

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

**Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica
bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos**

Michelli Ferrera Dario

Tese para obtenção do Título de **DOCTOR**

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

São Paulo
2016

Michelli Ferrera Dario

**Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica
bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos**

Versão Corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.

O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de **DOUTOR**

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

São Paulo

2016

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

Dario, Michelli Ferrera
D218d Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos / Michelli Ferrera Dario. -- São Paulo, 2016.
187p.

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

1. Cabelo: Tratamento químico: Cosméticos 2. Nanotecnologia
3. Flavonoides 4. Radiação ultravioleta 5. Radicais livres I. T. II.
Velasco, Maria Valeria Robles, orientador.

668.55

CDD

Michelli Ferrera Dario

Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção de Título de DOUTOR

Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco
Orientadora/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Dedicatória

*Aos meus queridos pais, **Dolores** e **Carlos**, por terem me ensinado o amor ao estudo e por terem permitido que meu sonho se tornasse realidade. Muito obrigada!!*

*À minha querida avó, **Helena** (in memoriam), por seu amor e apoio. Obrigada pelas tantas vezes que ficou ao meu lado enquanto eu estudava... Meu exemplo de amor à vida!*

*À minha tia, **Isabel**, por seu carinho e por rezar por mim todas as noites.*

*À minha irmã, **Aline**, pela sua amizade desde sempre!*

*Ao meu amado marido, **Arthur**, pelo seu carinho e apoio incondicional durante essa longa caminhada.*

Agradecimentos

A Deus, Jesus, e a todos os mentores espirituais pela constante proteção e amparo em todos os momentos.

À minha família, meus tios e primos, meus sogros, Fátima e Paulo, meu cunhado, Vitor, minha tia Verônica e meu avô de coração Sr. Paulo, e à mascote da família, Nina, obrigada pelo amor e muitas alegrias.

A minha querida orientadora Prof.^a Assoc.^a Maria Valéria Robles Velasco, por ter ensinado tudo que sei, por ter permitido e incentivado meu crescimento acadêmico de maneira plena, por sua amizade, confiança e apoio, por seu carinho... Obrigada por TUDO!!

Ao querido Prof. Assoc. André Rolim Baby, pelo apoio e generosidade em compartilhar seus conhecimentos.

A todos os professores que tive o prazer de conhecer ao longo desta caminhada acadêmica e que me incentivaram, desde o Ensino Fundamental até a Pós-graduação.

À Prof.^a Dr.^a Gislaine Ricci Leonardi e Prof.^a Assoc.^a Iolanda Midea Cuccovia por seus valiosos ensinamentos durante o exame de qualificação.

Aos maravilhosos amigos de laboratório, pelo apoio, pelas discussões científicas, mas principalmente pela amizade, companheirismo, e pelos

muitos momentos de alegria: Alberto, Alexandra, André, Camila, Claudinéia, Daniela, Fabiana, Fernanda, Flávia, Gabriela, Margarida, Máira, Michele, Mirela, Mirla, Nicole, Priscila, Rafael, Robson, Tércio, Thalita, Thamires.

À querida amiga Camila Areias de Oliveira, pelo apoio e amizade durante nossa estada em Lisboa. Obrigada!!

Às estagiárias de Iniciação Científica por sua dedicação: Camila, Chin, Lucianna, Victoria. Desejo um futuro brilhante a vocês!

Aos técnicos e, mais do que isso, amigos, Claudinéia e Edgar.

Ao técnico Alexandre Mariane Rodrigues pelo apoio desde o início.

Aos funcionários da FCF/USP: Alexandre, David, Doralice, Elaine, Irineu, Jorge, Marinaiva, por enorme competência e suporte.

À empresa Croda, pelo fornecimento das matérias-primas.

Ao CNPq e à FAPESP (Processos 2013/16070-8, 2013/16265-3 e 2014/11954-8), pela bolsa de estudos e demais auxílios financeiros que tornaram possível a realização deste trabalho.

Aos queridos Prof. Dr. Manuel Eduardo Minas da Piedade, Prof.^a Dr.^a Maria da Soledade Santos e Prof.^a Dr.^a Ana S. Viana, da Faculdade de

Ciências da Universidade de Lisboa; Prof.^a Dr.^a Catarina Rosado, Prof.^a Dr.^a Joana Filipa Portugal Faria da Mota, Prof. Dr. Nuno Saraiva, da Universidade Lusófona; Prof.^a Dr.^a Ermelinda Maçôas e Dr.^a Inês de Fátima Afonso Mariz, do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, pelo carinho com que me receberam em Lisboa e pela parceria.

À Prof.^a Lorena Rigo Gaspar Cordeiro e Natália Cirino Belini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (USP), pela realização do ensaio de avaliação do potencial de irritação ocular (HET-CAM).

À Prof.^a Ohara Augusto e Dr.^a Edlaine Linares, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, pela realização do ensaio de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo acolhimento, ensinamentos valiosos, estrutura, e por ter sido meu lar nesses últimos treze anos de formação.

E a todos que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

"Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo".

Fernando Pessoa

RESUMO

DARIO, M.F. **Desenvolvimento e avaliação de eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos.** 2016. 187f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A radiação solar, composta por radiação ultravioleta (UV), visível (Vis) e infravermelho, é responsável por acelerar os processos de alteração de cor e do conteúdo proteico da fibra capilar. Visando contornar este problema, este trabalho propõe a incorporação do flavonoide quercetina, de reconhecida atividade antioxidante, em uma nanoemulsão catiônica de aplicação capilar. Para tanto, foram desenvolvidas formulações contendo quercetina a 0,5% (p/p) pelo método de baixa energia sub-PIT. A formulação de menor índice de polidispersão (IPD) foi selecionada e submetida à *Avaliação de Estabilidade Normal*. Neste ensaio, a nanoemulsão foi armazenada em diferentes condições de temperatura por 90 dias, sendo analisados: características organolépticas, valor de pH, atividade antioxidante, conteúdo de quercetina, diâmetro médio de gotícula e potencial zeta. A fotoestabilidade da nanoemulsão envolveu a determinação do perfil de absorção e da sua atividade antioxidante após períodos de exposição à radiação UV/Vis. Posteriormente, a nanoemulsão foi caracterizada quanto aos seguintes parâmetros: eficiência de encapsulamento, perfil reológico, morfologia das gotículas por Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica e Microscopia de Força Atômica (AFM). A possível interação entre a quercetina e os demais tensoativos presentes na nanoemulsão foi avaliada por Microscopia Confocal de Fluorescência e Análise térmica. A segurança da nanoemulsão foi determinada pelo método *in vitro* HET-CAM e por biocompatibilidade cutânea, em voluntários. A eficácia da nanoemulsão catiônica na fotoproteção das características da fibra capilar descolorida tratada com tintura cores loiro (12.0) ou ruivo (6.66) foi determinada avaliando-se os parâmetros cor, tração à ruptura, penteabilidade, fricção, perda proteica, morfologia das cutículas e nível de melanina radical por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), sendo calculado o Fator de Proteção Radicalar (FPR). As mechas de cabelo tingidas foram expostas à radiação UV/Vis artificial (500 W/m^2) por até 180 h, sendo os parâmetros analisados antes e após o período de exposição. A nanoemulsão selecionada pelo reduzido IPD apresentava diâmetro médio de gotícula e potencial zeta iguais a $24,97 \pm 0,30 \text{ nm}$ e $19,6 \pm 2,19 \text{ mV}$, respectivamente. Na *Avaliação de Estabilidade Normal*, a nanoemulsão armazenada a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{ C}$ apresentou alterações significativas de todos os parâmetros avaliados, exceto potencial zeta, sendo que a elevação do diâmetro médio de gotícula acarretou em perda da transparência. A

RESUMO

oxidação da quercetina e a instabilidade do tipo *Ostwald ripening* (ω_3) foram as responsáveis pelas modificações observadas. No armazenamento a $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, a nanoemulsão manteve todos os parâmetros inalterados, mas a $25 \pm 2,0^\circ \text{C}$ houve elevação discreta do diâmetro médio de gotícula, sem perda da funcionalidade. A nanoemulsão apresentou elevada fotoestabilidade, sem alteração da atividade antioxidante após exposição ao UV/Vis. A caracterização da nanoemulsão mostrou que a eficiência de encapsulamento foi de 99,8%, no mínimo, a formulação apresentou típico comportamento newtoniano e as gotículas apresentavam formato esférico. As imagens obtidas por Microscopia Confocal de Fluorescência e o ensaio de Análise térmica mostraram que a quercetina se encontra dentro das gotícula atuando, também, como co-tensoativo, por interagir com os tensoativos, além de exercer sua função antioxidante. A nanoemulsão foi classificada como levemente irritante (método HET-CAM), sendo esse baixo potencial de irritação corroborado pelo teste de biocompatibilidade cutânea. Na avaliação de eficácia, observou-se que a nanoemulsão protegeu a cor total (dE^*) do cabelo tingido de loiro em 54%, e elevou a alteração da cor do cabelo tingido de ruivo em 47% ($t = 180 \text{ h}$) em comparação à mecha controle. Além disso, a nanoemulsão melhorou a penteabilidade e reduziu os coeficientes de fricção. A radiação UV/Vis provocou elevada perda proteica e redução da espessura das cutículas em aproximadamente 50%. Concluiu-se, pelos resultados obtidos, que as moléculas que compoem a tintura capilar, principalmente os pigmentos mais escuros, atuaram como filtros solares, pois elas protegeram as estruturas proteicas da fibra. A nanoemulsão apresentou FPR igual a 3,31 e 4,14, para as mechas tingidas de loiro e ruivo, respectivamente. O FPR indica a capacidade de uma formulação em reduzir o nível de radicais livres formados por indução da radiação UV/Vis, um dos fatores que induzem alterações na fibra capilar tingida. Assim, considerando que a radiação UV/Vis atua tanto por mecanismos diretos quanto indiretos, e que alterações significativas de cor foram observadas mesmo quando o nível de radicais livres foi reduzido pela ação da quercetina, deve ser incorporada à formulação fotoprotetora capilar filtros solares associados a antioxidantes nanoestruturados. Tais filtros devem ficar aderidos à cutícula, de modo a protegê-la da degradação proteica e reduzir a entrada de radiação para o interior da fibra capilar, local onde os antioxidantes nanoestruturados devem atuar como uma segunda linha de defesa.

