexão entre as células e os componentes da matriz extracelular, como as

proteínas, glicosaminoglicanas, proteoglicanas e fatores de crescimento. Tais moléculas atuam nos processos de proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência e sinalização celular, além da organização do citoesqueleto, podendo influenciar na resposta das células às substâncias testadas. De acordo com esse autor, o modelo de cultura de células 3D aparece como uma alternativa a essas limitações e mimetiza melhor as condições do tecido *in vivo*, fornecendo resultados mais próximos aos obtidos *in vivo* quando ocorre a translocação do estudo.

Vale destacar ainda a importância da realização de investigações futuras em outras linhagens celulares, como os queratinócitos, que são as principais células constituintes da epiderme, originando-se na camada basal. Eles produzem queratinas e lipídios, que estão envolvidos na função barreira da epiderme (Hofmann et al., 2023).

Por fim, os resultados obtidos no bioensaio frente à *A. salina* e no ensaio de viabilidade celular em linhagem de fibroblastos murinos L929, trazem evidências relacionadas à toxicidade aguda do óleo CBA® na forma *in natura* e nanoencapsulada. Tanto o óleo quanto o nanocarreador apresentaram toxicidade moderada frente ao microcrustáceo e foram citotóxicos para a linhagem celular L929 de maneira dose dependente. Tais informações são importantes no estudo de desenvolvimento de cosméticos, dentro do conceito de predição de toxicidade dos insumos, empregando modelos alternativos ao animal.

#### 5.4 DESENVOLVIMENTO DAS FORMULAÇÕES COSMÉTICAS

No início do planejamento de desenvolvimento das fórmulas e pensando nos cuidados com a pele negra, o foco foi dado para a hidratação. Nesse sentido e baseando-se nas características descritas na literatura para esse tipo de pele, foi investigado qual atributo seria buscado nos produtos. Então, foi escolhido o restabelecimento da função barreira do estrato córneo por meio de cosméticos que não deixassem um residual oleoso, uma vez que a pele negra tende a ter uma maior TEWL e maior oleosidade.

No mercado de cosméticos atual, diversas preparações com a mistura de óleos vegetais CBA® estão disponíveis, porém nenhuma delas com esse insumo nanoencapsulado, o que destaca o caráter inovador das formulações desenvolvidas

no presente estudo. A estratégia de trabalhar com Nanotecnologia advém da baixa solubilidade desse óleo em água, inviabilizando o desenvolvimento das formulações de interesse, fato que foi solucionado com a incorporação do óleo nos nanocarreadores. Ademais, é esperado que a nanoencapsulação reflita em aumento da estabilidade do CBA<sup>®</sup>, por se tratar de um óleo vegetal e, portanto, passível de sofrer oxidação.

Somado ao exposto anteriormente, a utilização de óleos vegetais nanoencapsulados permite o desenvolvimento de fórmulas que promovam a hidratação da pele com toque seco devido à base aquosa, sem a utilização de grandes concentrações dos óleos vegetais para atingir tal finalidade. Isso porque a Nanotecnologia promove um aumento do efeito desejado utilizando uma concentração menor do material de interesse.

De maneira complementar, o tipo de nanopartícula escolhida para o desenvolvimento das fórmulas também contribui para um efeito esperado de hidratação, devido à composição lipídica, ressaltando a utilização de duas fontes de lipídeos naturais: a manteiga de cupuaçu e o CBA<sup>®</sup>. De acordo com Fleck e Mackenzie (2012), a manteiga de cupuaçu é um excelente emoliente que restaura a elasticidade da pele enquanto fornece propriedades antioxidantes e hidratantes. Por sua vez, os CLNs são conhecidos por aumentarem a hidratação através da formação de um filme oclusivo na epiderme diminuindo a TEWL (Chauhan et al., 2020).

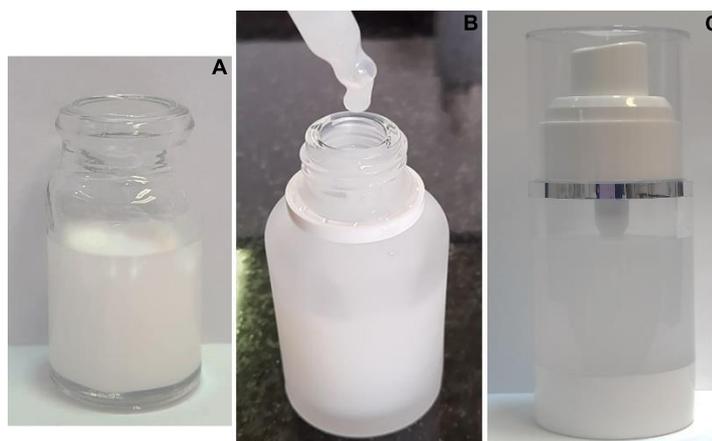
Vale salientar que os óleos vegetais escolhidos como insumos ativos para o desenvolvimento das formulações são conhecidos pelas suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas (Campanholi et al., 2022; Purohit et al., 2021; Símaro et al., 2020) e antioxidantes (Malik et al., 2023; Oliveira et al., 2016). Tais propriedades somam atributos aos cosméticos obtidos, já que a pele negra possui uma tendência acnéica. As atividades antimicrobiana e anti-inflamatória do óleo resina de copaíba são atribuídas aos sesquiterpenos e diterpenos (Leandro et al., 2012). Para o óleo da semente de maracujá são relatadas atividade antioxidante e antimicrobiana relacionadas ao ácido linoleico e flavonoides (Kawakami et al., 2021). Adicionalmente, não foram encontrados relatos de ação comedogênica para tais insumos. É importante destacar também que a utilização dos óleos vegetais na forma nanoencapsulada potencializa a sua ação oclusiva sem deixar um residual

oleoso na pele, o que poderia acarretar uma maior obstrução dos poros, favorecendo o aparecimento da acne.

#### 5.4.1 Desenvolvimento da bruma e sérum faciais

Duas formas farmacêuticas cosméticas para aplicação facial com base aquosa e incorporadas com o CLN-OC foram obtidas (Figura 25). Conforme pode ser visualizado na Figura 26, ambas apresentaram aspecto macroscópico homogêneo, sem evidências de precipitação ou separação de fases.

Figura 25 – Dispersão do carreador lipídico nanoestruturado e formulações cosméticas desenvolvidas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A: Dispersão do carreador lipídico nanoestruturado. B: sérum facial com nanocarreador. C: bruma facial com nanocarreador.

Figura 26 – Demonstração da homogeneidade das formulações preparadas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

As características organolépticas, assim como o pH, foram avaliados e os resultados estão expressos na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados obtidos para as formulações cosméticas desenvolvidas

Parâmetro	Sérum	Bruma
Aspecto	Viscoso	Líquido
Cor	Branco opaco	Branco opaco
Odor	Inodor	Inodor
pH	5,25	4,52

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Mediante a análise dos dados da Tabela 14 é possível verificar as características de cada fórmula, assim como os valores de pH compatível com o pH da pele (4,0 a 6,0) (Proksch, 2018). O sérum é uma forma farmacêutica que deve possuir uma certa viscosidade, pois não possui como característica o aspecto líquido. Já a bruma, cuja finalidade é a aplicação através de um jato de *spray*, deve ser líquida. Ambas as fórmulas adquiriram a cor branco opaco possivelmente devido à incorporação da dispersão do CLN-OC, que possui a mesma cor (Figura 25 A).

Optou-se por não trabalhar com fragrâncias nessas preparações, com o intuito de desenvolver fórmulas minimalistas, seguindo a tendência do *clean beauty*. Ambos os produtos possuem um total de 5 constituintes na sua fórmula, já incluindo o veículo (água destilada). Além do mais, a escolha das matérias-primas baseou-se no conceito de fórmula vegana, de modo que nenhuma delas possui origem animal.

Um sistema conservante diferente daqueles comumente adotados (parabenos) foi empregado, também seguindo uma tendência de produtos livre de parabenos. O Optiphen® é um conservante líquido apresentado como fenoxietanol em uma base emoliente de caprililglicol. Pode ser utilizado em uma extensa faixa de pH e em diferentes preparações, tais como sistemas anidros, formulações aquosas e emulsões (Fagron, 2023). Gonçalves (2024) avaliou a eficácia desse sistema conservante em formulações labiais contendo CBA® apresentadas como esfoliante labial, *lip balm* e *gloss* labial, que foram estudadas do ponto de vista microbiológico quanto a presença de coliformes fecais e orais (*Escherichia coli*), *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além da contagem de microrganismos mesófilos totais aeróbios. De acordo com os resultados obtidos, essa autora demonstrou a ausência de patógenos e amostras dentro do limite aceitável para a contagem de mesófilos totais.

No que se tange à linha de cosméticos desenvolvidos, o sérum foi escolhido como formulação principal para a hidratação devido a busca por esse tipo de forma farmacêutica no mercado de cosméticos atual (Udapurkar; Sanap, 2023), sendo conhecido como um concentrado de ativos para tratamento (Budiasih et al., 2018). Consoante Vakhariya e colaboradores (2022) trata-se de uma formulação com resposta e efeitos mais rápidos sobre a pele, promovendo intensa nutrição em camadas profundas, sendo reconhecida pelo sensorial não pegajoso. Essa última característica vai ao encontro dos atributos buscados nos cosméticos do presente estudo, justificando também a escolha dessa forma farmacêutica para a hidratação da pele negra, que tende a ser mais oleosa.

A bruma facial foi proposta no intuito de preparar a pele para a aplicação do sérum, por meio do borrifamento no rosto previamente limpo e seco, podendo ser utilizada para a remoção do excesso de óleo. É uma preparação farmacêutica de fácil aplicação e pode promover uma sensação de refrescância. Por ter álcool na sua composição, seca rapidamente sobre a pele. Além disso, a utilização da mistura dos óleos de copaíba e maracujá (CBA<sup>®</sup>) soma atributos canabinoides-*like* à formulação, como a diminuição da irritabilidade da pele. Essa propriedade não foi analisada no presente trabalho, mas pode ser alvo de investigações futuras.

#### **5.4.2 Desenvolvimento do creme facial**

O terceiro e último produto da linha de cosméticos foi um creme facial contendo os nanocarreadores CLN-OC. Essa forma farmacêutica foi a mais desafiadora em termos de desenvolvimento farmacotécnico, sendo que diferentes planejamentos de formulação foram realizados. De forma resumida, os testes foram iniciados com uma emulsão do tipo óleo/água (O/A) empregando o emulsionante emulium<sup>®</sup> dolcea. Alguns rearranjos dessa fórmula foram realizados, porém o produto obtido apresentava separação de fase (camada oleosa visível a olho nu). Então, optou-se por alterar o tipo de agente emulsionante para emulium<sup>®</sup> illustro, apropriado para a obtenção de emulsão do tipo água/óleo (A/O). Novamente, alguns desenhos de fórmula foram realizados até a obtenção da formulação apresentada no presente estudo.

Uma emulsão pode ser definida como um sistema bifásico consistindo em dois líquidos imiscíveis, onde um deles (fase dispersa) é uniformemente dispersa como glóbulos pela segunda fase (fase contínua). Por se tratar de um sistema termodinamicamente instável, um agente emulsionante é empregado para a estabilização do sistema (Khan et al., 2011).

Os emulsionantes são geralmente moléculas anfifílicas (presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos), tais como fosfolipídeos, proteínas e polissacarídeos (McClements; Jafari, 2018). Nas emulsões O/A, eles são dissolvidos na fase aquosa (embora não seja regra geral) e as fases aquosa e oleosa são misturadas em agitadores de alto cisalhamento, o que leva à formação de uma emulsão grosseira. Essa emulsão inicial contém gotículas grandes (geralmente maior que 1  $\mu\text{m}$ ) que são revestidas pelo emulsionante, sendo que as moléculas restantes dele ficam dispersas na fase aquosa. Nos agitadores (métodos de energia alta), ocorre então a ação de forças disruptivas (cavitação, turbulência e cisalhamento) que quebram as gotículas maiores em menores, resultando na formação da emulsão final (McClements; Gumus, 2016).

O agente emulsionante escolhido para a obtenção do creme facial com o CLN-OC foi o emulium® illustro. É um emulsionante natural líquido a levemente viscoso, não iônico, para emulsões A/O criado principalmente para formulações pigmentadas e aprovado pela COSMOS. A nomenclatura internacional (do inglês *International Nomenclature Cosmetic Ingredient*) para esse insumo é *Polyglyceryl-6 Polyhydroxystearate (and) Polyglyceryl-6 Polyricinoleate*. Ele pode ser utilizado na faixa de concentração de 3 a 5% com a fase aquosa na proporção de 30 a 70% em um processo de fabricação da emulsão a frio. Para uma melhor estabilização da formulação obtida com esse emulsionante, eletrólitos podem ser adicionados na fase aquosa. Além disso, possui elevada compatibilidade com os óleos de silicone e os óleos vegetais e sensorial fluído, leve e suave (Gattefossé, 2019). As emulsões A/O são aquelas onde a água é dispersa como glóbulos na fase contínua oleosa. São conhecidas pela sua propriedade de hidratação da pele através do mecanismo de formação de filme oclusivo no estrato córneo, embora geralmente possuam uma textura pegajosa, o que diminui a sua aceitabilidade cosmética (Khan et al., 2011).

A escolha do emulium® illustro foi direcionada pela sua compatibilidade com formulações pigmentadas, a principal característica do creme facial desenvolvido,

além da propriedade sensorial agradável, conferindo residual não pegajoso para a formulação obtida.

Como emolientes foram escolhidos: DUB<sup>®</sup> ININ, TACC e silicone Belsil<sup>®</sup> EG 6000. Os emolientes possuem natureza lipofílica e oferecem uma variedade de atributos sensoriais quando aplicados na pele, podendo influenciar na aceitabilidade do cosmético. Eles atuam reduzindo a TEWL e mantendo a hidratação da pele. Em emulsões O/A são geralmente utilizados entre 5-30%, podendo ser empregado em maiores concentrações em emulsões A/O (Fabbron-Appas et al., 2021). Os ésteres são os principais componentes dessa classe, apresentando diferentes estruturas químicas que impactam nas características reológicas e de performance sensorial das formulações, sendo que os emolientes compreendem ainda os hidrocarbonetos, os álcoois graxos e os derivados de silicone (Chao et al., 2018).

O DUB<sup>®</sup> ININ (INCI *Isononyl Isononanoate*) é um éster emoliente modificador de sensorial de cadeia curta. Ele possui toque não oleoso e não pegajoso e atua aumentando a espalhabilidade da formulação (Alianza, 2023). Os triglicerídeos do ácido cáprico e caprílico é um emoliente constituído de ésteres dos ácidos caprílico e cáprico encontrados naturalmente nos óleos de palma e de coco (Sethi et al., 2016). Já o silicone Belsil<sup>®</sup> EG 6000 é um emoliente derivado de silicone. Os derivados de silicone lineares são amplamente utilizados em cosméticos devido à redução da pegajosidade gerando uma sensação de pele não oleosa e suave (Chao et al., 2018). No caso do silicone Belsil<sup>®</sup> EG 6000, além da propriedade emoliente, auxilia no espessamento e incorporação de pigmentos.

A manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) foi utilizada como agente de consistência na emulsão desenvolvida. Optou-se por trabalhar com essa manteiga por ser o mesmo insumo natural utilizado na obtenção das nanopartículas lipídicas. Ademais, a manteiga de cupuaçu, outro insumo proveniente da biodiversidade brasileira, possui atributos suavizantes e hidratantes (Orduz-Díaz et al., 2024).

Como reestruturante foi empregada a cera Megh<sup>®</sup>Care Sew 200, que é composta por uma mistura de ésteres de alto peso molecular de origem vegetal, sendo considerada substituta à cera de abelha. Além disso, possui similaridade de composição e balanceamento químico com a cera de abelha natural (Focus Química, 2023). Portanto, uma vez que é uma matéria-prima de origem não animal, ela foi escolhida no intuito de manter o atributo vegano para o creme facial.

A emulsão A/O obtida apresentou característica macroscópica homogênea e ausência de separação de fase. É importante salientar que a utilização do agitador do tipo Ultra turrax permitiu a formação adequada da emulsão. Foi possível incorporar os nanocarreadores sem a ocorrência de incompatibilidades. Na Figura 27 é apresentada a formulação cosmética obtida previamente à incorporação dos pigmentos. O valor de pH encontrado para essa preparação foi igual a 6,0.

Figura 27 – Creme facial (emulsão A/O) desenvolvido com os nanocarreadores



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

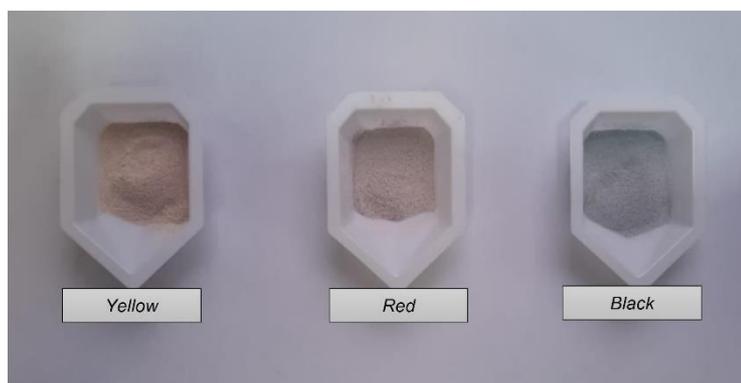
Os pigmentos utilizados se apresentaram na forma microencapsulada (nomeadas como Deepercaps<sup>®</sup> e desenvolvidos pela Tagra Biotechnologies). As Deepercaps<sup>®</sup> são microcápsulas de dupla camada polimérica compostas de óxido de zinco e um polímero à base de celulose. Possuem propriedades anfifílicas, podendo ser empregada em diversos tipos de produtos numa faixa extensa de pH (2,0 a 12,0) (Focus Química, 2022)

As microcápsulas foram adequadamente incorporadas na emulsão, fato que foi atribuído à utilização de agitador mecânico com aparato apropriado, o que permitiu uma homogeneização sem rompimento delas.

No âmbito de desenvolvimento de cosméticos para a pele negra, um ponto que foi levado em consideração é a questão da busca por formulações que tenham uma cobertura da pele sem deixar resíduos brancos e aspecto acizentado. Nesse sentido, as Deepercaps<sup>®</sup> aparecem como uma proposta interessante para esse público-alvo. Durante o atrito de aplicação na pele, os pigmentos microencapsulados se rompem, gerando um efeito lúdico, onde a cor aparece durante a aplicação. As microesferas são disponibilizadas em três cores distintas que podem ser mescladas

de maneiras diferentes, a fim de obter graus de tonalidade variados. São elas: Deepercaps® *yellow* (óxido de ferro amarelo), *red* (óxido de ferro vermelho) e *black* (óxido de ferro preto) (Figura 28).

Figura 28 – Microcápsulas Deepercaps® com pigmentos para a pele negra



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Após a incorporação dos pigmentos, a emulsão adquiriu coloração diferenciada, porém sem rompimento das microcápsulas. Através da análise da Figura 29 é possível notar a tonalidade gerada quando o creme é friccionado contra a folha de papel, simulando o rompimento das microcápsulas com consequente liberação dos pigmentos na pele.

Figura 29 – Aspecto final do creme facial desenvolvido



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

O pH obtido para a formulação final foi o mesmo (6,0), indicando que as Deepercaps® não ocasionam impacto no pH do creme desenvolvido.

Quanto às características organolépticas foi possível notar um creme de coloração levemente arroxeadada, odor característico da fragrância empregada e aspecto viscoso. No caso específico do creme, uma fragrância foi adicionada com o intuito de atribuir atração sensorial para o produto, já que ele também apresentou uma coloração diferenciada das demais fórmulas desenvolvidas (bruma e sérum).

Pensando na proposição de cosméticos minimalistas, dentre os produtos desenvolvidos, o creme foi aquele que utilizou o maior número de ingredientes. Alguns desenhos de formulação com menor número de constituintes foram testados, porém sem sucesso na fabricação da emulsão. Entretanto, vale ressaltar a maior complexidade farmacotécnica para a produção desse tipo de forma farmacêutica, quando comparada à bruma e ao sérum.

Assim, diante do exposto, três formas farmacêuticas distintas foram desenvolvidas: bruma, sérum e creme. Elas são propostas como cosméticos veganos para pele negra através de atributos que podem contribuir para o cuidado facial, considerando as peculiaridades descritas para esse tipo de pele. Esses atributos são: a remoção do excesso de oleosidade (bruma), hidratação por formação de filme oclusivo (sérum) e cobertura homogênea da pele sem residual branco ou acizentado (creme). É necessário reforçar a necessidade de estudos futuros que avaliem a emulsão desenvolvida no presente trabalho quanto a estabilidade e controle de qualidade físico-químico.

### **5.4.3 Estabilidade físico-química das formulações bruma e sérum**

#### *5.4.3.1 Avaliação da estabilidade preliminar*

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade preliminar das fórmulas são apresentados nas Tabelas 15 e 16.

Tabela 15 – Valores de pH antes e após o teste de centrifugação na estabilidade preliminar

pH	Sérum	p-valor	Bruma	p-valor
Inicial	5,40 ± 0,04	0,0701	4,82 ± 0,11	0,0603
Final	5,52 ± 0,06		5,10 ± 0,15	

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Os resultados são expressos como média ± DP.

Tabela 16 – Valores de pH antes e após o teste de estresse térmico na estabilidade preliminar

pH	Sérum	p-valor	Bruma	p-valor
Inicial	5,44 ± 0,04	NA	4,92 ± 0,04	NA
Final (40°C)	5,53 ± 0,04	0,0617	5,01 ± 0,05	0,0585
Final (50°C)	5,51 ± 0,07	0,2318	5,07 ± 0,10	0,0789

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

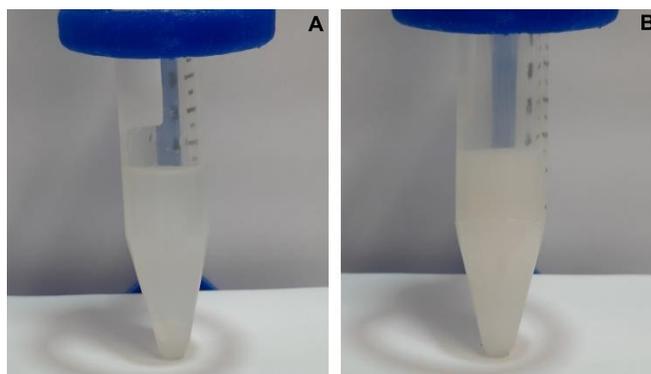
Os resultados são expressos como média ± DP.

Nota: NA (Não se aplica).

Através da análise das tabelas é possível inferir que não houve diferença estatística significativa a 95% de confiança para as médias de pH obtidas antes e após o procedimento de centrifugação e aquecimento (40 e 50°C). Segundo Torres e colaboradores (2019), a faixa de valores de pH em uma formulação é indicativo de estabilidade, uma vez que grandes variações podem indicar a presença de impurezas, hidrólise e/ou decomposição dos constituintes, reforçando a importância da avaliação desse parâmetro.

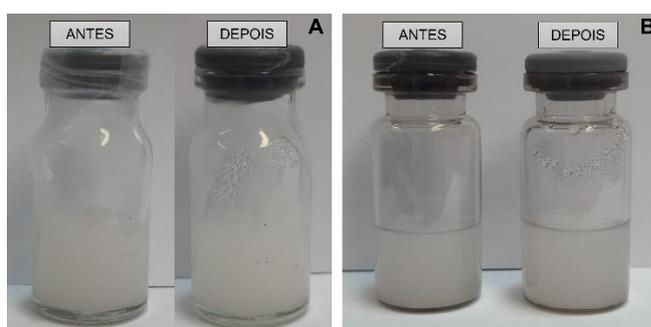
Somado à análise do pH, não foram observadas alterações organolépticas, bem como não ocorreram separações de fases ou precipitações visíveis nas condições de estresse avaliadas (Figuras 30 e 31). Assim, as fórmulas mostraram-se estáveis aos procedimentos realizados visando acelerar possíveis alterações físico-químicas, atendendo um requisito importante na etapa de desenvolvimento de produtos.

Figura 30 – Formulações após o teste de centrifugação na estabilidade preliminar



Fonte: Elaborado pela autora (2024).  
A: bruma facial. B: sérum facial.  
Nota: apenas 1 réplica é apresentada.

Figura 31 – Formulações após o teste de estresse térmico na estabilidade preliminar

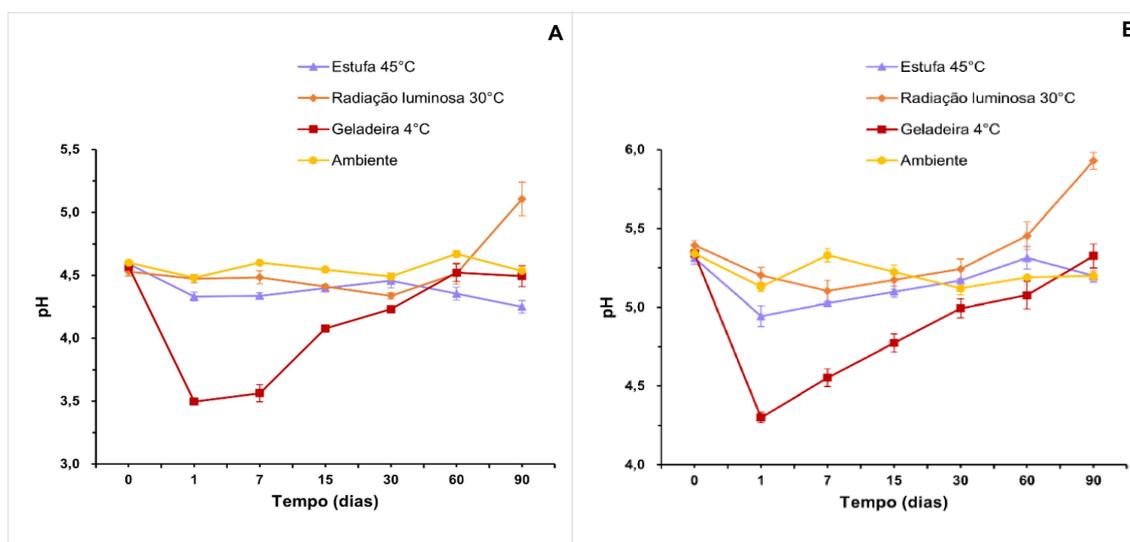


Fonte: Elaborado pela autora (2024).  
A: sérum facial. B: bruma facial.  
Nota: apenas 1 réplica é apresentada.

#### 5.4.3.2 Avaliação da estabilidade acelerada

Nos Gráficos 3 A e 3 B são demonstrados os resultados para os valores de pH ao longo de 90 dias do estudo de estabilidade acelerada para as formulações bruma e sérum.

Gráfico 3 – Valores de pH para o estudo de estabilidade acelerada



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

A: bruma. B: sêrum.

Consoante Udapurkar e Sanap (2023), o monitoramento do pH ao longo do período do estudo de estabilidade é de suma importância, uma vez que a pele humana possui características ácidas que estão relacionadas à sua microbiota residente, sendo que alterações no pH implicam em condições como acne, descamação, secreção excessiva de sebo, entre outras. É possível observar através da análise dos Gráficos 3 A e 3 B que variações no pH foram observadas, porém todas dentro da faixa de aplicação que é compatível com a pele (4,0 a 6,0) (Proksch, 2018), com exceção do tempo de 24 horas e 7 dias para as amostras de bruma deixadas em geladeira, que apresentaram uma queda no valor de pH abaixo de 4,0. Contudo, esse valor voltou a aumentar a partir do tempo de 15 dias e se manteve dentro da faixa desejada até os 90 dias finais de avaliação. De acordo com Blaak, Wohlfart e Shurer (2011), a utilização de uma emulsão O/A com pH igual a 3,5 não acarretou prejuízos para a pele. Pelo contrário, nesse estudo, os autores demonstraram que o *skin care* com formulações de pH 3,5 a 4,0 forneceu benefícios para a pele de idosos, melhorando a barreira epidérmica e a hidratação.

Ainda para a avaliação do pH, não foram observadas alterações referentes ao aumento ou diminuição de uma unidade de pH, com exceção do tempo de 24 horas para a bruma facial, onde o pH caiu de  $4,60 \pm 0,01$  para  $3,50 \pm 0,03$ . Contudo, conforme abordado anteriormente, esse comportamento não foi observado ao longo

de todo o período do estudo de estabilidade. Para todos os outros tempos de avaliação da bruma e todos os tempos de análise do sêrum não foram observadas variações de uma unidade de pH. Trata-se de um achado importante, pois consoante preconizado pela farmacopeia americana *United States Pharmacopeia* (USP) (USP, 2007), a mudança de pH de uma unidade apenas pode diminuir a estabilidade de um fármaco em solução. É esperado que, para a análise pontual de 24 horas da bruma, alterações significativas não tenham ocorrido no produto, já que o pH se manteve na faixa estabelecida ao longo do restante do estudo e não houve alterações organolépticas.

No que tange às propriedades organolépticas, não foram observadas alterações no odor e aspecto, sendo que nos Quadros 3 e 4 são apresentados os dados resultantes da avaliação da cor dos produtos ao longo dos 90 dias de monitoramento.

Quadro 3 – Resultados obtidos para a análise do parâmetro organoléptico cor no estudo de estabilidade acelerada para a bruma

Tempo (dias)	Estufa			Radiação luminosa			Geladeira		
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	IM*	N	LA*	N	N	N

Fonte: Elaborado pela autora (2024).

N: normal. LA: levemente alterado\*. IM: intensamente modificado\*.