Palavras-chave: condicionador, nanoemulsão, cabelo, oxidação, radiação ultravioleta.

ABSTRACT

DARIO, M.F. **Development and evaluation of the effectiveness of bioactive cationic nanoemulsion in protecting hair photo-oxidative damage.** 2016. 187f. Thesis (Ph.D.) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2016.

The solar radiation, comprising ultraviolet (UV), visible (VIS) and infrared, is responsible for accelerating color and protein content changes in the hair fiber. In order to avoid this problem, this work proposes the incorporation of the flavonoid quercetin, a recognized antioxidant molecule, in a cationic nanoemulsion for hair application. For this, formulations containing quercetin 0.5% (w/w) were developed by the low-energy sub-PIT method. The formulation with a lower polydispersity index (PDI), which had HLB value (Hydrophilic-Lipophilic Balance) equal to 12.5 was selected and subjected to the *Normal Stability Test*. In this assay, the nanoemulsion was stored under different temperature conditions for 90 days, and the following parameters were analyzed: organoleptic properties, pH, antioxidant activity, quercetin content, average droplet diameter and zeta potential. The photostability of the nanoemulsion involved the determination of the absorption profile and its antioxidant activity after periods of exposure to UV/Vis radiation. Subsequently, the nanoemulsion was characterized according to the following parameters: encapsulation efficiency, rheological profile, morphology of the droplets by Cryogenic Transmission Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy (AFM). The possible interaction between quercetin and other surfactants present in the nanoemulsion was evaluated by Confocal Fluorescence Microscopy and thermal analysis. The safety of the nanoemulsion was assessed by the in vitro HET-CAM method and by cutaneous biocompatibility in volunteers. The photoprotection effectiveness of the bioactive cationic nanoemulsion was evaluated in blond (color 12.0) and auburn (color 6.66) dyed hair fibers by assessing the parameters: color, tensile break, combing, friction, protein loss, morphology of cuticles and level of melanin radical by Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy (EPR). The Radical Hair Protection Factor (RHF) was calculated. Dyed hair tresses were exposed to UV/Vis artificial radiation (500 W/m^2) for 180 h. The parameters were analyzed before and after the exposure period. The nanoemulsion selected due to its reduced PDI had an average droplet diameter and zeta potential equal to $24.97 \pm 0.30 \text{ nm}$ and $19.6 \pm 2.19 \text{ mV}$, respectively. In the *Normal Stability Test*, the nanoemulsion stored at $45.0 \pm 2.0^\circ \text{ C}$ showed significant changes in all parameters except zeta potential, and the increase in the average droplet diameter resulted in the loss of transparency. Oxidation of quercetin and *Ostwald ripening* instability (ω_3) were responsible for the changes. At $5.0 \pm 2.0^\circ \text{ C}$,

ABSTRACT

the nanoemulsion kept all parameters unchanged, but at $25.0\pm 2.0^\circ\text{C}$ there was a slight increase in the average droplet diameter without loss of functionality. The nanoemulsion showed high photostability since antioxidant activity was not altered after UV/Vis exposure. The characterization of the nanoemulsion showed that the encapsulation efficiency was 99.8% at least, the formulation showed typical Newtonian behavior and droplets were spherical. The images obtained by Confocal Fluorescence Microscopy and thermal analysis showed that quercetin was within the droplet acting, also, as a cosurfactant, due to the interaction with the surfactants. The nanoemulsion was classified as slightly irritating (HET-CAM method), and this low irritation potential was supported by the cutaneous biocompatibility assay. The photoprotective effectiveness evaluation showed that the nanoemulsion protected the total color (dE^*) of blond dyed hair in 54%, but raised the color change of auburn dyed hair in 47% ($t = 180$ h). In addition, the nanoemulsion improved combability and reduced coefficients of friction. UV/Vis radiation caused high protein loss and reduced cuticle thickness by approximately 50%. It was concluded that the molecules that compose hair dye, especially the darker pigments, acted as sun filters because they protected the protein structures of the hair fiber. The nanoemulsion showed RHF equal to 3.31 and 4.14 for blond and auburn dyed hair, respectively. The RHF indicates the ability of a formulation to reduce the level of free radicals formed by UV/Vis induction, one of the factors that induce changes in the dyed hair fibers. Thus, considering that the UV/Vis radiation acts by direct and indirect mechanisms and that significant changes in color were observed even when the level of free radicals has been reduced by the quercetin, chemical filters should be incorporated into hair formulations associated with nanostructured antioxidants in order to fully protect hair fiber. Such filters must be attached to the cuticle, protecting it from protein degradation and reducing the radiation input into the hair fiber, where the nanostructured antioxidants must act as a second line of defense.

Key-words: conditioner, nanoemulsion, hair, oxidation, ultraviolet radiation

LISTA DE ABREVIATURAS

18-MEA - Ácido 18-metil-eicosanoico

A/O - Emulsão água em óleo

AA - Teor de aminoácidos

ABIHPEC - Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

AFM - Microscopia de Força Atômica

CCTA - Cloreto de cetil trimetil amônio

CMC - Complexo da membrana celular

COF - Coeficiente de fricção

Cryo-TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica

D - Dose de radiação

da^* - Diferença de cor na coordenada verde-vermelho

db^* - Diferença de cor na coordenada azul-amarelo

dE^* - Parâmetro de variação de cor total

dL^* - Parâmetro que representa a diferença no parâmetro claro-escuro

DLS - Dynamic Light Scattering

DPPH- 2,2-difenil-1-picrilidrazila

DPR - Desvio padrão relativo

DSC - Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)

EE - Eficiência de encapsulamento

EHL - Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo

EPI - Inversão de fase por alteração da fração volumétrica

EPR - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FI - Filamento intermediário

FPR - Fator de Proteção Radicalar (RHF - Radical Hair Protection Factor)

FPS - Fator de Proteção Solar

HET-CAM - Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane

HOPG - Superfície de grafite altamente orientado

I - Irradiância

LISTA DE ABREVIATURAS

ICCVAM - Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods

INCI - International Nomenclature of Cosmetic Ingredient

IPD - Índice de polidispersão

IS - Índice de irritação ocular

IV - Radiação infravermelha

KAP - Proteínas associadas à queratina

LOD - Limite de detecção

LOQ - Limite de quantificação

LSW - Lifitsitz, Slesov e Wagner

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MM - Massa molar

O/A - Emulsão óleo em água

PI - Ponto isoelétrico

PIT - Temperatura de Inversão de Fase

PMMA - Polimetilmetacrilato

SCCS - Scientific Committee on Consumer Safety

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SRL - Porcentagem de sequestro de radicais livres

T - Temperatura

t - Tempo

T_{cb} - Clearing Boundary Temperature

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Trp - Triptofano

UR - Umidade relativa

UV - Radiação ultravioleta

VIS - Radiação visível

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão das nanoemulsões	93
Tabela 2. Constantes de <i>Ostwald ripening</i> para a nanoemulsão catiônica armazenada em diferentes condições de temperatura	100
Tabela 3. Potencial zeta (mV) da nanoemulsão catiônica nas diferentes temperaturas de armazenamento	101
Tabela 4. Valores de pH (n = 3) nas diversas condições estudadas na <i>Avaliação de Estabilidade Normal</i>	102
Tabela 5. Dados utilizados para construção da curva analítica de Trolox [®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%)	104
Tabela 6. Atividade antioxidante da nanoemulsão catiônica equivalente em concentração de Trolox [®] ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{L nanoemulsão}$) (n=3)	106
Tabela 7. Absorbâncias médias (n = 6) a 429nm para elaboração da curva analítica, utilizando padrão secundário de quercetina (teor de pureza 100,0%)	107
Tabela 8. Concentrações de quercetina ($\mu\text{g/mL}$) nas nanoemulsões formuladas com 0,5% p/p de quercetina (teor de pureza = 91%) para cálculo de precisão intra-dia e inter-dia.....	109
Tabela 9. Exatidão do método de quantificação de quercetina na nanoemulsão (triplicata de leitura).....	110
Tabela 10. Absorbâncias a 429 nm da formulação base (sem adição de quercetina) ..	110
Tabela 11. Porcentagem de quercetina na nanoemulsão (p/p) avaliados em 90 dias de armazenamento, em diferentes condições de temperatura (n = 3)	111
Tabela 12. Classificação do potencial de irritação ocular – HET-CAM - da nanoemulsão catiônica e formulação base	120
Tabela 13. Quadro-resumo dos ensaios de avaliação de eficácia realizados e seus resultados.....	144

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Composição de aminoácidos da fibra capilar total, córtex e cutícula ($\mu\text{mol/g}$) (POPESCU; HOCKER, 2007)	41
Quadro 2. Efeito das diferentes faixas e parâmetros de radiação na fibra capilar (continua).....	51
Quadro 3. Valores de pKa da quercetina obtidos da literatura	58
Quadro 4. Fórmulas estruturais dos tensoativos não-iônicos e catiônico utilizados (CHEMICAL BOOK, 2016). *INCI: <i>International Nomenclature of Cosmetic Ingredient</i>	70
Quadro 5. Classificação do potencial de irritação ocular (KALWEIT et al., 1990)	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura da fibra capilar, ilustrando as subestruturas do córtex e da cutícula (ROBBINS, 2012).....	34
Figura 2. Detalhe das camadas que compõem a cutícula (FEUGHELMAN, 1997)	35
Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão de secção longitudinal de cabelo (WOLFRAM, 2003)	36
Figura 4. Esquema da estrutura hierárquica da fibra capilar, desde a α -hélice, dímeros em estrutura helicoidal, microfibrilas, macrofibrilas, célula cortical e fibra de cabelo (NEMETH, 2007)	37
Figura 5. Representação esquemática da estrutura de um filamento intermediário (LEWIS; RIPPON, 2013).....	38
Figura 6. Resíduos de aminoácidos (abcdefg) de um segmento de filamentos intermediários de α -hélice, sendo <i>a</i> e <i>d</i> resíduos hidrofóbicos (POPESCU; HOCKER, 2007)	38
Figura 7. Ligações dissulfídicas, iônicas, hidrofóbicas, peptídicas e de hidrogênio observadas entre duas α -hélices, para formação das microfibrilas (POPESCU; HOCKER, 2007).....	39
Figura 8. Rotas de síntese de eumelanina e feomelanina a partir de tirosina (MALATHI; THAPPA, 2013)	42
Figura 9. Estrutura química da eumelanina (A) e feomelanina (B). As setas indicam a continuação da estrutura do polímero (ITO; WAKAMATSU, 2008)	42
Figura 10. Mecanismo de coloração temporária (PINHEIRO et al., 2002).....	43
Figura 11. Mecanismo de coloração semi-permanente (PINHEIRO et al., 2002).....	44
Figura 12. Mecanismo de coloração permanente (PINHEIRO et al., 2002).....	45
Figura 13. Danos estruturais causados pela radiação e alteração de cor em função da dose de radiação (LOCKE; JACHOWICZ, 2005)	49
Figura 14. Fórmula estrutural do flavonoide quercetina (LEMANSKA et al., 2001)...	57
Figura 15. Estrutura de uma 3-hidroxifavona neutra (I); cátion radical (II); forma tautomérica estável (III) (LEMANSKA et al., 2001)	59
Figura 16. Ligação de hidrogênio intramolecular formada no grupo catecol após reação com uma ERO (LUCARINI; PEDULLI, 2010).....	59
Figura 17. Sequestro de um radical livre por flavonoides (PIETTA, 2000)	60
Figura 18. Sítios de ligação de metais (PIETTA, 2000)	60
Figura 19. Estruturas organizadas que podem ser visualizadas em microemulsões (MCCLEMENTS, 2012).....	62

Figura 20. Emulsões obtidas com diferentes concentrações do tensoativo polietilenoglicol perfluoroalquilado com a fase oleosa brometo de perfluorooctila (BPFO). Representação da classificação de Winsor. (A) Winsor I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada); (B) <i>Winsor III</i> (fase emulsionada em equilíbrio com a fase aquosa e fase oleosa); (C) <i>Winsor II</i> (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada); (D) <i>Winsor IV</i> (emulsão homogênea); (E) <i>Microemulsão</i> (OLIVEIRA et al., 2004).....	64
Figura 21. Representação das fases Winsor: I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada); III (fase emulsionada em equilíbrio com a fase aquosa e fase oleosa); II (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada); IV (emulsão homogênea) (MOULIK; PAUL, 1998).....	64
Figura 22. Fotografia dos principais estados observados para uma amostra sob agitação e aquecimento. Observa-se a fase de transição entre Winsor I e Winsor II, denominada <i>Clearing Boundary</i> (ROGER; CABANE; OLSSON, 2010)	65
Figura 23. Fórmulas estruturais dos <i>complexos I e II</i> formados entre quercetina e alumínio, em diferentes condições experimentais (CORNARD; MERLIN, 2002)	75
Figura 24. Irradiância espectral do filtro <i>UV special glass</i> utilizado no simulador solar Suntest® CPS+ (ATLAS, 2016).....	79
Figura 25. Equipamentos para realização do teste HET-CAM. (A) Incubadora de ovos; (B) Câmera digital	83
Figura 26. HET-CAM. (A) Abertura realizada na casca do ovo; (B) Imagem da membrana corioalantoide após procedimento de hidratação com solução fisiológica; (C) Focalização na membrana corioalantoide para gravação dos eventos vasculares	83
Figura 27. Aspecto das nanoemulsões desenvolvidas contendo quercetina (0,5% p/p) 48 h após o preparo	92
Figura 28. Distribuições de diâmetro por intensidade (A), número (B) e volume (C) da nanoemulsão Q6	94
Figura 29. Distribuição de potencial zeta da nanoemulsão catiônica (n=3)	95
Figura 30. Aspecto macroscópico da formulação base (A) e nanoemulsão catiônica (B)	95
Figura 31. Aspecto da nanoemulsão catiônica após 90 dias de armazenamento nas diferentes condições de temperatura.....	96
Figura 32. Diâmetro médio de gotícula (nm) da nanoemulsão catiônica nas diferentes temperaturas de armazenamento.....	97
Figura 33. Representação esquemática dos processos de desestabilização de emulsões (TAYLOR, 1998).....	98
Figura 34. Representação dos mecanismos de solubilização da fase oleosa (WEISS et al., 1997).....	99

Figura 35. Distribuição de tamanho por número da nanoemulsão catiônica armazenada a $45,0 \pm 2,0^\circ$ C, entre t_0 e t_{90} (dias)	99
Figura 36. Curva de absorção do radical livre estável DPPH· em etanol absoluto P.A.	103
Figura 37. Curva analítica de Trolox® padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres	104
Figura 38. Sequência de reações indicando a formação de espécies de quinona a partir da quercetina (TIMBOLA et al., 2006).....	106
Figura 39. Curva analítica média para quercetina padrão secundário (teor de pureza 100,0%) a partir das absorbâncias médias (n = 6) a 429 nm.....	108
Figura 40. Espectro de absorção (250 - 450 nm) da nanoemulsão exposta à doses crescentes de radiação UV/Vis (0 - $1,4 \text{ kJ/cm}^2$)	113
Figura 41. Atividade antioxidante equivalente em Trolox® (TEAC) da nanoemulsão exposta à doses crescentes de radiação UV/Vis (0 - $1,4 \text{ kJ/cm}^2$)	113
Figura 42. Caracterização reológica da nanoemulsão em diferentes temperaturas	115
Figura 43. Imagens obtidas por Cryo-TEM da nanoemulsão catiônica em resolução de (A) 200 nm e (B) 500 nm.....	115
Figura 44. Imagens topográficas por Microscopia de Força Atômica, 3D (A) e 2D (B), e uma seção transversal de uma superfície de HOPG (C) onde a nanoemulsão foi depositada e seca ao ar	116
Figura 45. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Fluorescência de formulações ($\lambda_{\text{exc}} = 458 \text{ nm}$). Nanoemulsão catiônica (A); Macroemulsão (B); Formulação base (C)	117
Figura 46. Curvas DSC para: (1) Oleth-20; (2) formulação base liofilizada; (3) nanoemulsão catiônica liofilizada; (4) mistura de todos os componentes usados para o preparo da nanoemulsão catiônica; (5) quercetina; (6) mistura de quercetina + oleth-20 (1:1); (7) mistura de oleth-20 + oleth-3 + CTAC (cloreto de cetil trimetil amônio) ...	118
Figura 47. Representação da interação entre os tensoativos oleth-20, oleth-3, cloreto de cetil trimetil amônio e a quercetina na interface óleo/água da nanoemulsão	119
Figura 48. Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da formulação base (sem adição de quercetina) sobre a membrana corioalantoide	120
Figura 49. Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da nanoemulsão catiônica sobre a membrana corioalantoide	120
Figura 50. Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da dispersão de SDS (1,0% p/v) - controle positivo - sobre a membrana corioalantoide.....	120

LISTA DE FIGURAS

- Figura 51.** Eritema, hidratação e perda de água transepidermal, antes e após aplicação da nanoemulsão catiônica (n = 12). Nenhuma amostra teve diferenças estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$) 122
- Figura 52.** Variação nos parâmetros de cor das mechas de cabelo tingidas de loiro após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n = 3); *p ≤ 0,05 123
- Figura 53.** Imagens das mechas de cabelo tingidas de loiro expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h 124
- Figura 54.** Variação nos parâmetros de cor das mechas de cabelo tingidas de ruivo após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n=3); *p ≤ 0,05 125
- Figura 55.** Imagens das mechas de cabelo tingidas de ruivo expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h 126
- Figura 56.** Tração à ruptura da fibra capilar após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n = 20)..... 127
- Figura 57.** Coeficiente de fricção contra (A) e a favor das cutículas (B) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, antes e após período de exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n=3); *p ≤ 0,05 129
- Figura 58.** Trabalho total para pentear (J) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, antes e após período de exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n = 3); *p ≤ 0,05..... 130
- Figura 59.** Perda proteica equivalente em albumina das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 90 ou 180 h 131
- Figura 60.** Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro..... 134
- Figura 61.** Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor ruivo 135
- Figura 62.** Espessura das cutículas de acordo com o perfil topográfico obtido por Microscopia de Força Atômica (AFM)..... 136
- Figura 63.** Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro..... 137
- Figura 64.** Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor ruivo 138
- Figura 65.** Espectros de EPR do cabelo tingido de loiro antes e após a exposição à radiação UV/Vis 140
- Figura 66.** Espectros de EPR do cabelo tingido de ruivo antes e após a exposição à radiação UV/Vis 141

LISTA DE FIGURAS

Figura 67. Variação no sinal de melanina radical das mechas tingidas de ruivo ou loiro tratadas ou não com a nanoemulsão catiônica bioativa 143

LISTA DE EQUAÇÕES

- Equação 1.** Constante de Ostwald ripening ω_3 , onde: r_N = raio médio da gotícula; t = tempo..... 73
- Equação 2.** Constante de Ostwald ripening ω_2 , onde: r_N = raio médio da gotícula; t = tempo..... 73
- Equação 3.** Cálculo do raio médio em termos de número (r_N), onde: r_I = raio médio de gotícula (r_I) em termos de espalhamento de luz, obtido pela técnica DLS (Dynamic Light Scattering) 73
- Equação 4.** Cálculo da Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres (%SRL), onde: A_c = absorbância do controle; A_m = absorbância da amostra 74
- Equação 5.** Cálculo da precisão, onde: DPR = desvio padrão relativo; s = desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica; \bar{X} = concentração média determinada de todas as amostras consideradas..... 77
- Equação 6.** Cálculo da exatidão, onde: $E(\%)$ = exatidão em porcentagem; CME = concentração média determinada experimentalmente; CMT = concentração média teórica de todas as amostras consideradas..... 77
- Equação 7.** Limite de quantificação, onde: σ = desvio padrão do intercepto; IC = inclinação da curva analítica 78
- Equação 8.** Limite de detecção, onde: σ = desvio padrão do intercepto; IC = inclinação da curva analítica 78
- Equação 9.** Eficiência de encapsulamento (EE), onde: $M(T)$ = quantidade total de quercetina na nanoemulsão; $M(f)$ = quantidade de quercetina livre na nanoemulsão 80
- Equação 10.** Cálculo da viscosidade (η), onde: τ = tensão de cisalhamento; γ = velocidade de cisalhamento..... 80
- Equação 11.** Índice de irritação ocular (IS), onde: H = tempo (s) para iniciar um evento hemorrágico; L = tempo (s) para iniciar uma lise vascular; C = tempo (s) para iniciar uma coagulação 83
- Equação 12.** Cálculo do dE^* = parâmetro de variação de cor total; dL^* = parâmetro que representa a diferença no parâmetro claro-escuro (0 para preto e 100 para branco); da^* = diferença de cor na coordenada verde-vermelho (positivo se mais vermelho e negativo se mais verde); db^* = diferença de cor na coordenada azul-amarelo (positivo se mais amarelo e negativo se mais azul). 87
- Equação 13.** Porcentagem de proteção (%), onde: dEB = variação total da cor de cabelos sem tratamento; dEA = variação total da cor de cabelos tratados com a nanoemulsão 87
- Equação 14.** Cálculo da Tração à ruptura 87
- Equação 15.** Cálculo do Fator de Proteção Radicalar (FPR) 90