Quadro 4 – Resultados obtidos para a análise do parâmetro organoléptico cor no estudo de estabilidade acelerada para o sêrum

Tempo (dias)	Estufa			Radiação luminosa			Geladeira		
	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
0	N	N	N	N	N	N	N	N	N
1	N	N	N	N	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N	N	N	N	N
30	N	N	N	N	N	N	N	N	N
60	N	N	N	N	N	N	N	N	N
90	N	N	N	IM*	IM*	LA*	N	N	N

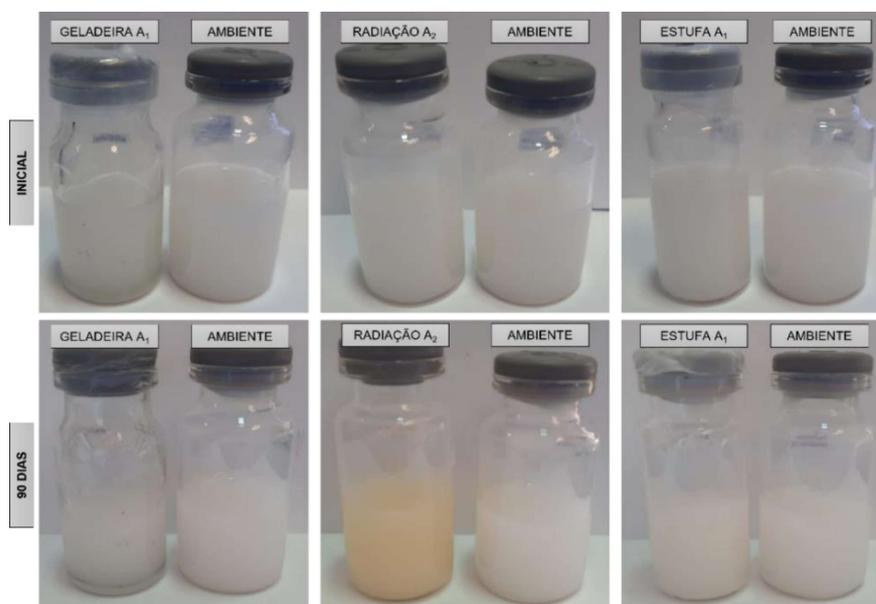
Fonte: Elaborado pela autora (2024).

N: normal. LA: levemente alterado\*. IM: intensamente modificado\*.

É possível inferir que a única condição que forneceu alterações significativas para as fórmulas avaliadas no parâmetro cor foi a exposição à radiação luminosa (temperatura de  $30 \pm 2^\circ\text{C}$ ), que originou uma mudança da coloração para tom amarelado em ambas as fórmulas ao final do estudo (tempo de 90 dias), com uma variação de cor entre a triplicata das amostras. Ressalta-se que até o tempo de 60 dias, as amostras mantiveram-se estáveis, ou seja, sem alterações na cor. Além disso, mediante a análise dos Gráficos 3 A e 3 B, é possível notar aumento nos valores de pH para o último tempo de avaliação de ambas as fórmulas, o que possivelmente pode estar relacionado às alterações de cor dos produtos. Entretanto, apesar do aumento observado, ambos se mantiveram na faixa de pH compatível com a aplicação tópica.

As Figuras 32 e 33 complementam as informações dos Quadros 3 e 4, onde as imagens obtidas ao início e final do estudo de estabilidade são apresentadas, utilizando as amostras armazenadas em temperatura ambiente e ao abrigo da luz solar como padrões de comparação.

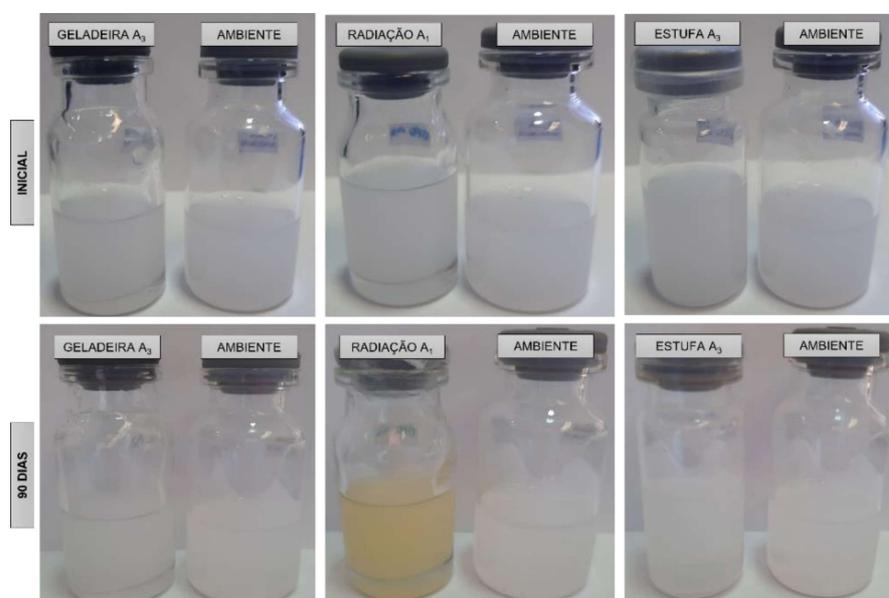
Figura 32 – Formulação sérum no início e 90 dias após o estudo de estabilidade acelerada



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: apenas 1 réplica é apresentada para cada condição.

Figura 33 – Formulação bruma no início e 90 dias após o estudo de estabilidade acelerada



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Nota: apenas 1 réplica é apresentada para cada condição.

Uma hipótese estabelecida para a alteração de cor das formulações na condição de exposição à radiação seria a oxidação (foto-oxidação) e a cisão (fotólise) de ligações covalentes presentes nos componentes das formulações, quando expostos à radiação UV (principalmente entre 290 e 320 nm), sendo mais deletéria que a luz visível (luz fluorescente), conforme abordado por Ferreira e Brandão (2011). Isso vai ao encontro dos achados no estudo de estabilidade, onde as amostras na câmara de fotoestabilidade foram expostas não somente à luz visível, mas também à radiação UV, enquanto as amostras mantidas em temperatura ambiente sob contato de luz visível apenas, não sofreram qualquer tipo de alteração ao longo dos 90 dias.

Uma outra hipótese para a alteração observada na cor seria uma possível perda de estabilidade do próprio CLN-OC quando exposto à condição de radiação. Nesse sentido, é importante destacar a necessidade de estudos na área de estabilidade de nanopartículas incorporadas em formulações, já que metodologias para tal finalidade ainda são incipientes, em função da complexidade para analisar sistemas nanoparticulados nos produtos finais.

Por fim, reforça-se a necessidade de armazenamento de ambas as formulações em frascos de vidro âmbar e sob o abrigo da luz solar, consoante

abordado pelo Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA (Brasil, 2004). Adicionalmente, os resultados obtidos reforçam a relevância da realização dos estudos de estabilidade para conhecimento do comportamento dos produtos nas diversas condições as quais os mesmos podem ser submetidos durante o seu período de armazenamento.

#### 5.4.4 Controle de qualidade físico-químico das formulações bruma e sérum

Os resultados obtidos para as análises de controle de qualidade das formulações bruma e sérum são expressos na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados para a análise de controle de qualidade das formulações

Parâmetro	Sérum	Bruma
Aspecto	Viscoso	Líquido
Cor	Branco opaco	Branco opaco
Odor	Inodor	Inodor
pH	5,38 ± 0,05	4,67 ± 0,06
Densidade (g cm <sup>-3</sup> )	1,005 ± 0,000	0,985 ± 0,000
Viscosidade (mPa s <sup>-1</sup> )	29810	NA

Fonte: Elaborado pela autora (2024).  
mPa: miliPascal. NA: Não se Aplica.

A determinação dos caracteres organolépticos, pH, densidade e viscosidade são muito úteis na caracterização de um produto acabado desenvolvido. Através da análise da Tabela 17, é possível verificar que o pH de ambas as formulações se encontra adequado para a aplicação tópica (4,0 a 6,0) (Proksch, 2018), assim como as características organolépticas estão de acordo com aquelas obtidas para o primeiro lote produzido na etapa inicial de desenvolvimento e estabilidade preliminar (Tabela 14). Portanto, o segundo lote corroborou os resultados encontrados para o primeiro.

A presença de ar no produto pode interferir na estabilidade do mesmo, alterando propriedades como cor e odor, com consequente impacto no prazo de validade da formulação (Silva et al., 2019). Os resultados de densidade encontrados para ambas as formulações (próximo de 1,00 g cm<sup>-3</sup>) evidenciam a ausência de incorporação de ar no processo de manipulação das fórmulas, sendo um requisito

importante de qualidade dos produtos. De acordo com Silva e colaboradores (2019) valores de densidade entre 0,95 e 1,05 g cm<sup>-3</sup> são adequados.

No que concerne ao parâmetro viscosidade, o valor encontrado para o sêrum facial contribuiu na caracterização da formulação desenvolvida no presente estudo. Conforme abordado por Tort e Karakucuk (2021), a viscosidade é um parâmetro crítico de otimização para formulações tópicas durante a etapa de desenvolvimento, pois uma baixa viscosidade implica em um tempo de ação curto na pele, enquanto uma alta viscosidade pode gerar um sensorial indesejável na pele.

Outro ponto importante é que as formulações do tipo sêrum tendem a possuir um comportamento pseudoplástico (não newtoniano) nos estudos de reologia, ou seja, ocorre uma diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento (Amnuait; Khakhong; Khongkow, 2019). De acordo Budiasih e colaboradores (2018), esse é um comportamento encontrado na maioria dos produtos cosméticos, como emulsões, shampoos e suspensões. Ainda segundo esses autores, a viscosidade é uma medida do atrito interno do fluido, que é a resistência ao fluxo quando uma camada de fluido é forçada a se mover sobre a outra, sendo dependente do tamanho, forma e concentração das partículas suspensas e como elas interagem com a fase contínua (água).

O sêrum desenvolvido apresentou um bom comportamento de fluxo com textura lisa e viscosidade adequada (29810 mPa s<sup>-1</sup>). Não foi encontrado na literatura e nos guias da ANVISA um valor referência de viscosidade para esse tipo de forma farmacêutica, com uma variedade de resultados descritos (BuddhiwanHiwale; Pawar, 2023; Budiasih et al., 2018; Santos et al., 2021; Sasidharan; Joseph; Junise, 2014; Surini; Mubarak; Ramadon, 2018). Dessa forma, é importante destacar que a viscosidade é um parâmetro característico de cada produto desenvolvido e, consoante trabalho de Tort e Karakucuk (2021), tem uma relação importante com o tipo de polímero utilizado para o ajuste da viscosidade, assim como a sua concentração e massa molecular.

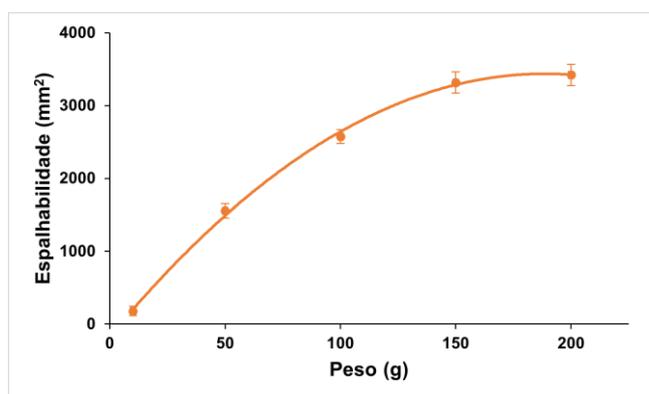
Dentro desse contexto, o resultado obtido para a viscosidade demonstra que a concentração otimizada de 1,3% para o agente gelificante escolhido (Icigel®) conferiu uma viscosidade adequada para a formulação. Trata-se de uma mistura de lecitina com o polímero acrilato de sódio, com as propriedades texturizantes e espessantes do polímero acrescidas de propriedades emulsionantes provenientes da lecitina. Ademais, trata-se de uma matéria-prima com propriedades

multifuncionais, caracterizadas por um sensorial satisfatório (toque suave, não pegajoso) e atributos de hidratação através da formação de filme oclusivo na pele reduzindo a TEWL (Biotec, 2020).

#### 5.4.5 Testes de *performance in vitro* da formulação sérum facial

No Gráfico 4, é apresentado o perfil de espalhabilidade da formulação desenvolvida. Conforme Santos e colaboradores (2021), a espalhabilidade está relacionada à capacidade de uma formulação de se espalhar, quando submetida a uma determinada força de aplicação na pele e está relacionada com a viscosidade. Trata-se de uma característica essencial de formas farmacêuticas tópicas, pois está relacionada com a área de aplicação no local de ação.

Gráfico 4 – Perfil de espalhabilidade *in vitro* do sérum em modelo de placa lisa



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

Mediante a análise do gráfico observa-se que a formulação apresentou aumento de espalhabilidade diretamente proporcional ao aumento da massa aplicada, o que é um comportamento esperado *in vivo*, onde quanto maior a força de aplicação no local desejado, maior a área de abrangência esperada para o produto. Somado a isso, é possível verificar que, para os últimos dois pesos aplicados, a mesma já apresentou um comportamento tendendo a uma espalhabilidade constante, ou seja, atingiu o máximo de área de abrangência pela metodologia *in vitro* de placa lisa empregada.

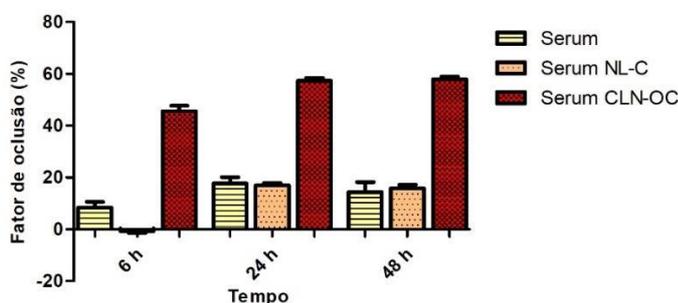
O perfil de espalhabilidade obtido para a formulação desenvolvida vai ao encontro das características esperadas para esse tipo de forma farmacêutica, já que

o consumidor espera que o s erum possua uma consist encia não muito fluida, mas que permita a formação de uma película fina sobre a pele que seja rapidamente absorvida. Consoante Romero (2017), esse tipo de comportamento está ligado com a reologia das formulações, onde a espalhabilidade está relacionada   viscosidade, mas também   força e velocidade de cisalhamento.

Por fim, os achados desse teste *in vitro* evidenciam a boa espalhabilidade da fórmula desenvolvida, já que foi possível atingir uma área extensa ( $3420,245 \pm 146,541 \text{ mm}^2$ ) mesmo para uma pequena quantidade de produto aplicada (0,15g do s erum), o que sugere a obtenção de uma área de aplicação maior na pele com uma força de aplicação pequena utilizando uma baixa quantidade de produto, características satisfatórias para produtos de uso t pico.

Quanto ao ensaio de oclusividade *in vitro*, os resultados obtidos para o mesmo são descritos no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Comparação dos fatores de oclusão obtidos para as amostras avaliadas



Fonte: Elaborado pela autora (2024).

NL-C: Nanopartícula Lipídica Controle. CLN-OC: Carreador Lipídico Nanoestruturado contendo CBA<sup> </sup>.

Por intermédio da análise do Gráfico 5   possível verificar que a formulação contendo os CLNs-OC apresentou um fator de oclusão *in vitro* máximo de  $58,00 \pm 1,64\%$  em 48 horas, com um aumento expressivo entre 6 e 24 horas (de  $45,58 \pm 3,72$  para  $57,41 \pm 1,81$ ), seguido por manutenção do comportamento entre 24 e 48 horas. Ainda através da análise do gráfico, pode-se notar que os componentes da formulação possuem certa ação de oclusividade, possivelmente devido   presença do aditivo reológico (Iecigel<sup> </sup>), que pode formar uma fina película durante a sua aplicação na superfície do papel filtro. Todavia, esse fator de oclusão foi

significativamente menor quando comparado àquele obtido para o s rum com os CLNs-OC ao final de 48 horas ( $p = 0,0008$ ).

Além do mais, a análise do gráfico permite inferir que o fator de oclusão obtido para o s rum contendo os CLNs-OC ao longo do ensaio foi significativamente maior que aquele obtido para o s rum com as nanop rticulas controle (NLS-C) ( $p = 0,0001$  em 48 horas), o que sugere que a incorpora o do CBA<sup>®</sup> ao sistema foi o fator responsável pelo incremento obtido na oclusividade. Ademais, com 6 horas de ensaio para o s rum com as NLS-C dificilmente   possível observar um fator de oclusão através da avalia o do gráfico, possivelmente porque o filme oclusivo ainda não havia se formado. Quanto   compara o entre o s rum com as NLS-C e aquele apenas com os excipientes, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ao final de 48 horas ( $p = 0,7563$ ).

Pensando na aplica o t pica de nanop rticulas lipídicas, um interesse que tem sido dado a elas   a sua capacidade oclusiva (Montenegro et al., 2017). Em estudo realizado por Wissing e Muller (2002), que avaliaram o impacto do grau de cristalinidade da matriz lipídica nas suas propriedades oclusivas, foram obtidas formula es com fatores de oclusão variando entre 10 e 45%, aproximadamente, ao longo de 48 horas de ensaio. Outro estudo, conduzido pelo mesmo núcleo de pesquisadores (Wissing; Lippacher; Muller, 2001), investigou além do grau de cristalinidade, o tamanho de partícula e a concentra o de lipídeo nas NLSs. De maneira geral, através de ambos os trabalhos, esses autores demonstraram que o fator de oclusão aumenta com o aumento do grau de cristalinidade da matriz lipídica e da concentra o de lipídeo sólido e com a diminui o do tamanho de partícula, sendo que os melhores resultados foram obtidos para nanop rticulas com diâmetro hidrodinâmico médio de 200 nm. Ainda de acordo com eles, os principais meios de se obter efeito oclusivo através de formula es cosméticas   com a utiliza o de óleos vegetais (propriedade hidrofóbica) ou nanop rticulas (capacidade de forma o de filme na superfície da pele).

No presente trabalho, a análise dos resultados sugere que a presença da fra o de lipídeo líquido ou a composi o desta (uma mistura de óleos vegetais) foi o fator que exerceu maior influência sobre a obten o de um fator de oclusão maior. Isso porque   esperado que a NL-C tenha um grau de cristalinidade maior (pela ausência da fra o lipídica líquida) e apresenta um diâmetro hidrodinâmico médio menor ( $101,5 \pm 0,3$  nm), determinado por DLS. Contudo, um estudo realizado por

Hamishehkar e colaboradores (2015), avaliando propriedades oclusivas *in vitro* e *in vivo* de NLSs não encontrou uma relação entre o tamanho de partícula e os efeitos oclusivos *in vivo*. Somado a isso, uma hipótese para o menor efeito oclusivo da NL-C apesar da cristalinidade maior esperada é o menor conteúdo lipídico como um todo, já que apresenta apenas a manteiga de cupuaçu na composição.

Vale destacar que não foram realizados estudos de caracterização do estado cristalino da NL-C e do CLN-OC, tais como Difração de Raio X e Calorimetria Exploratória Diferencial, sendo uma lacuna do presente trabalho e possível alvo de investigações futuras. Tais estudos fornecem informações importantes sobre a estrutura cristalina e o grau de cristalinidade de nanopartículas e podem contribuir na interpretação dos resultados do teste de oclusividade.

Somado aos achados anteriores, Montenegro e colaboradores (2017) demonstraram que a presença do lipídeo líquido ocasiona um aumento significativo no fator de oclusão ao comparar apenas o veículo de uma formulação do tipo gel (F cerca de 15%) com esse veículo incorporado com nanoemulsões (F cerca de 20%) e CLNs (F cerca de 40%), embora o maior fator de oclusão dessa pesquisa tenha sido para o gel incorporado com NLSs (F em torno de 60%). Além do mais, esses autores obtiveram uma correlação linear entre os fatores de oclusão *in vitro* e hidratação da pele *in vivo*, sugerindo que a investigação *in vitro* pelo método da oclusividade pode gerar boas previsões do efeito de hidratação da pele *in vivo*.

Loo e colaboradores (2013) encontraram uma correlação entre o aumento da hidratação da pele e a concentração do conteúdo lipídico de CLNs com tamanho de partícula similar, resultados que vão ao encontro dos achados relatados na presente pesquisa, onde o aumento da fração lipídica no CLN-OC (CBA<sup>®</sup> além da manteiga de cupuaçu) resultou em aumento significativo do fator de oclusão da formulação desenvolvida. Esses mesmos autores também demonstraram um fator de oclusão diretamente proporcional ao conteúdo do lipídeo sólido, ou seja, quanto maior a relação lipídeo sólido/lipídeo líquido nos CLNs, maior o fator de oclusão, resultados que vão ao encontro do trabalho de Wissing e Muller (2002).

Outro estudo conduzido por Joukhadar e colaboradores (2024), avaliou a propriedade oclusiva *in vitro* de CLNs incorporados em formulação de hidrogel e obteve um valor próximo a 60% com 6 horas de experimento. Eles demonstraram que antes de 6 horas não houve diferença estatística significativa entre a formulação branco (hidrogel sem os CLNs) e a formulação com os nanocarreadores,

possivelmente pela presença do ácido hialurônico na composição do hidrogel que contribuiu na retenção da água, mesmo sem a presença dos CLNs. Então, após 6 horas, foi observado a secagem da formulação e o efeito oclusivo foi atribuído à monocamada formada pelos CLNs na superfície da membrana.

Portanto, os resultados obtidos *in vitro* sugerem um efeito de hidratação da formulação sérum devido à presença dos carreadores lipídicos nanoestruturados contendo CBA<sup>®</sup>, possivelmente através do mecanismo de formação de filme oclusivo sobre a pele, evitando a TEWL, com consequente restauração da função barreira. Além disso, foi possível obter essa propriedade hidratante com uma formulação com sensorial agradável (toque seco, não pegajoso, sem efeito oleoso), característica atribuída à presença do óleo nanoencapsulado nos CLNs. Por fim, todas essas propriedades atendem aos requisitos exigidos para o cuidado da pele negra, que tende a possuir uma maior TEWL e maior oleosidade.

Adicionalmente, é importante destacar que além da propriedade hidratante atribuída aos CLNs-OC, os estudos *in vitro* conduzidos no presente trabalho sugerem propriedade adicional antioxidante através dos resultados obtidos no ensaio com o radical livre DPPH. Esse achado soma atributos aos CLNs-OC desenvolvidos e incorporados em três formas farmacêuticas diferentes, ao mesmo tempo que vão ao encontro das tendências mercadológicas de busca por insumo naturais com propriedades multifuncionais.

## 6 CONCLUSÃO

O CBA<sup>®</sup> apresentou composição fitoquímica diversa e rica em sesquiterpenos na análise de caracterização empregando CG-EM. Foi possível obter um carreador lipídico nanoestruturado de caráter inovador contendo o referido insumo com características físico-químicas adequadas para aplicação em formulações tópicas, elevada eficiência de encapsulação, morfologia esférica e estabilidade em geladeira (4°C) por 90 dias.

Uma triagem de avaliações *in vitro* foi realizada tanto para o CBA<sup>®</sup> *in natura* quanto para o CLN-OC empregando métodos alternativos ao modelo animal e evidenciaram atividade antioxidante baixa para a nanopartícula desenvolvida, porém presente e toxicidade aguda moderada no ensaio com *A. salina*. Ademais, o CLN-OC demonstrou diminuição da viabilidade celular de fibroblastos murinos L929 de maneira dose-dependente.

Nanocosméticos veganos com a proposta de cuidado facial da pele negra e apresentados como bruma, sérum e creme foram obtidos. Apesar do desafio em obter formulações utilizando um pequeno número de ingredientes e baseadas em óleos vegetais, a bruma e o sérum foram capazes de se manterem estáveis por 90 dias em condição de abrigo da luz solar. Além disso, ambos atenderam aos requisitos de controle de qualidade físico-químico exigidos pela legislação sanitária brasileira vigente.

O creme facial apresenta atributos interessantes no cuidado da pele negra, uma vez que foi desenvolvido empregando pigmentos microencapsulados que são liberados durante o atrito de aplicação na pele e não deixam resíduos brancos e fundo acizentado nesse tipo de pele. Entretanto, estudos futuros que possam realizar o controle de qualidade e a estabilidade físico-química do creme, assim como avaliar a sua *performance in vitro*, se mostram necessários.

O sérum facial apresentou *performance in vitro* satisfatória, sendo possível comprovar a hipótese de hidratação mediada pelos CLNs-OC. Dessa forma, sugere-se que seja capaz de restabelecer *in vivo* a função barreira do estrato córneo da pele negra por meio da redução da TEWL, atributo importante para um cosmético destinado para esse tipo de pele, que tende a possuir maior TEWL.

Por fim, o presente trabalho traz achados importantes, por se tratar do primeiro relato de nanocosméticos veganos com a mistura dos óleos vegetais de copaíba e maracujá encapsulados em CLNs.

## REFERÊNCIAS

- ABDO, J.M.; SOPKO, N.A.; MILNER, S.M. The applied anatomy of human skin: a model for regeneration. **Wound Medicine**, v. 28, p. 1-10, 2020.
- ABDULKARIM, S.M.; LONG, K.; LAI, O.M.; MUHAMMAD, S.K.S.; GHAZALI, H.M. Frying quality and stability of high-oleic *Moringa oleifera* seed oil in comparison with other vegetable oils. **Food Chemistry**, v. 105, n. 4, p. 1382-1389, 2007.
- ÁCIDO LINOLEICO. *In*: PUBMED COMPOUND. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280450>. Acesso em: 27 jul. 2023.
- AGRAWAL, Y.K.; PATEL, V.R. Nanosuspension: an approach to enhance solubility of drugs. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research**, v. 2, n. 2, p. 81-87, 2011.
- AHMAD, J. Lipid nanoparticles based cosmetics with potential application in alleviating skin disorders. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, p. 84-96, 2021.
- AHUJA, B.K.; JENA, S.K.; PAIDI, S.K.; BAGRI, S.; SURESH, S. Formulation, optimization and *in vitro–in vivo* evaluation of febuxostat nanosuspension. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 478, n. 2, p. 540-552, 2015.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; ELEZGARAI, I.; RICO, I.; ZARANDONA, I.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Targeting the endocannabinoid system: future therapeutic strategies. **Drug Discovery Today**, v. 22, p. 105-110, 2017.
- ALCHORNE, M.M.A.; ABREU, M.A.M.M. Dermatologia na pele negra. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 1, p. 7-20, 2008.
- ALIANZA. **DUB® ININ**, p. 1-2, 2023.
- AMNUAIKIT, T.; KHAKHONG, S.; KHONGKOW, P. Formulation development and facial skin evaluation of serum containing jellose from tamarind seeds. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 31, n.4, p. 1-14, 2019.
- AN, H.J.; SARKHEIL, M.; PARK, H.S.; YU, I.J.; JOHARI, S.A. Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 218, n., p. 62-69, 2019.
- ANDONOVA, V.; PENEVA, P. Characterization methods for solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 43, p. 6630-6642, 2017.
- ANNUAL REPORT. 52<sup>nd</sup> analysis of the cosmetics industry and consumption in Italy in 2019. *In*: COSMETIC ITALIA. Disponível em: [https://www.cosmeticaitalia.it/export/sites/default/centro-studi/beauty-report/interno\\_completo\\_stamp.pdf](https://www.cosmeticaitalia.it/export/sites/default/centro-studi/beauty-report/interno_completo_stamp.pdf). Acesso em 19 set. 2023.

ARCANJO, D.D.R.; ALBUQUERQUE, A.C.M.; MELO-NETO, B.; SANTANA, L.C.L.R.; MEDEIROS, M.G.F.; CITÓ, A.M.G.L. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 505-509, 2012.

ATALAY, S.; JAROCKA-KARPOWICZ, I.; SKRZYDLEWSKA, E. Antioxidative and anti-inflammatory properties of Cannabidiol. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 21-40, 2019.

AZARNEZHAD, A.; SAMADIAN, H.; JAYMAND, M.; SOBHANI, M.; AHMADI, A. Toxicological profile of lipid-based nanostructures: are they considered as completely safe nanocarriers? **Critical Reviews in Toxicology**, v. 50, n. 2, p. 148-176, 2020.

AZIZ, Z. A.A.; MOHD-NASIR, H.; AHMAD, A.; SETAPAR, S.H.M.; PENG, W.L.; CHUO, S.C.; KHATOON, A.; UMAR, K.; YAQOOB, A.A.; IBRAHIM, M.N.M. Role of Nanotechnology for design and development of cosmeceutical: application in makeup and skin care. **Frontiers in Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 327-345, 2019.

BABY, A.R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C.A.; SARRUF, F.D.; TAVANTE-JÚNIOR, C.R.; PINTO, C.A.S.O.; ZAGUE, V.; ARÊAS, E.P.G.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M.V.R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea *in vitro* da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 44, n. 2, p. 233-248, 2008.

BAHADORI, F.; KOCYIGIT, A.; ONYUKSEL, H.; DAG, A.; TOPCU, G. Cytotoxic, apoptotic and genotoxic effects of lipid-based and polymeric nano micelles, an in vitro evaluation. **Toxics**, v. 6, n. 1, p. 7-25, 2017.

BAHARI, L.A.S.; HAMISHEHKAR, H. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a comparative literature review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 6, n. 2, p. 143-151, 2016.

BALL, R.; BAJAJ, P.; WHITEHEAD, K. Achieving long-term stability of lipid nanoparticles: examining the effect of pH, temperature, and lyophilization. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 305-315, 2016.

BALM FACIAL CB2®. *In*: SIMPLE ORGANIC. Disponível em: <https://simpleorganic.com.br/products/kit-peles-sensiveis#!> Acesso em: 27 jul. 2023.

BARNES, T.M.; MIJALJICA, D.; TOWNLEY, J.P.; SPADA, F.; HARRISON, I.P. Vehicles for drug delivery and cosmetic moisturizers: review and comparison. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 12, p. 2012-2030, 2021.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BARTHE, M.; BAVOUX, C.; FINOT, F.; MOUCHE, I.; CUCEU-PETRENCI, C.; FORRERYD, A.; HANSSON, A.C.; JOHANSSON, H.; LEMKINE, G.F.; THÉNOT, J.-P. Safety testing of cosmetic products: overview of established methods and new approach methodologies (NAMs). **Cosmetics**, v. 8, n. 2, p. 50-67, 2021.

BASWAN, S.M.; KLOSNER, A.E.; GLYNN, K.; RAJGOPAL, A.; MALIK, K.; YIM, S.; STERN, N. Therapeutic potential of Cannabidiol (CBD) for skin health and disorders. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 13, p. 927-942, 2020.

BATTAGLIA, L.; GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, n. 5, p. 497-508, 2012.

BETA-CARIOFILENO. *In*: PUBMED COMPOUND. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515>. Acesso em: 27 jul. 2023.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – what they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.

BIOTEC. **Lecigel**<sup>®</sup>: agente gelificante ultraversátil. São Paulo, 2020. 10 p.

BUDIASIH, S.; MASYITAH, I.; JIYAUDDIN, K.; KALEEMULLAH, M.; SAMER, A.D.; FADLI, A.M.; EDDY, Y. Formulation and characterization of cosmetic serum containing argan oil as moisturizing agent. *In*: BROMO 2018 – Bromo Conference, Symposium on Natural Products and Biodiversity, 2018. **Proceedings of BROMO Conference**. p. 297-304.