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 16. Equação de reta que relaciona concentração de Trolox[®] e %SRL, onde: y = % Sequestro de radicais livres; x = concentração de Trolox[®] (μM), com $r^2 = 0,9988$, valor de acordo com a exigência da legislação (BRASIL, 2003)..... 104

Equação 17. Equação da curva analítica que correlaciona absorbância (y) e concentração (x) de quercetina ($\mu\text{g/mL}$), com $r^2 = 0,9954$ 108

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
3. REVISÃO DE LITERATURA	33
3.1 Fibra capilar	34
3.1.1 Morfologia	34
3.1.2 Composição química	40
3.1.3 Tintura capilar	43
3.1.4 Efeitos da radiação solar	46
3.1.5 Fotoproteção capilar	54
3.2 Quercetina	56
3.3 Nanotecnologia	61
3.3.1 Métodos de obtenção	62
4. MATERIAL E MÉTODOS	66
4.1 MATERIAL	67
4.2 MÉTODOS	69
4.2.1 Composição das formulações	69
4.2.2 Preparo das Formulações	71
4.2.3 Avaliação de Estabilidade Preliminar	71
4.2.4 Avaliação de Estabilidade Normal	72
4.2.4.1 Características organolépticas	72
4.2.4.2 Valor de pH	72
4.2.4.3 Diâmetro médio de gotícula e Potencial zeta	72
4.2.4.4 Atividade antioxidante	73
4.2.4.5 Conteúdo de quercetina	74
4.2.4.6 Avaliação dos resultados	78
4.2.5 Fotoestabilidade da nanoemulsão	78
4.2.5.1 Perfil de Absorção	79
4.2.5.2 Atividade Antioxidante	79
4.2.6 Caracterização da nanoemulsão	80
4.2.6.1 Eficiência de encapsulamento	80
4.2.6.2 Reologia	80

SUMÁRIO

4.2.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (Cryo-TEM).....	81
4.2.6.4 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	81
4.2.6.5 Microscopia Confocal de Fluorescência	81
4.2.6.6 Análise térmica	82
4.2.7 Avaliação do potencial de irritação ocular por método <i>in vitro</i> HET-CAM - <i>Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane</i>	82
4.2.8 Biocompatibilidade da nanoemulsão	84
4.2.9 Avaliação de eficácia da nanoemulsão.....	85
4.2.9.1 Amostras de cabelo	85
4.2.9.1.1 Pré-tratamento	85
4.2.9.1.2 Procedimentos de descoloração e tintura.....	85
4.2.9.2 Exposição à radiação solar artificial	86
4.2.9.3 Cor	86
4.2.9.4 Tração à ruptura.....	87
4.2.9.5 Penteabilidade.....	87
4.2.9.6 Fricção.....	88
4.2.9.7 Perda proteica	88
4.2.9.8 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	89
4.2.9.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	89
4.2.9.10 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	89
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
5.1 Obtenção das nanoemulsões	92
5.2 Avaliação de Estabilidade Preliminar.....	92
5.3 Avaliação de Estabilidade Normal	96
5.3.1 Características organolépticas.....	96
5.3.2 Diâmetro médio de gotícula.....	97
5.3.3 Potencial zeta	101
5.3.4 Potencial hidrogeniônico (pH).....	101
5.3.5 Atividade antioxidante	102
5.3.5.1 Determinação do $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do DPPH·	102
5.3.5.2 Curva analítica de Trolox [®] padrão de referência secundário	103
5.3.5.3 Atividade antioxidante da nanoemulsão	105
5.3.6 Conteúdo de quercetina	107
5.3.6.1 Validação do método de quantificação de quercetina	107

SUMÁRIO

5.3.6.2	Quantificação de quercetina na nanoemulsão catiônica	111
5.4	Fotoestabilidade da nanoemulsão	112
5.5	Caracterização da nanoemulsão catiônica	114
5.5.1	Eficiência de encapsulamento	114
5.5.2	Perfil reológico	114
5.5.3	Cryo-TEM	115
5.5.4	Microscopia de Força Atômica	116
5.5.5	Microscopia Confocal de Fluorescência	117
5.5.6	Análise térmica	118
5.6	Avaliação do potencial de irritação ocular por método <i>in vitro</i> – HET-CAM ...	119
5.7	Biocompatibilidade cutânea	121
5.8	Estudo de eficácia da nanoemulsão catiônica	122
5.8.1	Cor	122
5.8.2	Tração à ruptura	126
5.8.3	Penteabilidade e Fricção	127
5.8.4	Perda proteica	130
5.8.5	Microscopia de Força Atômica (AFM)	131
5.8.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	136
5.8.7	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)	139
5.8.8	Avaliação do estudo de eficácia da nanoemulsão catiônica	143
6.	CONCLUSÕES	147
7.	REFERÊNCIAS	151
ANEXO A	- Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado	166
ANEXO B	- Parecer da Comissão de Ética	167
ANEXO C	- Currículo Lattes	168
ANEXO D	- Ficha do Aluno	175
ANEXO E	- Produção científica na forma de artigo	178

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial de produtos para cabelos, que compreende principalmente xampus, condicionadores e tinturas capilares, movimentou cerca de US\$ 81 bilhões no ano de 2015 (STATISTA, 2016), atingindo a segunda colocação no *ranking* global (valor de venda), abaixo apenas dos cosméticos destinados à pele. As mulheres preocupam-se muito com a aparência dos cabelos, o que justifica o mercado cada vez mais ascendente, o grande volume de exportações e importações, e a importância de pesquisa na área, tanto por parte da indústria quanto pelo meio acadêmico. Segundo o Caderno de Tendências 2014-2015, publicado pela ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos), a venda de produtos para cabelos correspondeu a 21,6% do faturamento em 2012 e estima-se que o valor de consumo deverá aumentar 11,7% entre 2012 e 2017, sendo atualmente o maior mercado em valor no Brasil (ABIHPEC, 2013).

O investimento mundial em pesquisa e desenvolvimento de produtos nanotecnológicos vem crescendo substancialmente desde o ano 2000, sendo os europeus os maiores investidores na área, seguido pelos asiáticos e norte-americanos. Estima-se que o mercado mundial de produtos com base nanotecnológica atingirá US\$ 75,8 bilhões até 2020 (PRNEWSWIRE, 2015). O mercado global de produtos do tipo *drug delivery* de base nanotecnológica foi avaliado em US\$ 4,1 bilhões em 2014 e deverá alcançar US\$ 11,9 bilhões em 2023 (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2016). Portanto, o desenvolvimento de produtos com base nanotecnológica é fundamental e estratégico do ponto de vista de atuação no mercado internacional, incluindo o setor de cosméticos.

No Brasil, o investimento na área de nanotecnologia ainda é muito discreto, sendo que, de 2000 a 2007, o investimento na esfera federal alcançou apenas R\$ 195 milhões, o que representou 5% do total gasto em pesquisa no período (NANOTECH, 2009). Dentro deste panorama, a expectativa era de que o governo brasileiro investisse R\$ 300 milhões em 2014, dobrando o investimento realizado em 2013 (MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, 2014), porém não foram encontradas novas informações.

A indústria cosmética possui diversas patentes relacionadas à Nanotecnologia aplicada a fotoprotetores, condicionadores capilares, xampus, maquiagem, produtos pós-barba, hidratantes, desodorantes e perfumes. Porém, a pesquisa acadêmica aplicada ao estudo e desenvolvimento de produtos nanotecnológicos para aplicação em cabelos ainda é limitada, visto haverem poucos trabalhos publicados na área, o que demonstra a carência e necessidade de pesquisa científica nesse campo (NASIR, 2009; MU;

1. INTRODUÇÃO

SPRANDO, 2010). Dentro deste contexto, a fotoproteção capilar é um tema relevante, pois diversos pesquisadores demonstraram os efeitos negativos que a radiação solar em excesso pode provocar na fibra capilar.

A radiação solar altera negativamente as propriedades de cor, tanto de cabelos naturais como tingidos, por mecanismos pouco esclarecidos na literatura científica, sendo o mais aceito o efeito da radiação na indução da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, a princípio, são os responsáveis pela maioria das alterações observadas. Portanto, a utilização de substâncias antioxidantes poderia evitar ou diminuir muitos dos efeitos negativos da radiação solar sobre os cabelos (NOGUEIRA et al., 2007; CHEN et al., 2013; DARIO et al., 2013; RICHENA et al., 2014).

Atualmente, os antioxidantes de origem vegetal, principalmente os flavonoides, têm sido muito estudados em formulações cosméticas, devido a aspectos como segurança e eficácia. O flavonoide quercetina, muito consumido na dieta humana por estar presente em elevadas concentrações nos alimentos, será objeto de estudo neste trabalho por diversas razões, entre elas sua reconhecida atividade antioxidante. Sabe-se que a quercetina, derivado da rutina, age por três vias diferentes, o que amplia sua ação antioxidante, pois inibe a formação das ERO em três etapas: iniciação (pela interação com íons superóxidos), na formação de radicais hidroxila (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peróxido de lipídeos) (BEHLING et al., 2004).

Portanto, baseando-se no cenário mundial apresentado e nas características dos flavonoides, torna-se interessante e inovador o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados catiônicos contendo quercetina para aplicação em cabelos, visando à proteção de suas propriedades quando expostos à radiação ultravioleta.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver nanoemulsão catiônica estável contendo o flavonoide quercetina, em elevada proporção, por processo derivado do método de *Temperatura de Inversão de Fase* (PIT) e avaliar sua eficácia fotoprotetora (métodos físicos, físico-químicos e químicos) em mechas de cabelos tingidas de cor ruivo ou loiro expostas à radiação ultravioleta.