BERACA CBA<sup>®</sup>. *In*: CLARIANT. **The CBD-like skin soother**. Disponível em: <https://www.clariant.com/pt/Business-Units/Care-Chemicals/Personal-Care/Actives-and-Natural-Origins/Active-Ingredients/Natural-Actives/Beracare-CBA>. Acesso em: 27 jul. 2023.

BIANCHI, J.H.; STOCKERT, J.C.; BUZZ, L.I.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; SIMONETTA, S.H. Reliable screening of dye phototoxicity by using a *Caenorhabditis elegans* fast bioassay. **Plos One**, v. 10, n. 6, p. 1-15, 2015.

BLAAK, J.; WOHLFART, R.; SCHÜRER, N.Y. Treatment of aged skin with a pH 4 skin care product normalizes increased skin surface pH and improves barrier function: results of a pilot study. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 1, n. 3, p. 50-58, 2011.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156-165, 2012.

BOZZA, A.; CAMPI, C.; GARELLI, S.; UGAZIO, E.; BATTAGLIA, L. Current regulatory and market frameworks in green cosmetics: the role of certification. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 30, p. 100851-100860, 2022.

BRASIL. **Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos**. 2. ed. revista. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008.

BRASIL. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. atual. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.

BRASIL. **Guia nº63/2023. Avaliação de Segurança Biológica de Materiais de Uso em Saúde de Base Nanotecnológica.** 2. ed. atual. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2023.

BRASIL. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos.** 2. ed. atual. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2012.

BRASIL. **Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos.** 2. ed. atual. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2021.

BRASIL. Resolução da diretoria colegiada número 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BRASIL. Resolução número 07 de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 fev. 2015.

BRASIL. Resolução número 58 de 24 de fevereiro de 2023. Dispõe sobre a proibição do uso de animais vertebrados, exceto seres humanos, em pesquisa científica, desenvolvimento e controle de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes que utilizem em suas formulações ingredientes ou compostos com segurança e eficácia já comprovadas cientificamente e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 01 mar. 2023.

BRASIL. Resolução número 327 de 9 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os procedimentos para a concessão da Autorização Sanitária para a fabricação e a importação, bem como estabelece requisitos para a comercialização, prescrição, a dispensação, o monitoramento e a fiscalização de produtos de Cannabis para fins medicinais, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 11 dez. 2019.

BROWN-KORSAH, J.B.; MCKENZIE, S.; OMAR, D.; SYDER, N.C.; ELBULUK, N.; TAYLOR, S.C. Variations in genetics, biology, and phenotype of cutaneous disorders in skin of color – Part I: Genetic, biologic, and structural differences in skin of color. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 87, n. 6, p. 1261-1270, 2022.

BUDDHIWANHIWALE, A.; PAWAR, R.K. Research of formulation and evaluation of face serum containing flax seed gel. **International Journal of Pharmaceutical Research and Applications**, v. 8, n. 2, p. 1797-1802, 2023.

BZIOUECHE, H.; TAMELGHAGHET, M.; CHIGNON-SICARD, B.; BAZILE, N.; HAUCHECORNE, P.; CALDERÓN, M.B.; MEUNIER, P.; ROCCHI, S.; PASSERON, T.; TULIC, M.K. Ceramide AD™ restores skin integrity and function following exposure to house dust mite. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 11, p. 9234-9246, 2023.

CAGEL, M.; TESAN, F.C.; BERNABEU, E.; SALGUEIRO, M.J.; ZUBILLAGA, M.B.; MORETTON, M.A.; CHIAPPETTA, D.A. Polymeric mixed micelles as nanomedicines: achievements and perspectives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 113, p. 211-228, 2017.

CALIXTO, L.S.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Physical-Mechanical characterization of cosmetic formulations and correlation between instrumental measurements and sensorial properties. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 39, n. 5, p. 527-534, 2017.

CÂMARA DE FOTOESTABILIDADE. *In*: Ethick. Disponível em: <https://www.ethick.com.br/wp-content/uploads/2017/04/c%C3%A2mara-de-fotoestabilidade.pdf>. Acesso em: 18 set. 2023.

CAMPANHOLI, K.S.S.; SILVA JUNIOR, R.C.; BRAGA, G.; MORAIS, F.A.P.; BALBINOT, R.B.; CAETANO, W. Minireview about medicinal copaiba oil in the treatment of skin diseases. **Journal of Dermatology and Skin Science**, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2022.

CARVALHO, I.P.S. Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carregamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica in vitro em células de câncer de bexiga. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

CAVALLI, J.; DUTRA, R.C. A closer look at cannabimimetic terpenes, polyphenols, and flavonoids: a promising road forward. **Neural Regeneration Research**, v. 16, n. 7, p. 1433-1435, 2021.

CBA PLANTS®. *In*: PORTIER COSMETICS. Disponível em: <https://www.portier.com.br/produto/cba-plants>. Acesso em: 27 jul. 2023.

CHAO, C.; GÉNOT, C.; RODRIGUEZ, C.; MAGNIEZ, H.; LACOURT, S.; FIEVEZ, A.; LEN, C.; PEZRON, I.; LUART, D.; VAN HECKE, E. Emollients for cosmetic formulations: towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 156-164, 2018.

CHARY, P.S.; SHAIKH, S.; BHAVANA, V.; RAJANA, N.; VASAVE, R.; MEHRA, N. K. Emerging role of nanocrystals in pharmaceutical applications: a review of regulatory aspects and drug development process. **Applied Materials Today**, v. 40, p. 102334-102360, 2024.

CHAUHAN, I.; YASIR, M.; VERMA, M.; SINGH, A. P. Nanostructured Lipid Carriers: a groundbreaking approach for transdermal drug delivery. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 10, n. 2, p. 150-165, 2020.

CHEN, F.; AL-AHMAD, H.; JOYCE, B.; ZHAO, N.; KÖLLNER, T.G.; DEGENHARDT, J.; STEWART, C.N. Within-plant distribution and emission of sesquiterpenes from

*Copaifera officinalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 11-12, p. 1017-1023, 2009.

CHI, C.-T.; LEE, M.-H.; WENG, C.-F.; LEONG, M.K. In silico prediction of PAMPA effective permeability using a Two-QSAR approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3170-3193, 2019.

CHIARI, B.G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H.R.N.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323-330, 2012.

CORREIA-SÁ, I.; PAIVA, A.; CARVALHO, C.M.; VIEIRA-COELHO, M.A. Cutaneous endocannabinoid system: does it have a role on skin wound healing bearing fibrosis? **Pharmacological Research**, v. 159, n., p. 104862-104867, 2020.

COSMOS. **Cosmos Standard**. Versão 3.1. Bruxelas, 2020. Disponível em: <https://www.cosmos-standard.org/en/documents/>. Acesso em 19 set. 2023.

DABROWSKA, A.K.; SPANO, F.; DERLER, S.; ADLHART, C.; SPENCER, N.D.; ROSSI, R.M. The relationship between skin function, barrier properties, and body-dependent factors. **Skin Research and Technology**, v. 24, n. 2, p. 165-174, 2017.

DANIEL, A.B.; STRICKLAND, J.; ALLEN, D.; CASATI, S.; ZUANG, V.; BARROSO, J.; WHELAN, M.; RÉGIMBALD-KRNEI, M.J.; KOJIMA, H.; NISHIKAWA, A. International regulatory requirements for skin sensitization testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 52-65, 2018.

DANOS VORAZES®. *In*: LOLA COSMETICS. Disponível em: <https://www.lolacosmetics.com.br/produto/kit-danos-vorazes/4928105>. Acesso em: 27 jul. 2023.

DARIO, M. F.; OLIVEIRA, F. F.; MARINS, D.S.S.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.R.; LÖBENBERG, R.; BOU-CHACRA, N. A. Synergistic photoprotective activity of nanocarrier containing oil of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex. Martius - Arecaceae. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 305-312, 2018.

DAS, S.; LEE, S.H.; CHOW, P.S.; MACBEATH, C. Microemulsion composed of combination of skin beneficial oils as vehicle: development of resveratrol-loaded microemulsion based formulations for skin care applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, p. 1-12, 2020.

DAVIS, E.C.; CALLENDER, V.D. Postinflammatory hyperpigmentation: a review of the epidemiology, clinical features, and treatment options in skin of color. **The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology**, v. 3, n. 7, p. 20-31, 2010.

DEMARCHI, C.A.; SILVA, L.M.; NIEDŹWIECKA, A.; ŚLAWSKA-WANIEWSKA, A.; LEWIŃSKA, S.; MAGRO, J.D.; CALISTO, J.F.F.; MARTELLO, R.; RODRIGUES, C.A. Nanoecotoxicology study of the response of magnetic O-Carboxymethylchitosan loaded silver nanoparticles on *Artemia salina*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 74, p. 103298-103303, 2020.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M.R.; CENSI, R.; MARTINO, P.D. Polymeric nanocapsules as nanotechnological alternative for drug delivery system: current status, challenges and opportunities. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 847-882, 2020.

FOCUS QUÍMICA. DEEPCAPS™ – Pigmentos microencapsulados dedicados aos tons de pele escuros. **Focus News**. São Paulo, 13 abril 2022. Disponível em: <https://www.focusquimica.com/2022/04/deepercaps-pigmentos-microencapsulados-dedicados-aos-tons-de-pele-escuros/>. Acesso em: 24 nov. 2024.

DEWI, M.K.; CHAERUNISAA, A.Y.; MUHAIMIN, M.; JONI, I.M. Improved activity of herbal medicines through nanotechnology. **Nanomaterials**, v. 12, n. 22, p. 4073-4091, 2022.

DIAS, B.P.; RIBEIRO, E.M.C; GONÇALVES, R.L.; OLIVEIRA, D.S.; FERREIRA, T.H.; SILVA, B.M. A Nanotecnologia no Brasil e o desenvolvimento de produtos com atividade antimicrobiana. **Química Nova**, v. 44, n. 8, p. 1084-1092, 2021.

DINI, I.; LANERI, S. The new challenge of green cosmetics: natural food ingredients for cosmetic formulations. **Molecules**, v. 26, n. 13, p. 3921-3949, 2021.

DOBROSI, N.; TÓTH, B.I.; NAGY, G.; DÓZSA, A.; GÉCZY, T.; NAGY, L.; ZOUBOULIS, C.C.; PAUS, R.; KOVÁCS, L.; BÍRÓ, T. Endocannabinoids enhance lipid synthesis and apoptosis of human sebocytes via cannabinoid receptor-2-mediated signaling. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 10, p. 3685-3695, 2008.

DUBEY, S.K.; DEY, A.; SINGHVI, G.; PANDEY, M.M.; SINGH, V.; KESHARWANI, P. Emerging trends of nanotechnology in advanced cosmetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 214, p. 112440-112458, 2022.

EAGLESTON, L.R.M.; KALANI, N.K.; PATEL, R.R.; FLATEN, H.K.; DUNNICK, C.A.; DELLAVALLE, R.P. Cannabinoids in Dermatology: a scoping review. **Dermatology Online Journal**, v. 24, n. 6, p. 1-17, 2018.

EALIAS, A.M.; SARAVANAKUMAR, M.P. A review on the classification, characterization, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 263, n. 3, p. 1-15, 2017.

EBERLIN, S.; SILVA, M.S.; FACCHINI, G.; SILVA, G.H.; PINHEIRO, A.L.T.A.; EBERLIN, S.; PINHEIRO, A.S. The *ex vivo* skin model as an alternative tool for the efficacy and safety evaluation of topical products. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 48, n. 1, p. 10-22, 2020.

EI-MENSHAWI, B.S.; FAYAD, W.; MAHMOUD, K.; EI-HALLOUTY, S.M.; EL MANAWATY, M.; OLOFSSON, M.H.; LINDER, S. Screening of natural products for therapeutic activity against solid tumors. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, n. 3, p. 258-264, 2010.

ELIAS, P.M. Stratum corneum defensive functions: an integrative view. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 2, p. 183-200, 2005.

ENDRINGER-PINTO, F.; BAGGER, C.; KUNZE, G.; JOLY-TONETTI, N.; THÉNOT, J.-P.; OSMAN-PONCHET, H.; JANFELT, C. Visualisation of penetration of topical antifungal drug substances through mycosis-infected nails by matrix-assisted laser desorption ionisation mass spectrometry imaging. **Mycoses**, v. 63, n. 8, p. 869-875, 2020.

EPIDERME HUMANA RECONSTRUÍDA. *In*: EPISKIN. Disponível em: <https://www.episkin.com/br/SkinEthic-RHE>. Acesso em: 19 set. 2023.

EUROPEN PARLIAMENT. **Regulation (EC) N° 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on Cosmetic Products**. 2009. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>. Acesso em: 13 set. 2023.

FABBRON-APPAS, C.T.; PANDEY, P.; PAREKH, H.S.; SALES, C.C.; DUQUE, M.D.; ANDRÉO-FILHO, N.; LOPES, P.S.; NORONHA, R.L.F.; LEITE-SILVA, V.R. Impact of different emollient esters on body emulsions: sensory, physicochemical, and biometrological characterization. **Journal of Sensory Studies**, v. 36, n. 4, p. 1-12, 2021.

FAGRON. **Optiphen™**, p. 1-13, 2023.

FANG, C.-L.; AL-SUWAYEH, S. A.; FANG, J.-Y. Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 41-55, 2013.

FDA. **Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products**. 1. ed. Rockville, 2014. 16 p.

FEDE, C.; ALBERTIN, G.; PETRELLI, L.; SFRISO, M.M.; BIZ, C.; DE CARO, R.; STECOO, C. Expression of the endocannabinoid receptors in human fascial tissue. **European Journal of Histochemistry**, v. 60, n. 2643, p. 130-134, 2016.

FEITO, J.; GARCÍA-SUÁREZ, O.; GARCÍA-PIQUERAS, J.; GARCÍA-MESA, Y.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; SUAZO, I.; CABO, R.; SUÁREZ-QUINTANILLA, J.; COBO, J.; VEGA, J.A. The development of human digital Meissner's and Pacinian corpuscles. **Annals of Anatomy**, v. 219, n., p. 8-24, 2018.

FERREIRA, A.O.; BRANDÃO, M.A.F. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 4. ed. vol. 2. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

FERREIRA, B.P.; COSTA, G.; MASCARENHAS-MELO, F.; PIRES, P.C.; HEIDARIZADEH, F.; GIRAM, P.S.; MAZZOLA, P.G.; CABRAL, C.; VEIGA, F.; PAIVA-SANTOS, A.C. Skin applications of cannabidiol: sources, effects, delivery systems, marketed formulations and safety. **Phytochemical Review**, v. 22, p. 781-828, 2023.

FERREIRA, H.S.; RANGEL, M.C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.

FERREIRA, M.; MATOS, A.; COURAS, A.; MARTO, J.; RIBEIRO, H. Overview of cosmetic regulatory frameworks around the world. **Cosmetics**, v. 9, n. 4, p. 72-86, 2022.

FILAIRE, E.; NACHAT-KAPPES, R.; LAPORTE, C.; HARMAND, M.-F.; SIMON, M.; POINSOT, C. Alternative in vitro models used in the main safety tests of cosmetic products and new challenges. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 44, n. 6, p. 604-613, 2022.

FILIPIUC, S.-I.; NEAGU, A.-N.; URITU, C.M.; TAMBA, B.-I.; FILIPIUC, L.-E.; TUDORANCEA, I.M.; BOCA, A.N.; HÂNCU, M.F.; PORUMB, V.; BILD, W. The skin and natural cannabinoids—topical and transdermal applications. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 7, p. 1049-1083, 2023.

FITZPATRICK, T.B. The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI. **Archives of Dermatology**, v. 124, n. 6, p. 869-871, 1988.

FLATEN, G.E.; PALAC, Z.; ENGESLAND, A.; FILIPOVIC-GRCLC, J.; VANIC, Z.; IKALKO-BASNET, N. In vitro skin models as a tool in optimization of drug formulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, p. 10-24, 2015.

FLECK, C.A.; NEWMAN, M. Advanced skin care – a novel ingredient. **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 4, n. 4, p. 92-94, 2012.

FLOR, J.; MAZIN, M.R.; FERREIRA, L.A. Cosméticos Naturais, Orgânicos e Veganos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 31, n. 3, p. 30-36, 2019.

FRANBOURG, A.; HALLEGOT, P.; BALTENNECK, F.; TOUTAIN, C.; LEROY, F. Current research on ethnic hair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 115-119, 2003. Suplemento.

FOCUS QUÍMICA. **Ceras Éster – Linha MeghCare**, p. 1, 2023.

FUJIWARA, G.M.; COSTA, C.K.; ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D. Evaluation of several formulations of ketoconazole shampoos for the employment of different antioxidants and solubilizers. **Visão Acadêmica**, v. 10, n. 2, p. 43-57, 2009.

FYTIANOS, G.; RAHDAR, A.; KYZAS, G. Z. Nanomaterials in Cosmetics: recent updates. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 979-994, 2020.

GACHUMI, G.; DEMELENNE, A.; POUDEL, A.; BASHI, Z.D.; EL-ANEED, A. Novel fast Chromatography-Tandem Mass Spectrometric quantitative approach for the determination of plant-extracted phytosterols and tocopherols. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1402-1417, 2021.

GARCÊS, A.; AMARAL, M.H.; SOUSA LOBO, J.M.; SILVA, A.C. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: a review. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 112, p. 159-167, 2018.

GATTEFOSSÉ. **Emulium® Illustro**, p. 1-52, 2019.

GEGOTEK, A.; JASTRZAB, A.; DOBRZYNSKA, M.; BIERNACKI, M.; SKRZYDLEWSKA, E. Exogenous antioxidants impact on UV-induced changes in membrane phospholipids and the effectiveness of the endocannabinoid system in human skin cells. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1260-1277, 2021.

GHOSH, P.; THAKUR, I.S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 259-270, 2017.

GONÇALVES, E.C.D.; ASSIS, P.M.; JUNQUEIRA, L.A.; COLA, M.; SANTOS, A.R.S.; RAPOSO, N.R.B.; DUTRA, R.C. Citral inhibits the inflammatory response and hyperalgesia in mice: the role of TLR4, TLR2/Dectin-1, and CB2 Cannabinoid Receptor/ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel pathways. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1190-1200, 2020a.

GONÇALVES, E.C.D.; BALDASSO, G.M.; BICCA, M.A.; PAES, R.S.; CAPASSO, R.; DUTRA, R.C. Terpenoids, cannabimimetic ligands, beyond the *Cannabis* plant. **Molecules**, v. 25, n.7, p. 1567-1613, 2020b.

GONÇALVES, K.M. **Inovação em cosméticos labiais: integrando óleos da biodiversidade brasileira em fórmulas veganas**. 2024. Dissertação (Mestrado em Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2024.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C.E. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review emphasizing on particle structure and drug release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 133, n. 1, p. 285-308, 2018.

GIRARDEAU-HUBERT, S; MINE, S; PAGEON, H; ASSELINEAU, D. The Caucasian and African skin types differ morphologically and functionally in their dermal component. **Experimental Dermatology**, v. 18, n. 8, p. 704-711, 2009.

GRANIZO, P.E.R. **Avaliação da fotoestabilidade de acetazolamida e loratadina e da capacidade de fotoproteção de seus complexos com cilodextrina**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GUERETZ, J.S.; SOMENSI, C.A.; MARTINS, M.L.; SOUZA, A.P. Evaluation of eugenol toxicity in bioassays with test-organisms. **Ciência Rural**, v. 47, n. 12, p. 1-5, 2017.

GUIDONI, M.; SCHERER, M.M.C.; FIGUEIRA, M.M.; SCHMITT, E.F.P.; ALMEIDA, L.C.; SCHERER, R.; BOGUSZ, S.; FRONZA, M. Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, n. 2, p. 1-8, 2019.

GUPTA, SANJEEV; BANSAL, R.; GUPTA, SUNITA; JINDAL, N.; JINDAL, A. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267-272, 2013.

GUPTA, V.; MOHAPATRA, S.; MISHRA, H.; FAROOQ, U.; KUMAR, K.; ANSARI, M.J.; ALDAWSARI, M.F.; ALALAIWE, A.S; MIRZA, M.A.; IQBAL, Z. Nanotechnology in cosmetics and cosmeceuticals – a review of latest advancements. **Gels**, v. 8, n. 3, p. 173-204, 2022.

GUPTA, V.; SHARMA, V.K. Skin typing: Fitzpatrick grading and others. **Clinics in Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 430-436, 2019.

GUTIÉRREZ-DEL-RÍO, I.; LÓPEZ-IBÁÑEZ, S.; MAGADÁN-CORPAS, P.; FERNÁNDEZ-CALLEJA, L.; PÉREZ-VALERO, A.; TUÑÓN-GRANDA, M.; MIGUÉLEZ, E.M.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ, F. Terpenoids and polyphenols as natural antioxidant agents in food preservation. **Antioxidants**, v. 10, n. 8, p. 1264-1296, 2021.

HALLAN, S.S.; SGUIZZATO, M.; ESPOSITO, E.; CORTESI, R. Challenges in the physical characterization of lipid nanoparticles. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 4, p. 549-579, 2021.

HAMISHEHKAR, H.; SAME, S.; ADIBKIA, K.; ZARZA, K.; SHOKRI, J.; TAGHAEI, M.; KOUHSOLTANI, M. A comparative histological study on the skin occlusion performance of a cream made of solid lipid nanoparticles and Vaseline. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 5, p. 378-387, 2015.

HASSAN, S.H.A.; VAN GINKEL, S.W.; HUSSEIN, M.A.M.; ABSKHARON, R.; OH, S-E. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. **Environment International**, v. 92-93, p. 106-118, 2016.

HOFMANN, E.; SCHWARZ, A.; FINK, J.; KAMOLZ, L.-P.; KOTZBECK, P. Modelling the complexity of human skin in vitro. **Biomedicines**, v. 11, n. 3, p. 794-810, 2023.

HOFFMAN, B.U.; BABA, Y.; GRIFFITH, T.N.; MOSHAROV, E.V.; WOO, S.H.; ROYBAL, D.D.; KARSENTY, G.; PATAPOUTIAN, A.; SULZER, D.; LUMPKIN, E.A. Merkel cells activate sensory neural pathways through adrenergic synapses. **Neuron**, v. 100, n. 6, p. 1401-1413, 2018.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

HOPF, N.B.; CHAMPMARTIN, C.; SCHENK, L.; BERTHET, A.; CHEDIK, L.; DUPLESSIS, J.L.; FRANKEN, A.; FRASCH, F.; GASKIN, S.; JOHANSON, G. Reflections on the OECD guidelines for in vitro skin absorption studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 117, p. 104752-104762, 2020.

HORRELL, E.M.W.; BOULANGER, M.C.; D'ORAZIO, J.A. Melanocortin 1 receptor: structure, function and regulation. **Frontiers in Genetics**, v. 7, n. 95, p. 1-16, 2016.

ICH. **Guidance on the photostability testing of new active substances and medical products Q1B**. Geneva, 1998.

ICH. **Guideline on validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1)**. Geneva, 2005.

IKARASHI, N.; SHISEKI, M.; YOSHIDA, R.; TABATA, K.; KIMURA, R.; WATANABE, T.; KON, R.; SAKAI, H.; KAMEI, J. Cannabidiol application increases cutaneous Aquaporin-3 and exerts a skin moisturizing effect. **Pharmaceuticals**, v. 14, n. 9, p. 879-888, 2021

ILIOPOULOS, F.; CHAPMAN, A.; LANE, M.E. A comparison of the in vitro permeation of 3-O-ethyl-l-ascorbic acid in human skin and in a living skin equivalent (LabSkin™). **International Journal of Cosmetic Science**, v. 43, n. 1, p. 107-112, 2021.

INFANTE, V.H.P.; MELO, M.O.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. The social and scientific evolution of the cosmetic science – a Brazilian view. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 15, n. 1, p. 82-93, 2018.

ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices – Part 5: Testes for *in vitro* cytotoxicity**. Geneva, 2009.

IUPAC. Detection and quantification capabilities. *In: Compendium of Analytical Nomenclature*, Chapter 18, Section 18.4.3.7, 3. ed. 1997. Disponível em: [https://publications.iupac.org/analytical\\_compendium/Cha18sec437.pdf](https://publications.iupac.org/analytical_compendium/Cha18sec437.pdf). Acesso em: 16 set. 2023.

IZZA, N.; WATANABE, N.; OKAMOTO, Y.; WIBISONO, Y.; UMAKOSHI, H. Characterization of entrapment behavior of polyphenols in nanostructured lipid carriers and its effect on their antioxidative activity. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 134, n. 3, p. 269-275, 2022.

JOUKHADAR, R.; NODILO, L.N.; LOVRIC, J.; HAFNER, A.; PEPIC, I.; JUG, M. Functional Nanostructured Lipid Carrier-enriched hydrogels tailored to repair damaged epidermal barrier. **Gels**, v. 10, n. 7, p. 466-489, 2024.

JUNGERSTED, J.M.; HIØGH, J.K.; HELLGREN, L.I.; JEMEC, G.B.E.; AGNER, T. Ethnicity and stratum corneum ceramides. **British Journal of Dermatology**, v. 163, n. 6, p. 1169-1173, 2010.

JUNQUEIRA, L.; POLONINI, H.; RAMOS, C.; FERREIRA, A.O.; RAPOSO, N.; BRANDÃO, M. Assessment of a novel vitamin D3 formulation with nanostructured lipid carriers for transdermal delivery. **Current Drug Delivery**, v. 19, n. 5, p. 614-624, 2022.

JIA, Z.; LI, J.; GAO, L.; YANG, D.; KANAIEV, A. Dynamic Light Scattering: a powerful tool for in situ nanoparticle sizing. **Colloids Interfaces**, v. 7, n. 1, p. 15-32, 2023.

JYOTHI, V.G.S.S.; GHOUSE, S.M.; KHATRI, D.K.; NANDURI, S.; SINGH, S.B.; MADAN, J. Lipid nanoparticles in topical dermal drug delivery: Does chemistry of lipid persuade skin penetration? **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 69, p. 103176-103187, 2022.

KABANOV, A.V.; LEMIEUX, P.; VINOGRADOV, S.; ALAKHOV, V. Pluronic block copolymers: novel functional molecules for gene therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. 223-233, 2002.

KAHRAMAN, E.; KAYKIN, M.; BEKTAY, H.S.; GUNGOR, S. Recent advances on topical application of ceramides to restore barrier function of skin. **Cosmetics**, v. 6, n. 3, p. 52-62, 2019.

KALIL, C.L.P.V.; VARGAS, A.S.; GRAZZIOTIN, F.P.R.; CAMPOS, V.B.; CHAVES, C.R.P. Clean beauty: artigo de revisão sobre a nova tendência em cosméticos. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 14, p. 1-5, 2022.

KAUL, S.; GULATI, N.; VERMA, D.; MUKHERJEE, S.; NAGAICH, U. Role of Nanotechnology in cosmeceuticals: a review of recent advances. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2018, p. 1-19, 2018.

KAWAKAMI, S.; MORINAGA, M.; TSUKAMOTO-SEN, S.; MORI, S.; MATSUI, Y.; KAWAMA, T. Constituent characteristics and functional properties of passion fruit seed extract. **Life**, v. 12, n. 1, p. 38-42, 2021.

KHAN, B.A.; AKHTAR, N.; KHAN, H.M.S.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T.; RASUL, A.; IQBAL, M.; KHAN, H. Basics of pharmaceutical emulsions: a review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2715-2725, 2011.

KHATER, D.; NSAIRAT, H.; ODEH, F.; SALEH, M.; JABER, A.; ALSHAER, W.; BAWAB, A.A.; MUBARAK, M.S. Design, preparation, and characterization of effective dermal and transdermal lipid nanoparticles: a review. **Cosmetics**, v. 8, n. 2, p. 39-82, 2021.

KINSEY, C.; LU, T.; DEISS, A.; VUOLO, K.; KLEIN, L.; RUSTANDI, R.R.; LOUGHNEY, J.W. Determination of lipid content and stability in lipid nanoparticles using ultra high-performance liquid chromatography in combination with a Corona Charged Aerosol Detector. **Electrophoresis**, v. 43, n. 9-10, p. 1091-1100, 2021.

KNORST, M.T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Compositae (Marcela)**. 1991. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas) – Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1991.

KOUASSI, M.-C.; GRISEL, M.; GORE, E. Multifunctional active ingredient-based delivery systems for skincare formulations: a review. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 217, p. 112676-112695, 2022.

KÜCHLER, S.; RADOWSKI, M.R.; BLASCHKE, T.; DATHE, M.; PLENDL, J.; HAAG, R.; SCHÄFER-KORTING, M.; KRAMER, K.D. Nanoparticles for skin penetration enhancement: A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 243–250, 2009.

KHULLAR, P.; MAHAL, A.; SINGH, V.; BANIPAL, T.S.; KAUR, G.; BAKSHI, M.S. How PEO-PPO-PEO triblock polymer micelles control the synthesis of gold nanoparticles: temperature and hydrophobic effects. **Langmuir**, v. 26, n. 13, p. 11363-11371, 2010.

LANGHANS, S.A. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 6, p. 1-14, 2018.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.A.; VEIGA-JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) oleoresins. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 3866-3889, 2012.

LEE, J.; KWON, K.H. Good ingredients from foods to vegan cosmetics after COVID-19 pandemic. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 21, n. 8, p. 3190-3199, 2022.

LEE, K.H.; LEE, D.W.; KANG, B.C. The 'R' principles in laboratory animal experiments. **Laboratory Animal Research**, v. 36, n. 45, p. 1-3, 2020.

LEME, L.B. **Produtos fotoprotetores com cor para a pele negra e a escassez de opções para esse público**. 2023. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Farmácia e Bioquímica) – Curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2023.

LI, N.; LI, X.; CHENG, P.; YANG, P.; SHI, P.; KONG, L.; LIU, H. Preparation of curcumin solid lipid nanoparticles loaded with flower-shaped lactose for lung inhalation and preliminary evaluation of cytotoxicity *in vitro*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2021, p. 1-15, 2021.

LIGIERO, C.B.P.; REIS, L.A.; PARRILHA, G.L.; BAPTISTA FILHO, M.; CANELA, M.C. Comparação entre métodos de quantificação em cromatografia gasosa: um experimento para cursos de química. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1338-1341, 2009.

LIMA, L.R.; ANDRADE, F.K.; ALVES, D.R.; MORAIS, S.M.; VIEIRA, R.S. Anti-acetylcholinesterase and toxicity against *Artemia salina* of chitosan microparticles loaded with essential oils of *Cymbopogon flexuosus*, *Pelargonium x ssp* and *Copaifera officinalis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 1361-1370, 2021.