2.2 Objetivos Específicos

- Otimizar o método de obtenção da nanoemulsão catiônica, determinando o valor de EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) do sistema;
- Submeter a nanoemulsão aos ensaios de *Avaliação de Estabilidade Preliminar e Normal*, e Fotoestabilidade;
- Caracterizar a nanoemulsão de acordo com tamanho de gotícula, potencial zeta, eficiência de encapsulamento, perfil reológico e morfologia;
- Avaliar o perfil de segurança da nanoemulsão empregando método alternativo *in vitro* e método *in vivo*;
- Avaliar a eficácia da nanoemulsão na fotoproteção de mechas de cabelo tingidas, de cor ruivo ou loiro, quanto aos efeitos oxidativos da radiação ultravioleta.

3. REVISÃO DE LITERATURA

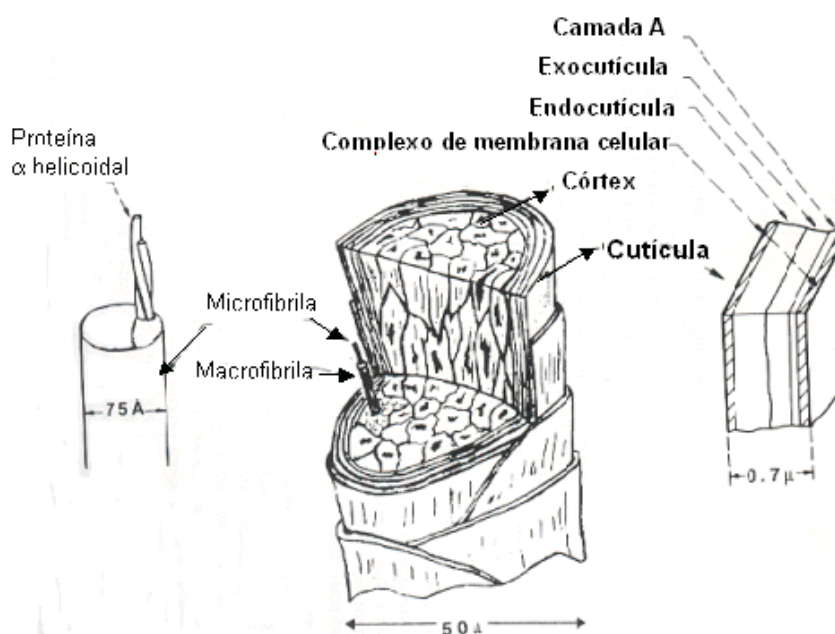
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Fibra capilar

3.1.1 Morfologia

O cabelo é constituído de quatro camadas (partes): cutícula, córtex, medula (pode estar presente ou não) e complexo da membrana celular (CMC) (WILKINSON; MOORE, 1990) (**Figura 1**). Produtos cosméticos como xampus, condicionadores, fotoprotetores, fixadores e estilizantes, nas diversas formas de apresentação, depositam-se na cutícula, componente responsável pelo aspecto visual e propriedades táteis da fibra capilar (HALAL, 2009).

Figura 1. Esquema da estrutura da fibra capilar, ilustrando as subestruturas do córtex e da cutícula (ROBBINS, 2012)



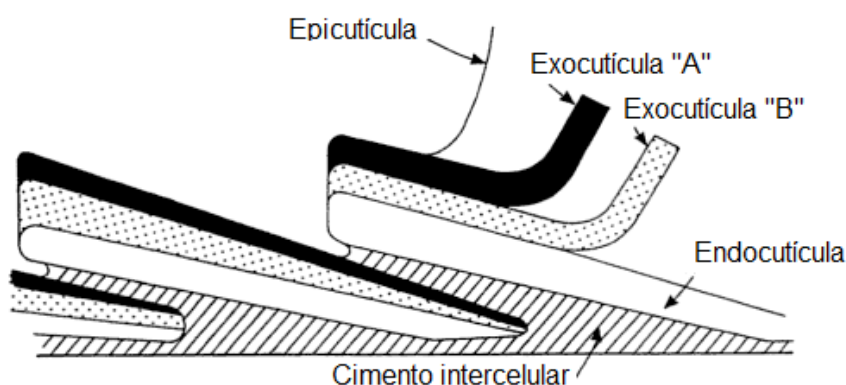
A *cutícula* é constituída por uma camada de células planas, cornificadas, sobrepostas, despigmentadas, tipo escama, que se organizam de maneira semelhante às “telhas de um telhado”, formando placas longas e finas, com 0,3 a 0,5 μm de espessura e 45 μm de largura, com 6-10 camadas de células. Estas são formadas, basicamente, por queratina, proteína que têm a cisteína como principal aminoácido, responsável pelas pontes de dissulfeto (S-S), que formam a cistina relacionada com uma rede tridimensional com alta densidade de ligações cruzadas. Sua disposição, em camadas sobrepostas, garante ao cabelo certa resistência ao ataque de agentes químicos (coloração, alisantes químicos e permanentes) e reflexão da luz, responsável pelo brilho da fibra capilar (FEUGHELMAN, 1997; HALAL, 2009).

3. REVISÃO DA LITERATURA

A célula cuticular possui subcomponentes laminares intracelulares, responsáveis pela resistência da fibra química capilar, que podem ser divididos em epicutícula, *camada A* (também denominada exocutícula “A”), *exocutícula* (ou exocutícula “B”), *endocutícula*, como apresentado na **Figura 2**.

A *epicutícula*, também denominada *camada F*, é a camada mais externa da fibra capilar. É constituída por ácidos graxos, em particular o ácido 18-metil-eicosanoico (18-MEA) e uma matriz proteica. Os ácidos graxos localizados na epicutícula são responsáveis pelo comportamento repelente à água (hidrofóbico) da cutícula (POPESCU; HOCKER, 2007). Abaixo da epicutícula encontra-se a *camada A*, constituída por material amorfo rico em cistina (> 30%). Na sequência, observa-se a *exocutícula B*, que também possui elevada concentração de cistina (~15%), mas de estrutura diferente à observada na *camada A*. Anexo à *exocutícula B*, localiza-se a *endocutícula*, que contém restos de organelas celulares e pode ser degradada por enzimas proteolíticas. (FEUGHELMAN, 1997; HALAL, 2009).

Figura 2. Detalhe das camadas que compõem a cutícula (FEUGHELMAN, 1997)



O CMC é uma camada que une as células da cutícula ao córtex, sendo formado pelo cimento intercelular (**Figura 1** e **Figura 2**), também denominado *camada δ* (delta), em associação com as membranas das células cuticulares. O cimento intercelular apresenta, em sua composição, proteínas não-queratinosas com baixo conteúdo de enxofre e elevado de aminoácidos polares que devem interagir com a água presente no meio. Sua composição permite o transporte intercelular de substâncias para o interior da fibra capilar, principalmente macromoléculas (WEIGMANN; KAMATH, 1999).

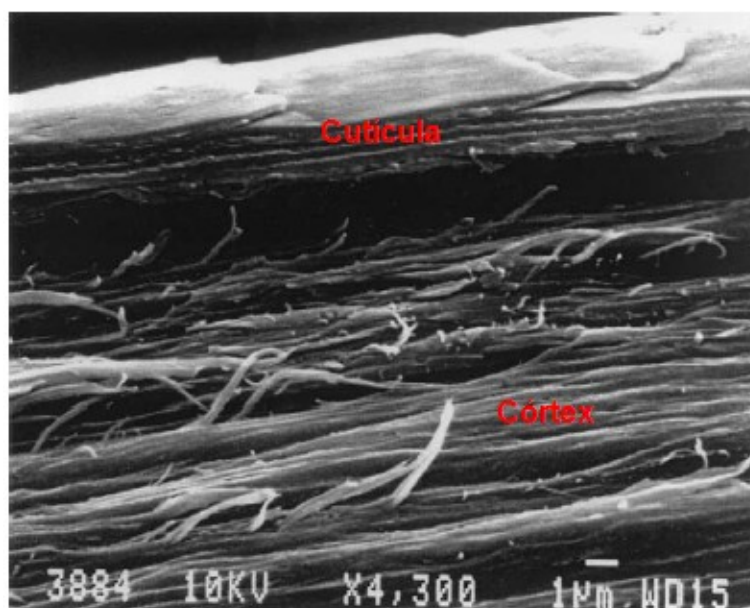
Há duas rotas preferenciais de penetração de substâncias para o interior da fibra capilar: transcelular e intercelular. A rota transcelular descreve uma via através de

3. REVISÃO DA LITERATURA

regiões da camada cuticular contendo baixo ou elevado conteúdo de enxofre. Esta via é importante especialmente para pequenas moléculas hidrofílicas. Uma via alternativa é a intercelular, por meio do CMC, utilizada por moléculas hidrofóbicas de elevado peso molecular ou moléculas apolares. Em geral, a difusão de moléculas para o córtex ocorre por uma combinação das duas rotas (KELCH et al., 2000).

O *córtex*, localizado abaixo da cutícula (**Figura 3**) ocupa a maior área do cabelo (75%), sendo formado de células corticais fusiformes contendo poucos micrômetros de secção transversal, que se orientam paralelamente à direção da fibra capilar. As células corticais são responsáveis pelas propriedades de resistência mecânica e elasticidade da fibra capilar, além de possuírem os grânulos de melanina em seu interior, o que confere as diferentes tonalidades de cor aos cabelos (WOLFRAM, 2003; HALAL, 2009).

Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão de secção longitudinal de cabelo (WOLFRAM, 2003)



Há três tipos de células corticais descritos: *ortocortical*, *mesocortical* e *paracortical*. As células *ortocorticais* apresentam baixa relação matriz/filamento intermediário (FI). Os FI arranjam-se na forma de espiral, possuem pouca proteína rica em cistina, ou seja, existem poucas ligações cruzadas e elevada proporção de proteínas ricas em tirosina, e são mais extensíveis e flexíveis. No entanto, as células *paracorticais* apresentam propriedades opostas às descritas para as células *ortocorticais*, com proteínas ricas em enxofre. No *mesocórtex*, as macrofibrilas organizam-se de maneira

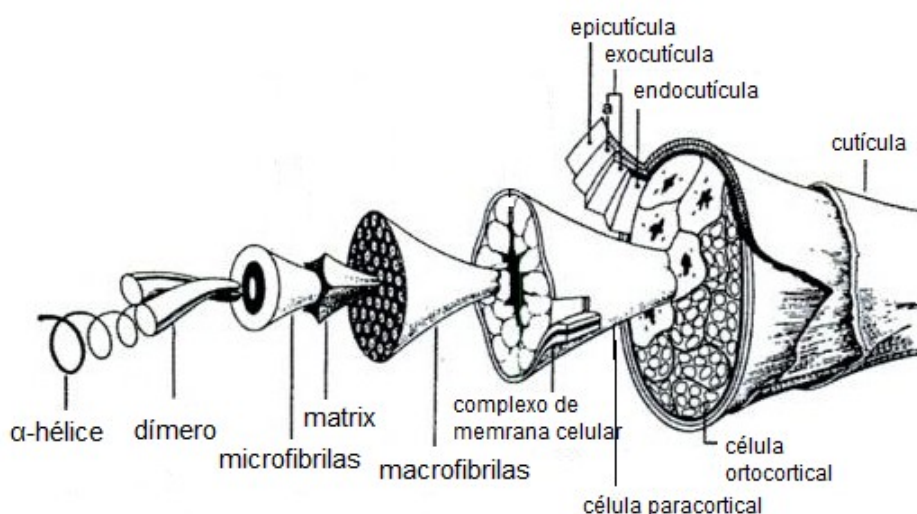
3. REVISÃO DA LITERATURA

hexagonal ou pseudo-hexagonal e apresentam razão matriz/FI intermediária à observada entre *ortocórtex* e *paracórtex* (ROBBINS, 2012).

O arranjo entre as células *orto* ou *paracorticais* são responsáveis pela curvatura do cabelo, de modo que o *ortocórtex* localiza-se na porção convexa enquanto o *paracórtex* predomina na região côncava de uma fibra encaracolada. Já os cabelos lisos apresentam uma região central em que predomina o *paracórtex*, circundada pelo *ortocórtex* (THIBAUT et al., 2007).

No interior das células corticais, os FI ou microfibrilas, agrupam-se em porções denominadas macrofibrilas (**Figura 4**). Estas unidades são cilíndricas e podem apresentar comprimento que varia entre 0,3 μm e a extensão da célula cortical (LEWIS; RIPPON, 2013). Dentro das macrofibrilas, uma matriz rica em cistina une as microfibrilas, de maneira que, quando as fibras de queratina são estendidas, a macrofibrila age como uma unidade mecânica única (FEUGHELMAN, 1997).

Figura 4. Esquema da estrutura hierárquica da fibra capilar, desde a α -hélice, dímeros em estrutura helicoidal, microfibrilas, macrofibrilas, célula cortical e fibra de cabelo (NEMETH, 2007)

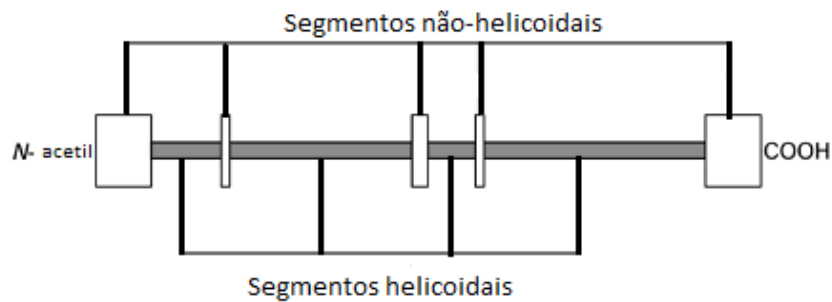


Os FI de queratina e as proteínas associadas à queratina (KAP) localizadas na matriz são as principais proteínas presentes na fibra capilar. Cada FI é composto por quatro domínios α -hélices separados por quatro regiões não-helicoidais, como apresentado na **Figura 5**. Dois FI formam pares de filamentos heteropoliméricos, dando origem à estrutura denominada α -queratina dura, por meio da interação entre as

3. REVISÃO DA LITERATURA

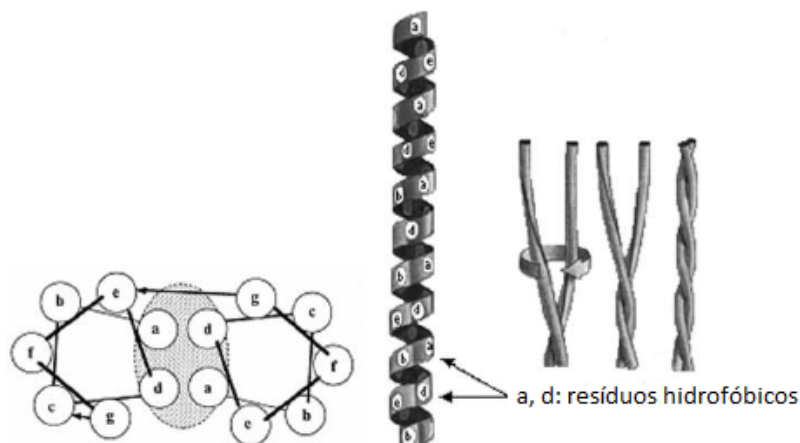
denominadas proteínas tipo I e II (DUNN et al., 1998; KREPLAK et al., 2004; LEWIS; RIPPON, 2013).

Figura 5. Representação esquemática da estrutura de um filamento intermediário (LEWIS; RIPPON, 2013)



Os segmentos helicoidais de um FI (compostos por 7 aminoácidos por volta) interagem com outro, formando uma α -hélice, por interações do tipo hidrofóbicas, uma vez que os resíduos hidrofóbicos dos aminoácidos localizam-se no interior da α -hélice (**Figura 6**) (POPESCU; HOCKER, 2007).

Figura 6. Resíduos de aminoácidos (abcdefg) de um segmento de filamentos intermediários de α -hélice, sendo *a* e *d* resíduos hidrofóbicos (POPESCU; HOCKER, 2007)

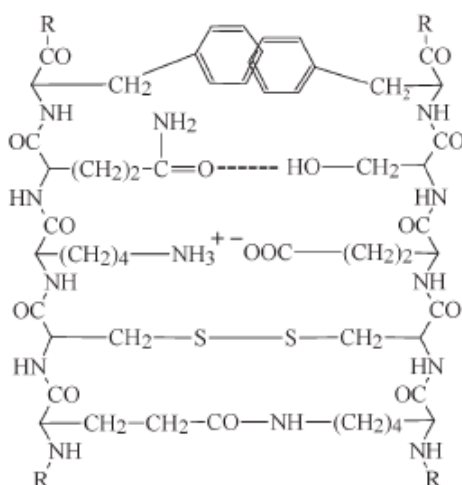


Os grupos laterais interagem uns com os outros, na formação das microfibrilas por meio de ligações dissulfídicas, iônicas, hidrofóbicas, peptídicas e de hidrogênio (**Figura 7**) formando uma estrutura semelhante a uma hélice. Estas proteínas de queratina são classificadas de acordo com seu ponto isoelétrico (PI), sendo as tipo I

3. REVISÃO DA LITERATURA

classificadas como ácidas (PI = 4,9 - 5,4) e as tipo II como neutras a básicas (PI = 6,5 - 8,5) (BRAGULLA; HOMBERGER, 2009). A fibra capilar por ser composta, também, pelas proteínas não-queratinizadas, apresenta PI que varia entre 2,45 - 3,17 (PARREIRA, 1980).

Figura 7. Ligações dissulfídicas, iônicas, hidrofóbicas, peptídicas e de hidrogênio observadas entre duas α -hélices, para formação das microfibrilas (POPESCU; HOCKER, 2007)



No córtex localizam-se os pigmentos naturais tipo melanina presentes na fibra capilar. A cor natural do cabelo é resultado do conteúdo total de melanina, diâmetro dos grânulos e da proporção dos dois tipos de biopolímeros pertencentes à família da melanina: *eumelanina* (polímero insolúvel que confere o tom negro-marrom) e *feomelanina* (polímero solúvel em meio alcalino que confere o tom amarelo-avermelhado). Esses pigmentos localizam-se dentro dos grânulos de melanina que se formam a partir dos melanócitos presentes na base do folículo piloso, liberados com o desenvolvimento da fibra capilar. As diferentes proporções desses dois pigmentos na fibra capilar, assim como o conteúdo total de melanina, garante ampla gama de cores naturais possíveis e encontradas na população (ROBBINS, 2012).

A *medula*, quando presente, localiza-se na região central da fibra capilar e contém elevada concentração de lipídeos, mas não possui função definida (FEUGHELMAN, 1997; VELASCO et al., 2009).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1.2 Composição química

A fibra capilar apresenta composição essencialmente proteica, devido à presença da proteína queratina com menor teor de enxofre (50-60 kDa) e as KAP, com maior teor de enxofre (10-25 kDa) (ROUSE; DYKE, 2010). Há dois tipos de queratina: mole e dura. A queratina mole é encontrada na pele, compondo, principalmente, o estrato córneo. No entanto, a queratina dura é encontrada na fibra capilar e unhas, sendo resistente à degradação por conter muitos resíduos de cisteína, que permite a formação das ligações de dissulfeto. As queratinas duras não se dissolvem em água e são altamente resistentes às enzimas proteolíticas. Nas células epidérmicas, a queratina representa 30% do peso da camada basal, alcançando 80% no estrato córneo, e 85% no fio de cabelo (TOBIN, 2006).

As fibras capilares livres de água consistem de, aproximadamente, 90-97% de proteínas e 2% de lipídeos, sendo o restante composto por ácidos nucleicos, carboidratos e substâncias inorgânicas. A análise elementar revela que a fibra possui, em massa, 50% de carbono, 7% de hidrogênio, 22% de oxigênio, 16% de nitrogênio e 5% de enxofre. A elevada porcentagem de enxofre resulta dos altos níveis de cistina (formado por ligações dissulfídicas entre dois aminoácidos cisteína, como apresentado na **Figura 7**). Esta característica difere a α -queratina de outras fibras proteicas, como o colágeno, por exemplo (POPESCU; HOCKER, 2007).

A cutícula geralmente apresenta abundante quantidade de resíduos cistina, o que explica a resistência desta camada aos agentes externos, enquanto o córtex tem menor quantidade deste aminoácido (**Quadro 1**). Na queratina, a maior parte dos resíduos cistina (> 95%) está envolvida em ligações dissulfídicas proporcionando resistência mecânica, química e propriedades elásticas (MARSHALL; ORWIN; GILLESPIE, 1991; POPESCU; HOCKER, 2007).

Em valores altos de pH observa-se o intumescimento das cutículas devido principalmente à ionização dos resíduos aminoácidos diacídicos (ácidos glutâmico e aspártico) e repulsão entre os elementos carregados negativamente. O ponto isoiónico (pH no qual cátions e ânions estão presentes em igual concentração) e o ponto isoelétrico (pH em que a mobilidade eletroforética é zero) são propriedades fundamentais em diversos tratamentos químicos, como tintura, descoloração e alisamento capilares (MOREL; CHRISTIE, 2011), que depende da composição da fibra. O ponto isoiónico do cabelo encontra-se em pH $5,8 \pm 1,0$ e o isoelétrico em pH entre 2,45 - 3,17 (PARREIRA, 1980), como citado anteriormente.

3. REVISÃO DA LITERATURA

Os lipídeos presentes na estrutura da fibra capilar são compostos principalmente de ácidos graxos, esteróis, ceramidas, triglicérides e glicolipídeos. Os ácidos graxos são, principalmente, do tipo saturado (C₁₄-C₂₄), em especial encontram-se os ácidos graxos palmítico e esteárico (MARSHALL; ORWIN; GILLESPIE, 1991).

Quadro 1. Composição de aminoácidos da fibra capilar total, córtex e cutícula (µmol/g) (POPESCU; HOCKER, 2007)

Aminoácido	Cabelo total	Córtex	Cutícula
Ácido cisteico	32	27	59
Ácido aspártico e asparagina	399	416	300
Treonina	544	580	412
Serina	967	850	1628
Ácido glutâmico e glutamina	916	930	848
Prolina	588	532	900
Glicina	437	368	836
Alanina	347	370	50
Valina	405	374	644
Meia-cistina	1435	1350	1880
Metionina	13	9	39
Isoleucina	174	172	186
Leucina	457	466	404
Tirosina	158	162	134
Fenilalanina	124	126	115
Lisina	196	172	331
Histidina	62	65	53
Arginina	466	496	289

Outro composto presente na fibra capilar são os pigmentos, formados por polímeros sintetizados a partir da tirosina, que é transformada em dopaquinona e, seguindo diferentes rotas de síntese, são transformados nos monômeros que se polimerizam para formar a feomelanina e eumelanina (**Figura 8 e 9**). A feomelanina confere ao cabelo cores que variam do amarelo ao vermelho, e a eumelanina, do preto ao marrom. Assim, a cor final da fibra capilar depende da proporção entre esses dois polímeros (POPESCU; HOCKER, 2007).

As melaninas agem como fotoprotetores naturais da fibra capilar por estarem presentes no córtex, protegendo a estrutura proteica e lipídica da oxidação. Porém, neste processo, elas se oxidam promovendo alteração de cor do cabelo virgem, causando principalmente sua descoloração (NOGUEIRA; JOEKES, 2004).

3. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 8. Rotas de síntese de eumelanina e feomelanina a partir de tirosina (MALATHI; THAPPA, 2013)

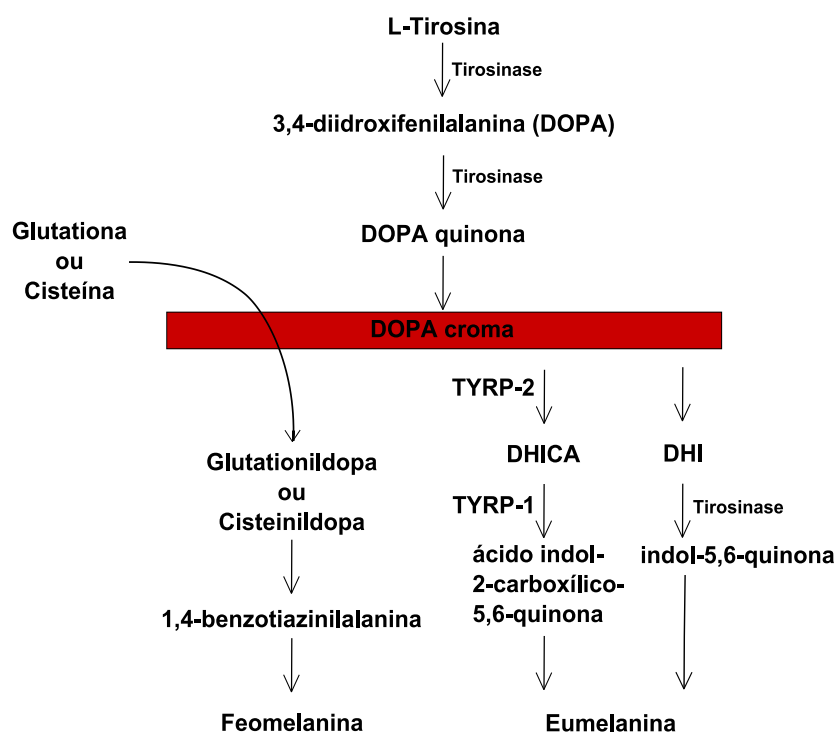
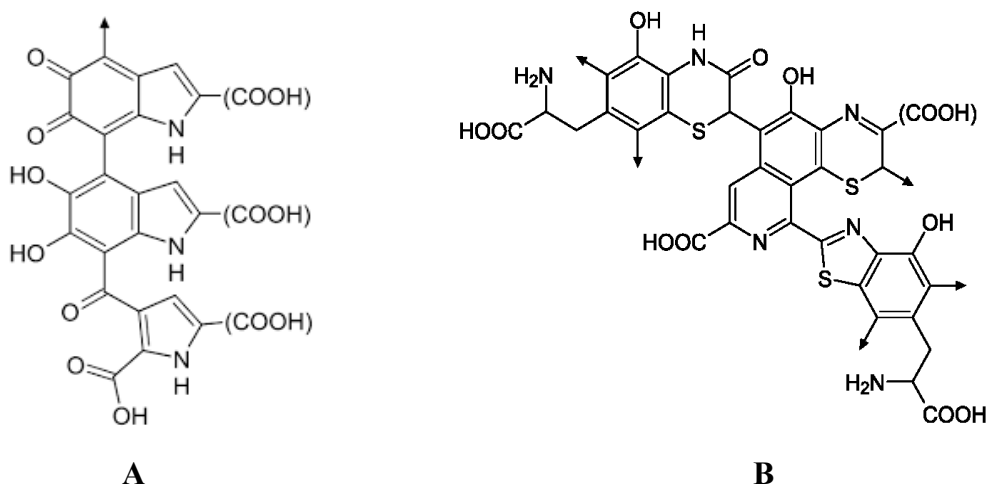


Figura 9. Estrutura química da eumelanina (A) e feomelanina (B). As setas indicam a continuação da estrutura do polímero (ITO; WAKAMATSU, 2008)

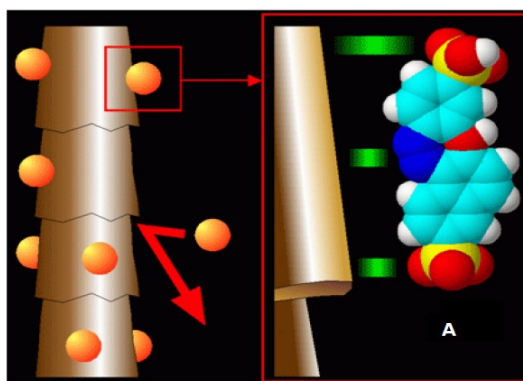


3.1.3 Tintura capilar

As tinturas capilares são muito utilizadas, principalmente pelo público feminino, com a finalidade de modificar a cor natural dos cabelos ou mascarar as alterações fisiológicas decorrentes de aspectos genéticos e/ou processo de envelhecimento. A coloração baseia-se em sistemas *temporários*, *semi-permanentes* ou *oxidativos* (Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics, 2012).

As *tinturas temporárias* são compostas por moléculas ácidas de elevado peso molecular, solúveis em água, e que não penetram a cutícula, mas se depositam nas camadas superficiais (**Figura 10**). Estas tinturas permanecem nos cabelos por no máximo uma semana, em função dos processos de lavagem, sendo utilizadas com a finalidade de adicionar nuances, remover tons amarelados de cabelos grisalhos e cobrir pequenas porções (menos de 15%) de cabelos brancos (MOREL; CHRISTIE, 2011).

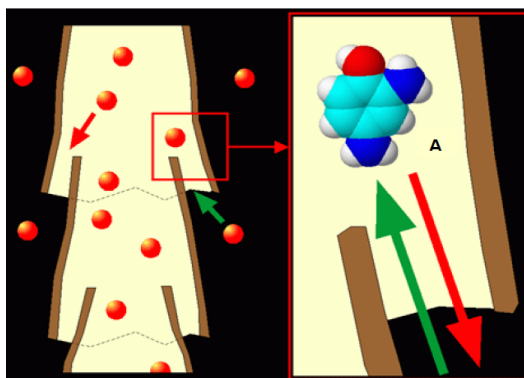
Figura 10. Mecanismo de coloração temporária (PINHEIRO et al., 2002)



Legenda: (A) Molécula do corante temporário adsorvida à superfície da fibra capilar

No sistema *semi-permanente*, o corante possui tamanho de molécula intermediário, sendo capaz de atravessar a cutícula e depositar-se no córtex (**Figura 11**). Neste caso, assim como no *sistema permanente*, é necessário promover a abertura das cutículas por meio de agentes alcalinizantes, para que o corante atinja o córtex. Apesar da penetração, as moléculas da tintura são removidas da fibra capilar mais facilmente, após oito a dez lavagens (PINHEIRO et al., 2002; LOCKE; JACHOWICZ, 2005).

3. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 11. Mecanismo de coloração semi-permanente (PINHEIRO et al., 2002)

Legenda: (A) Molécula do corante semi-permanente adsorvida à superfície da fibra capilar

As tinturas *oxidativas* são as mais utilizadas, sendo classificadas em sistemas *auto-oxidativo*, *demipermanente* ou *permanente* (HARRISON; SINCLAIR, 2003).

No sistema *auto-oxidativo* são utilizados compostos da classe dos triidroxibenzenos, diidroxianilinas e difenilaminas que se oxidam na presença do oxigênio atmosférico, sem a necessidade de adição de um agente oxidante, como o peróxido de hidrogênio. Porém, como este tipo de tintura altera a cor do cabelo de forma progressiva e não se encontra disponível em grande variedade de cores, não é muito utilizado (TOBIN, 2005).