LIMA, R.R.; GOMES, E.R.; STEPHANI, R.; PERRONE, I.T.; CARVALHO, A.F.; OLIVEIRA, L.F.C. Nutritional and technological aspects of vegetable oils that stand out for the prevalence of medium chain triacylglycerides: A review. **Research, Society and Development**, v. 10, n.7, p. 1-20, 2021.

- LISH, R.A.D.; JOHARI, S.A.; SARKHEIL, M.; YU, J. On how environmental and experimental conditions affect the results of aquatic nanotoxicology on brine shrimp (*Artemia salina*): a case of silver nanoparticles toxicity. **Environmental Pollution**, v. 255, p. 113358-113366, 2019.
- LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nano-emulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 303, n. 2, p. 557-563, 2006.
- LIU, S.; BAO, H.; LI, L. Role of PPO–PEO–PPO triblock copolymers in phase transitions of a PEO–PPO–PEO triblock copolymer in aqueous solution. **European Polymer Journal**, v. 71, p. 423-439, 2015.
- LOO, C.; BASRI, M.; ISMAIL, R.; LAU, H.; TEJO, B.; KANTHIMATHI, M.; HASSAN, H.; CHOO, Y. Effect of compositions in nanostructured lipid carriers (NLC) on skin hydration and occlusion. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 13-22, 2013.
- LÓPEZ-CABEZA, R.; KAH, M.; GRILLO, R.; BÍLKOVA, Z.; HOFMAN, J. Is centrifugal ultrafiltration a robust method for determining encapsulation efficiency of pesticide nanoformulations? **Nanoscale**, v. 13, n. 10, p. 5410-5418, 2021.
- LOURENÇO-LOPES, C.; FRAGA-CORRAL, M.; JIMENEZ-LOPEZ, C.; PEREIRA, A.G.; GARCIA-OLIVEIRA, P.; CARPENA, M.; PRIETO, M.A.; SIMALGANDARA, J. Metabolites from macroalgae and its applications in the cosmetic industry: a circular economy approach. **Resources**, v. 9, n. 9, p. 101-131, 2020.
- LU, H.-C.; MACKIE, K. Review of the Endocannabinoid System. **Biological Psychiatry: Cognitive Neuroscience and Neuroimaging**, v. 6, n. 6, p. 607-615, 2021.
- MAIA, A.M. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações cosméticas contendo ácido ascórbico**. 2002. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.
- MAKONI, P.A.; KASONGO, K.W.; WALKER, R.B. Short term stability testing of efavirenz-loaded Solid Lipid Nanoparticle (SLN) and Nanostructured Lipid Carrier (NLC) dispersions. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 8, p. 397-417, 2019.
- MALIK, A.; AMALIAH, R.; ZAHRA, V.; AHMAD, A.R. Antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of passion fruit seed oil. **Biomedical and Pharmacology Journal**, v. 16, n. 2, p. 791-796, 2023.
- MARTIN, K.I.; GLASER, D.A. Cosmeceuticals: the new medicine of beauty. **Science of Medicine**, v. 108, n. 1, p. 60-63, 2011.
- MARTINS, F.J.; SENRA, M.; CANESCHI, C.A.; SANTOS, J.A.; SILVA, A.D.; RAPOSO, N.R.B. New group of azastilbene analogs of resveratrol: synthesis, anticandidal activity and toxicity evaluation. **Journal of King Saud University Science**, v. 31, n. 2, p. 158-163, 2019.

MASIERO, J.F.; BARBOSA, E.J.; MACEDO, L.O.; SOUZA, A.; YUKUYAMA, M.N.; ARANTES, G.J.; BOU-CHACRA, N.A. Vegetable oils in pharmaceutical and cosmetic lipid-based nanocarriers preparations. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113838-113853, 2021.

MCLEMENTS, D.J.; GUMUS, C.E. Natural emulsifiers — Biosurfactants, phospholipids, biopolymers, and colloidal particles: molecular and physicochemical basis of functional performance. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 234, p. 3-26, 2016.

MCCLEMENTS, D.J.; JAFARI, S.M. Improving emulsion formation, stability and performance using mixed emulsifiers: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 251, p. 55-79, 2018.

MCLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.-J.; SMITH, D.L. Simple bench-top bioassays (Brine Shrimp and Potato Discs) for the discovery of plant antitumor compounds. **Acs Symposium Series**, v. 534, n. 9, p. 112-137, 1993.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, A.; STINCO, C.M.; MAPELLI-BRAHM, P. Skin carotenoids in public health and nutricosmetics: the emerging roles and applications of the UV radiation-absorbing colourless carotenoids phytoene and phytofluene. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1093-1133, 2019.

MEO, C.; TORTOLANI, D.; STANDOLI, S.; ANGELUCCI, C.B.; FANTI, F.; LEUTI, A.; SERGI, M.; KADHIM, S.; HSU, E.; RAPINO, C. Effects of rare phytocannabinoids on the Endocannabinoid System of human keratinocytes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 10, p. 5430-5448, 2022.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Journal of Medicine Plant Research**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MICHALAK, M.; PIERZAK, M.; KRECISZ, B.; SULIGA, E. Bioactive compounds for skin health: a review. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 203-233, 2021.

MISHRA, V.; BANSAL, K.K.; VERMA, A.; YADAV, N.; THAKUR, S.; SUDHAKAR, K.; ROSENHOLM, J.M. Solid lipid nanoparticles: emerging colloidal nano drug delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 191-211, 2018.

MOCKDECI, H.R.; JUNQUEIRA, L.A.; DUARTE, L.M.; MOREIRA, C.P.S.; OLIVEIRA, M.A.L.; BRANDÃO, M.A.F.; TAVARES, G.D.; RAPOSO, N.R.B. Improved anti-Candida activity of hydrogel containing tea tree oil-loaded solid lipid nanoparticles for the treatment of oropharyngeal candidiasis. **RPS Pharmacy and Pharmacological Reports**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2022.

MOHD-SETAPAR, S.H.; JOHN, C.P.; MOHD-NASIR, H.; AZIM, M.M.; AHMAD, A.; ALSHAMMARI, M.B. Application of nanotechnology incorporated with natural ingredients in natural cosmetics. **Cosmetics**, v. 9, n. 6, p. 110-130, 2022.

MONTENEGRO, L.; PARENTI, C.; TURNATURI, R.; PASQUINUCCI, L. Resveratrol-loaded lipid nanocarriers: correlation between in vitro occlusion factor and in vivo skin hydrating effect. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 58-69, 2017.

MOREIRAS, H.; SEABRA, M.C.; BARRAL, D.C. Melanin transfer in the epidermis: the pursuit of skin pigmentation control mechanisms. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 9, p. 4466-4477, 2021.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MUBEEN, B.; ANSAR, A.N.; RASOOL, R.; ULLAH, I.; IMAM, S.S.; ALSHEHRI, S.; GHONEIM, M.M.; ALZAREA, S.I.; NADEEM, M.S.; KAZMI, I. Nanotechnology as a novel approach in combating microbes providing an alternative to antibiotics. **Antibiotics**, v. 10, n. 12, p. 1473-1533, 2021.

NABARRETTI, B.H.; RIGON, R.B.; BURGA-SÁNCHEZ, J.; LEONARDI, G.R. A review of alternative methods to the use of animals in safety evaluation of cosmetics. **Einstein**, v. 20, n. 1, p. 1-6, 2022.

NANOPARTICLE ULTRAFILTRATION. *In*: MERCK. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/filtration/nanoparticle-ultrafiltration>. Acesso em: 19 set. 2023.

NARVAEZ, L.E.M.; FERREIRA, L.M.M.C.; SANCHES, S.; GYLES, D.A.; SILVA-JÚNIOR, J.O.C.; COSTA, R.M.R. A review of potential use of amazonian oils in the synthesis of organogels for cosmetic application. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2733-2757, 2022.

NATRUE. **NATRUE Label Criteria**: requirements to be met by natural and organic cosmetics. Versão 3.9. Bruxelas, 2021. Disponível em: [https://www.natrue.org/uploads/2020/10/EN-NATRUE-Label\\_criteria\\_v3.9\\_2021-1.pdf](https://www.natrue.org/uploads/2020/10/EN-NATRUE-Label_criteria_v3.9_2021-1.pdf). Acesso em: 19 set. 2023.

NETO, O.Z.S.; BATISTA, E.A.C.; MEIRELLES, A.J.A. Potencial de oleaginosas nativas no desenvolvimento de cadeias produtivas da biodiversidade brasileira. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 54, p. 537-559, 2020.

NEUPANE, R.; BODDU, S.H.S.; RENUKUNTLA, J.; BABU, R.J.; TIWARI, A.K. Alternatives to biological skin in permeation studies: current trends and possibilities. **Pharmaceutics**, v. 12, n. 2, p. 152-176, 2020.

NIJHAWAN, R.I.; ALEXIS, A.F. Practical approaches to medical and cosmetic dermatology in skin of color patients. **Expert Review of Dermatology**, v. 6, n. 2, p. 175-187, 2011.

NIÑO, J.; NARVÁEZ, D.M.; MOSQUERA, O.M.; CORREA, Y.M. Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from

colombian biodiversity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 566-570, 2006.

OECD. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**. Paris, 2004.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Test n° 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion, Section 4. Paris, 2015.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Test n°. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion, Section 4. Paris, 2020.

OLIVEIRA, D.A.; ANGONESE, M.; GOMES, C.; FERREIRA, S.R.S. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: sustainable recovery and biological activities. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 55-62, 2016.

ORCHARD, A.; VAN VUUREN, S.F. Carrier oils in dermatology. **Archives of Dermatological Research**, v. 311, n. 9, p. 653-672, 2019.

ORDUZ-DÍAZ, L.L.; LOZANO-GARZÓN, K.; QUINTERO-MENDOZA, W.; DÍAZ, R.; CARDONA-JARAMILLO, J.E.C.; CARRILLO, M.P.; GUERRERO, D.C.; HERNÁNDEZ, M.S. Effect of fermentation and extraction techniques on the physicochemical composition of Copoazú butter (*Theobroma grandiflorum*) as an ingredient for the cosmetic industry. **Cosmetics**, v. 11, n. 3, p. 77-88, 2024.

PANORAMA DO SETOR. *In*: ABIHPEC. Disponível em: <https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor/>. Acesso em: 19 set. 2023.

PAREEK, A.; KAPOOR, D.U.; YADAV, S.K.; RASHID, S.; FAREED, M.; AKHTER, M.S.; MUTEEB, G.; GUPTA, M.M.; PRAJAPATI, B.G. Advancing lipid nanoparticles: a pioneering technology in cosmetic and dermatological treatments. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 64, p. 100814-100830, 2025.

PAVLACKOVÁ, J.; EGNER, P.; POLAĽKOVÁ, J.; HOJEROVÁ, J.; PINDÁKOVÁ, L.; MOKREJĽ, P.; VARADOVÁ, V. Transdermal absorption of active substances from cosmetic vehicles. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 1410-1415, 2019.

PAVLOU, P.; SIAMIDI, A.; VARVARESOU, A.; VLACHOU, M. Skin care formulations and lipid carriers as skin moisturizing agents. **Cosmetics**, v. 8, n. 3, p. 89-100, 2021.

PELLEVOISIN, C.; VIDEAU, C.; BRIOTET, D.; GRÉGOIRE, C.; TORNIER, C.; ALONSO, A.; RIGAUDEAU, A.S.; BOUEZ, C.; SEYLER, N. SkinEthic™ RHE for *in vitro* evaluation of skin irritation of medical device extracts. **Toxicology In Vitro**, v. 50, p. 418-425, 2018.

PENACHIN, B.; KAKUDA, L.; CAMPOS, P.M.B.G.M. Evaluation of the protective and moisturizing effects of cosmetic formulations for the skin containing extracts with film-forming properties. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 19, n. 2, p. 361-378, 2022.

PESQUISA NACIONAL POR AMOSTRAS DE DOMICÍLIO. *In*: IBGE. **Conheça o Brasil – População Cor ou Raça**. Disponível em: <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/populacao/18319-cor-ou-raca.html>. Acesso em: 09 jul. 2023.

PISANTI, S.; MALFITANO, A.M.; CIAGLIA, E.; LAMBERTI, A.; RANIERI, R.; CUOMO, G.; ABATE, M.; FAGGIANA, G.; PROTO, M.C.; FIORE, D. Cannabidiol: state of the art and new challenges for therapeutic applications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 175, p. 133-150, 2017.

POLJSKAK, N.; GLAVAC, N.K. Vegetable butters and oils as therapeutically and cosmetically active ingredients for dermal use: a review of clinical studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 1-17, 2022.

POMPILHO, W.M.; MARCONDES, H.C.; OLIVEIRA, T.T. Bioatividade de três espécies vegetais nativas da Floresta Atlântica brasileira frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 473-480, 2014.

PRAÇA, F.S.G.; MEDINA, W.S.G.; ELOY, J.O.; PETRILLI, R.; CAMPOS, P.M.; ASCENSO, A.; BENTLEY, M.V.L.B. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 111, p. 121-132, 2018.

PROKSCH, E. pH in nature, humans and skin. **The Journal of Dermatology**, v. 45, p. 1044-1052, 2018.

PROKSCH, E.; SOEBERDT, M.; NEUMANN, C.; KILIC, A.; ABELS, C. Modulators of the endocannabinoid system influence skin barrier repair, epidermal proliferation, differentiation and inflammation in a mouse model. **Experimental Dermatology**, v. 28, n. 9, p. 1058-1065, 2019.

PULSONI, I.; LUBDA, M.; AIELLO, M.; FEDI, A.; MARZAGALLI, M.; VON HAGEN, J.; SCAGLIONE, S. Comparison between Franz Diffusion Cell and a novel Micro-physiological System for in vitro penetration assay using different skin models. **Slas Technology**, v. 27, n. 3, p. 161-171, 2022.

PUROHIT, S.; KALITA, D.; BARIK, C.R.; SAHOO, L.; GOUD, V.V. Evaluation of thermophysical, biochemical and antibacterial properties of unconventional vegetable oil from Northeast India. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 81-91, 2021.

QIN, L.; WANG, W.; YOU, S.; DONG, J.; ZHOU, Y.; WANG, J. *In vitro* antioxidant activity and *in vivo* antifatigue effect of layered double hydroxide nanoparticles as delivery vehicles for folic acid. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p. 5701-5710, 2014.

QUIMIS. **Manual de instruções do viscosímetro rotativo microprocessado Q860M21**. São Paulo, 2013. 14 p.

RAJABI, S.; RAMAZANI, A.; HAMIDI, M.; NAJI, T. *Artemia salina* as a model organism in toxicity assessment of nanoparticles. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 23, n. 1, p. 20-25, 2015.

REKHA, S.; ANILA, E.I. In vitro cytotoxicity studies of surface modified CaS nanoparticles on L929 cell lines using MTT assay. **Materials Letters**, v. 236, p. 637-639, 2019.

RODRIGUEZ-RUIZ, V.; SALATTI-DORADO, J.; BARZEGARI, A.; NICOLAS-BOLUDA, A.; HOUAOU, A.; CABALLO, C.; CABALLERO-CASERO, N.; SICILIA, D.; VENEGAS, J.B.; PAUTHE, E. Astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers for preservation of antioxidant activity. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2601-2612, 2018.

ROMERO, E.R. **Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de malaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica**. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen & Co Ltd., 1959.

SALA, M.; DIAB, R.; ELAISSARI, A.; FESSI, H. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1-2, p. 1-17, 2018.

SALAZAR, J.; CARMONA, T.; ZACCONI, F. C.; VENEGAS-YAZIGI, D.; CABELLO-VERRUGIO, C.; CHOI, W.; VILOS, C. The human dermis as a target of nanoparticles for treating skin conditions. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 10-27, 2023.

SALVIONI, L. MORELLI, L.; OCHOA, E.; LABRA, M.; FIANDRA, L.; PALUGAN, L.; PROSPERI, D.; COLOMBO, M. The emerging role of nanotechnology in skincare. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 293, p. 1-23, 2021.

SANTOS, E.; BENDER, S. Avaliação de estabilidade em uma formulação clareadora. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 15, p. 1-8, 2022.

SANTOS, F.D.R.P.; BELFORT, M.G.S.; LUCENA, V.B.; CHAVES, J.A. Características físico-químicas de um sérum desenvolvido à base do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para pele idosa. **Revista Enfermagem Atual**, v. 95, n. 33, p. 1-15, 2021.

SANTOS, L. O que é CBA? Entenda tudo sobre o Cannabinoid Active System. **Blog Kaya Mind**. São Paulo, 18 out. 2021. Disponível em: <https://kayamind.com/cannabinoid-active-system/>. Acesso em: 13 set. 2023.

SARKHEIL, M.; JOHARI, S.A.; AN, H.J.; ASGHARI, S.; PARK, H.S.; SOHN, E.K.; YU, I.J. Acute toxicity, uptake, and elimination of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using saltwater microcrustacean, *Artemia franciscana*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 181-188, 2018.

- SASIDHARAN, S.; JOSEPH, P.; JUNISE. Formulation and evaluation of fairness serum using polyherbal extracts. **International Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 3, p. 105-112, 2014.
- SETHI, A.; KAUR, T.; MALHOTRA, S.K.; GAMBHIR, M.L. Moisturizers: the slippery road. **Indian Journal of Dermatology**, v. 61, n. 3, p. 279, 2016.
- SHANKAR, V.K.; WANG, M.; AJJARAPU, S.; KOLIMI, P.; AVULA, B.; MURTHY, R.; KHAN, I.; MURTHY, S.N. Analysis of docosanol using GC/MS: method development, validation, and application to ex vivo human skin permeation studies. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 12, n. 2, p. 287-292, 2022.
- SHARMA, A.; BALDI, A. Nanostructured lipid carriers: a review. **Journal of Developing Drugs**, v. 7, n. 1, p. 191-202, 2019.
- SHOKRY, A.; KHALIL, M.; IBRAHIM, H.; SOLIMAN, M.; EBRAHIM, S. Acute toxicity assessment of polyaniline/Ag nanoparticles/graphene oxide quantum dots on *Cypridopsis vidua* and *Artemia salina*. **Nature Scientific Reports**, v. 11, n. 5336, p. 1-9, 2021.
- SIL, B.C.; MOORE, D.J.; LANE, M.E. Use of LC-MS analysis to elucidate by-products of niacinamide transformation following in vitro skin permeation studies. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 5, p. 525-529, 2018.
- SILVA, F.V.F.; SANTOS, M.C.; NEIVA, L.D.B.; OLIVEIRA, M.A.C.; LEAL, B.S.; MOREIRA, F.A.S.; SANTOS, P.N.; CAVALCANTE, G.L.; SOUSA, J.P.S.; NETO, M.P.L. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaifera officinalis* L. (copaíba). **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 30, p. 1-10, 2019.
- SÍMARO, G.V.; LEMOS, M.; SILVA, J.J.M.; CUNHA, W.R.; CARNEIRO, L.J.; AMBRÓSIO, S.R.; CUNHA, N.L.; ANDRADE, S.F.; ARRUDA, C.; BANDERÓ-FILHO, V.C. In vivo study of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Copaifera pubiflora* Benth oleoresin. **Natural Product Research**, v. 36, n. 4, p. 1129-1133, 2020.
- SKŁADANOWSKI, M.; GOLINSKA, P.; RUDNICKA, K.; DAHM, H.; RAI, M. Evaluation of cytotoxicity, immune compatibility and antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 6, p. 603-613, 2016.
- SOLDATI, P.P.; POLONINI, H.C.; PAES, C.Q.; RESTREPOB, J.A.S.; CRECZYŃSKI-PASA, T.B.; CHAVES, M.G.A.M.; BRANDÃO, M.A.F.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N.R.B. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect. **Ifac-Papersonline**, v. 51, n. 27, p. 16-21, 2018.
- SOMAN, S.S.; VIJAYAVENKATARAMAN, S. Applications of 3D bioprinted-induced pluripotent stem cells in healthcare. **International Journal of Bioprinting**, v. 6, n. 4, p. 59-79, 2020.

SOUZA, L.C.; SOUZA, E.S.; BRITO, C.V.S.P.; DINIZ, M.C. Prospecção tecnológica da utilização dos ácidos graxos de óleos vegetais na indústria de cosméticos. **Cadernos de Prospecção**, v. 15, n. 2, p. 541-556, 2022.

SOUZA, S.A.G. **Avaliação de toxicidade in vitro e hidratação cutânea in vivo de emulsão cosmética contendo óleo de *Mauritia flexuosa* L.** 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Curso de Graduação em Farmácia, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

SPADA, F; BRANES, T.M.; GREIVE, K.A. Skin hydration is significantly increased by a cream formulated to mimic the skin's own natural moisturizing systems. **Clinical, Cosmetic and Investigational Dermatology**, v. 15, n. 11, p. 491-497, 2018.

STANDER, S.; SCHMELZ, M.; METZE, D.; LUGER, T.; RUKWIED, R. Distribution of cannabinoid receptor 1 (CB1) and 2 (CB2) on sensory nerve fibers and adnexal structures in human skin. **Journal of Dermatological Science**, v. 38, n. 3, p. 177-188, 2005.

STAROWICZ, K.; FINN, D.P. Cannabinoids and Pain: sites and mechanisms of action. **Cannabinoid Pharmacology**, v. 80, p. 437-475, 2017.

SUGINO, K.; IMOKAWA, G.; MAIBACH, H.I. Ethnic difference of stratum corneum lipid in relation to stratum corneum function. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 100, p. 587-597, 1993.

SUPE, S.; TAKUDAGE, P. Methods for evaluating penetration of drug into the skin: a review. **Skin Research and Technology**, v. 27, n. 3, p. 299-308, 2021.

SURBER, C.; KOTTNER, J. Skin care products: what do they promise, what do they deliver. **Journal of Tissueviability**, v. 26, p. 29-36, 2017.

SURINI, S.; MUBARAK, H.; RAMADON, D. Cosmetic serum containing grape (*Vitis vinifera* L.) seed extract phytosome: formulation and *in vitro* penetration study. **Journal of Young Pharmacists**, v. 10, n. 2, p. 51-55, 2018.

SURYA, M.; GUNASEKARAN, S. A review on recent scenario of cosmetics. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 68, n. 1, p. 190-197, 2021.

TELEK, A.; BÍRÓ, T.; BODÓ, E.; TÓTH, B.I.; BORBÍRÓ, I.; KUNOS, G.; PAUS, R. Inhibition of human hair follicle growth by endo-and exocannabinoids. **The Faseb Journal**, v. 21, n. 13, p. 3534-3541, 2007.

TEMERDASHEV, Z.A.; MUSORINA, T.N.; CHERVONNAYA, T.A.; ARUTYUNYAN, Z.V. Possibilities and limitations of solid-phase and liquid extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 76, n. 12, p. 1357-1370, 2021.

THOMPSON, C. J.; AINGER, N.; STARCK, P.; MYKHAYLYK, O.O.; RYAN, A.J. Shampoo Science: a review of the physiochemical processes behind the function of a shampoo. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 224, p. 1-16, 2023.

TÓTH, B.I.; DOBROSI, N.; DAJNOKI, A.; CZIFRA, G.; OLÁH, A.; SZÖLLŐSI, A.G.; JUHÁSZ, I.; SUGAWARA, K.; PAUS, R.; BÍRÓ, T. Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 5, p. 1095-1104, 2011.

TORRES, M.P.R.; ESPRENDOR, R.V.F.; BONALDO, S.M.; RIBEIRO, E.B.; VALLADÃO, D.M.S. Development, characterization and stability of microemulsified formulations of bacaba, *Oenocarpus bacaba* oil. **Acta Amazonica**, v. 49, n. 3, p. 246-255, 2019.

TORT, S.; KARAKUCUK, A. Serum type hyaluronic acid formulations: *in vitro* characterization and patch test study. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 271-278, 2021.

UDAPURKAR, P.P.; SANAP, A.S. Formulation and development of face serum. **International Journal of Creative Research Thoughts**, v. 11, n. 6, p. 1-13, 2023.

UMEHARA, Y.; KIATSURAYANON, C.; TRUJILLO-PAEZ, J.V.; CHIEOSILAPATHAM, P.; PENG, G.; YUE, H.; NGUYEN, H.L.T.; SONG, P.; OKUMURA, K.; OGAWA, H.; NIYONSABA, F. Intractable itch in atopic dermatitis: causes and treatments. **Biomedicines**, v. 9, n. 3, p. 229-242, 2021.

USP 30/NF 35. **The United States Pharmacopeia**. vol.1. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2007.

VAKHARIYA, R.R.; OZA, S.A.; BHINGARDEVE, C.S.; PATIL, S.J.; MUJAWAR, S.F.; MOHITE, S. K. Formulation, development and evaluation of herbal hair serum: a classical approach to enhance hair quality. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 76, n.2, p. 100-103, 2022.

VELASCO, M.V.R.; MACIEL, C.P.M.; SARRUF, F.D.; PINTO, C.A.S.O.; CONSIGLIERI, V.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A.R. Desenvolvimento e teste preliminar da estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 2, p. 181-196, 2008.

VERDIER-SÉVRAIN, S.; BONTÉ, F. Skin hydration: a review on its molecular mechanisms. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, n. 2, p. 75-82, 2007.

VICCINI, L.F.; SILVEIRA, R.S.; VALE, A.A.; CAMPOS, J.M.S.; REIS, A.C.; SANTOS, M.O.; CAMPOS, V.R.; CARPANEZ, A.G.; GRAZUL, R.M. Citral and linalool content has been correlated to DNA content in *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 14-19, 2014.

VIEGAS, C.; PATRÍCIO, A.B.; PRATA, J.M.; NADHMAN, A.; CHINTAMANENI, P.K.; FONTE, P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: a comparative review. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 6, p. 1593-1626, 2023.

VINARDELL, M.; MITJANS, M. Alternative methods to animal testing for the safety evaluation of cosmetic ingredients: an overview. **Cosmetics**, v. 4, n. 3, p. 30-43, 2017.

WANG, C.; CUI, B.; GUO, L.; WANG, A.; ZHAO, X.; WANG, Y.; SUN, C.; ZENG, Z.; ZHI, H.; CHEN, H.; LIU, G.; CUI, H. Fabrication and evaluation of lambda-cyhalothrin nanosuspension by one-step melt emulsification technique. **Nanomaterials**, v. 9, n. 2, p. 145-157, 2019.

WATERS, L. Recent developments in skin mimic systems to predict transdermal permeation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2725-2732, 2015.

WILKINSON, J.D.; WILLIAMSON, E.M. Cannabinoids inhibit human keratinocyte proliferation through a non-CB1/CB2 mechanism and have a potential therapeutic value in the treatment of psoriasis. **Journal of Dermatological Science**, v. 45, n. 2, p. 87-92, 2007.

WISSING, S.A.; LIPPACHER, A.; MULLER, R.H. Investigations on the occlusive properties of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, p. 313-324, 2001.

WISSING, S.A.; MULLER, R.H. The influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, n. 1-2, p. 377-379, 2002.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J.-C.; WONG, J.K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 92-98, 2016.

YONGJIU, L.; HAISHENG, H.; JIANPING, Q.; LU, Y.; ZHAO, W.; DONG, X.; WU, W. Visual validation of the measurement of entrapment efficiency of drug nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 547, n. 1-2, p. 395-403, 2018.

YOSHIMATSU, H.; ISHII, K.; KONNO, Y.; SATSUKAWA, M.; YAMASHITA, S. Prediction of human percutaneous absorption from in vitro and in vivo animal experiments. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 534, n. 1-2, p. 348-355, 2017.

ZANI, C.L.; CHAVES, P.P.G.; QUEIROZ, R.; OLIVEIRA, A.B.; CARDOSO, J.E.; ANJOS, A.M.G.; GRANDI, T.S.M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Phytomedicine**, v. 2, n. 1, p. 47-50, 1995.

ZERBINATI, N.; SOMMATIS, S.; MACCARIO, C.; FRANCESCO, S.; CAPILLO, M.C.; GRIMALDI, G.; RAUSO, R.; HERRERA, M.; BENCINI, P.L.; MOCCHI, R. A practical approach for the in vitro safety and efficacy assessment of an anti-ageing cosmetic

cream enriched with functional compounds. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7592-7603, 2021.

ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90-99, 2014.

ZSIKÓ, S.; CSÁNYI, E.; KOVÁCS, A.; BUDAI-SZUCS, M.; GÁCSI, A.; BERKÓ, S. Methods to evaluate skin penetration *in vitro*. **Scientia Pharmaceutica**, v. 87, n. 3, p. 19-39, 2019.

## ANEXO A – Certificado de Análise do óleo CBA®

# Bielus

ingredientes

## CERTIFICADO DE ANÁLISE

PRODUTO	BERACARE CBA	Página 1/1
DESCRIÇÃO	ÓLEO CANABINOIDE	
INCI NAME (PCPC)	COPAIFERA OFFICINALIS (BALSAM COPAIBA) RESIN, PASSIFLORA EDULIS SEED	
INCI NAME (COSING)	COPAIFERA OFFICINALIS RESIN, PASSIFLORA EDULIS SEED OIL	
CÓDIGO	BA35010B	
LOTE	J2135010	
FABRICAÇÃO	14/10/2021	
VALIDADE	14/10/2023	

Itens Controlados	Unidades	Especificações	Resultados
Aparência	Visual	Líquido viscoso	De acordo
Cor	Visual	Amarelo claro	De acordo
Odor	-	Característico	De acordo
Densidade	g/cm <sup>3</sup>	0,900 - 0,920	0,906
Índice de Refração (20°C)	-	1,400- 1,500	1,4946
Índice de Acidez	%	0 - 2	0,800
Índice de Peróxido	meqO <sub>2</sub> /kg	0 - 5	0,00
Índice de Iodo	gl2/100g	170 - 200	178,25
Índice de Saponificação	mgKOH/g	20 - 80	56,19
B-cariofileno	%	Min. 28	49,62
Alfa-humuleno	%	Min. 3,7	6,96
Ácido Linoleico	%	Min. 5,5	7,01
Bactérias	<100	<100	<10
Bolores e Leveduras	<100	<100	<10
Estocagem	Armazenar em local fresco e arejado ao abrigo da luz, à temperatura constante, preferencialmente ambiente. Trata-se de um produto natural, portanto pode sofrer variação de suas características físico-químicas se não cumpridas as orientações para armazenagem, reduzindo shelf life do produto.		