A diferença entre os sistemas *permanente* e *demipermanente* está no tipo de agente alcalinizante e concentração de peróxido de hidrogênio, o que resulta em diferentes cores, capacidade de cobertura de fios brancos e de clareamento.

As tinturas *demipermanentes*, também denominadas *semi-permanentes de longa duração*, utilizam, geralmente, 2% de peróxido de hidrogênio e baixos níveis de alcalinizante (geralmente monoetanolamina, mas não hidróxido de amônio), não se depositando totalmente no córtex, devido à abertura parcial das cutículas. Esse tipo de tintura resiste, em geral, a 24 lavagens. São usadas para escurecer os cabelos naturais ou cobrir os cabelos brancos em até 50%, não apresentando capacidade de clarear efetivamente os fios (DRAELOS, 2010; Kirk-Othmer Chemical Technology of Cosmetics, 2012; FRANÇA et al., 2015).

As tinturas *permanentes* utilizam até 6% de peróxido de hidrogênio (20 volumes), apresentam valor de pH entre 9,0 - 10,5 devido à incorporação do hidróxido de amônio como agente alcalinizante. Isso propicia o clareamento dos cabelos e promove a abertura das cutículas em certo grau que permite que as moléculas de tintura atinjam o córtex efetivamente. Esta tintura permite cobertura total dos fios brancos,

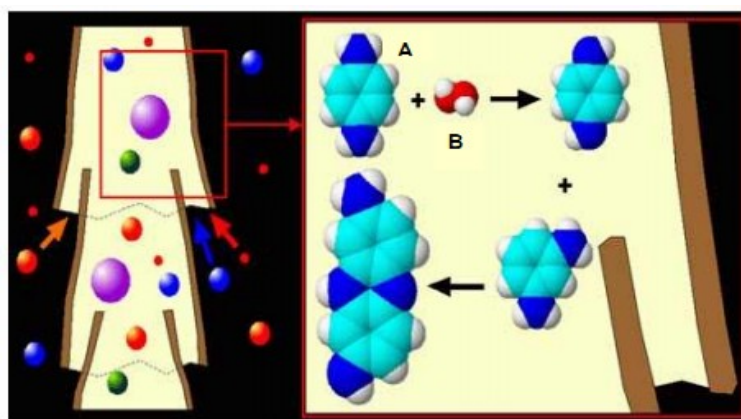
3. REVISÃO DA LITERATURA

sendo disponibilizada nas mais variadas cores e tonalidades (DRAELOS, 2010; FRANÇA et al., 2015).

Este sistema é o mais utilizado entre os sistemas oxidativos, baseia-se na reação de precursores, de baixa massa molar, dentro da fibra capilar, sob condições específicas. Neste sistema, são necessários três componentes: o intermediário primário (*p*-fenilenodiamina, *p*-aminofenol e seus derivados), o acoplador (geralmente um composto aromático contendo grupos doadores de elétrons em posição *meta*, como *m*-fenilenodiaminas, resorcinol, naftols e seus derivados), um agente oxidante (geralmente o peróxido de hidrogênio) e um alcalinizante (como hidróxido de amônio) (MOREL; CHRISTIE, 2011).

O precursor deve ter tamanho de molécula pequeno para penetrar na cutícula e atingir o córtex, onde deve ocorrer o processo de polimerização, a partir da reação com as moléculas acopladoras, de maneira que o pigmento formado deve ter massa molar suficientemente elevada para não deixar a fibra capilar com facilidade (**Figura 12**). O hidróxido de amônio, um dos componentes desse sistema, alcaliniza o meio em valor de pH 9,0 - 10,5 e age promovendo o intumescimento e abertura das cutículas, como citado anteriormente, facilitando a penetração dos precursores e do peróxido de hidrogênio. A alcalinização do meio propicia a reação de oxidação dos precursores, tornando-os efetivamente pigmentos de alta massa molar (FEUGHELMAN, 1997).

Figura 12. Mecanismo de coloração permanente (PINHEIRO et al., 2002)



Legenda: (A) corante de pequena massa molar que reage com o acoplador (B), em condições alcalinas, o que desencadeia a reação de polimerização do corante, originando um pigmento de elevada massa molar

Os sistemas de *coloração oxidativos*, devido ao seu mecanismo de ação, provocam danos à fibra capilar, principalmente à cutícula, podendo causar, inclusive,

3. REVISÃO DA LITERATURA

perda total dessa camada, desencadeando redução de maciez e brilho e aumento do esforço necessário para pentear (HARRISON; SINCLAIR, 2003).

A cor artificial dos cabelos pode ser alterada por procedimentos de lavagem, mas também, por efeito da radiação solar. Assim, torna-se necessário estudar os mecanismos de proteção da fibra capilar contra os efeitos deletérios da radiação solar com a finalidade de reduzir o número de reaplicações do produto na fibra capilar e/ou manter a cor original, evitando prejuízo nas características como penteabilidade, maciez, e conteúdo de proteínas provocado por reaplicações sucessivas de tintura capilar (AHN; LEE, 2002).

3.1.4 Efeitos da radiação solar

O espectro eletromagnético compreende uma ampla faixa de frequências, e a tecnologia atualmente disponível permite gerar ou detectar radiação eletromagnética com frequência que se estende de 1 a 1024 Hz. Porém, apenas parte desse espectro é emitida pelo sol e atinge a superfície terrestre, compreendendo parte da radiação ultravioleta (UV) (280-400 nm), radiação visível (Vis) (400-700 nm) e infravermelha (IV) (750-2800 nm). A radiação UV pode ser subdividida em três faixas, de acordo com o comprimento de onda: UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) e UVC (100-280 nm). A camada de ozônio é capaz de bloquear a entrada da radiação UVC, permitindo a passagem de 1 - 10% da UVB e 90 - 99% da UVA (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010; SCHUCH et al., 2013).

A radiação UVB possui a capacidade de penetrar aproximadamente 5 μm na fibra capilar, sendo que a intensidade decai abaixo disto. Assim, considerando que as cutículas do cabelo intacto possuem de 6 - 10 camadas, cada uma com 0,3 - 0,5 μm , esta radiação não é capaz de atingir integralmente o córtex, mas pode causar alterações estruturais nas cutículas, ao contrário da radiação UVA, que atinge o córtex profundamente (JEON; PI; LEE, 2008).

Muito se discute sobre os efeitos da radiação UV nas fibras capilares, porém não há consenso na literatura em relação aos efeitos particulares das diferentes faixas de radiação (UVA, UVB, visível e IV) nas características da fibra capilar.

O primeiro evento que ocorre no cabelo quando se inicia a exposição à radiação solar é a absorção de luz pela fibra. Como os cromóforos mais significativos das proteínas (aminoácidos triptofano e tirosina e as ligações de dissulfeto presentes entre as cisteínas) absorvem na faixa do UVB, os comprimentos de ondas na faixa do UVA e

3. REVISÃO DA LITERATURA

visível não deveriam causar danos diretos às proteínas. Dentre todos os cromóforos presentes na queratina somente o triptofano absorve significativamente no UVB e, portanto, apresenta maiores chances de ser fotolábil (PANDE; JACHOWICZ, 1993). Devido a essa característica, o triptofano pode ser utilizado como marcador de fotodegradação da fibra capilar, principalmente da cutícula, mas também do córtex (DYER et al., 2010; FERNANDEZ et al., 2012a).

O efeito mais importante da radiação solar é a redução da resistência mecânica da fibra capilar, devido à quebra das ligações dissulfídicas (DRAELOS, 2006). Porém, visualmente, a alteração de cor dos cabelos é mais facilmente percebida como resultado de reações foto-oxidativas tanto em cabelos naturais quanto em tingidos, por meio da indução da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Tais moléculas estão associadas à produção de oximelanina a partir da melanina, assim como à oxidação dos pigmentos artificiais (presentes nas tinturas) (QU; KIRSCHENBAUM; BORISH, 2000; LOCKE; JACHOWICZ, 2005).

A melanina, principalmente em baixos comprimentos de onda, promove certa proteção fotoquímica às proteínas presentes no córtex da fibra capilar absorvendo, filtrando e dissipando a energia sob a forma de calor. Sua capacidade de absorção de energia relaciona-se à presença de grupos carbonila conjugados e duplas ligações, propriedade observada também nos filtros solares químicos (NOGUEIRA; JOEKES, 2004). Além de reter parte da radiação, as melaninas imobilizam muitos radicais livres formados durante a exposição à radiação UV, como O_2^- e H_2O_2 , evitando o transporte destas ERO até a matriz queratinizada. Porém, durante esse processo, os pigmentos (eumelanina ou feomelanina) são oxidados (HOTING; ZIMMERMANN; HOCKER, 1995; NOGUEIRA; JOEKES, 2004).

Os cabelos brancos ou grisalhos, devido à ausência ou reduzida quantidade de melanina, respectivamente, são mais susceptíveis aos danos causados pela radiação UV, apresentando maior taxa de quebra de ligações dissulfídicas e, conseqüentemente, menor resistência mecânica (DRAELOS, 2006), sendo os que mais necessitam de fotoproteção.

Os cabelos negros possuem maior quantidade de eumelanina em relação à feomelanina, ao contrário dos cabelos castanho-claros, que apresentam quantidade considerável de feomelanina, e dos cabelos loiros que possuem pequenas quantidades de eumelanina. Devido às variadas quantidades relativas dos dois pigmentos nos cabelos, o efeito das radiações também pode ser diferente. Hoting e colaboradores demonstraram

3. REVISÃO DA LITERATURA

que os cabelos negros têm sua cor alterada (são clareados) quando expostos à radiação visível ou total (UVA + UVB + visível + IV) (HOTING; ZIMMERMANN; HOCKER, 1995). Porém mechas castanho-claras, que apresentam menor proporção de eumelanina que os cabelos negros, são alteradas por todos os tipos de radiação, exceto IV, e particularmente por UVA e visível. Isso indica que a eumelanina possui maior fotoestabilidade em relação à feomelanina, provavelmente devido ao grupo quinona presente na estrutura deste polímero.

Segundo Wakamatsu e colaboradores, a radiação UVA é a maior responsável pela produção das ERO, que se relacionam à oxidação da porção indolquinona da eumelanina e conversão da porção benzotiazina da feomelanina a benzotiazol (WAKAMATSU et al., 2012). Essas alterações estruturais, principalmente as ocorridas na eumelanina, são responsáveis pelo fenômeno de foto-clareamento observado nos cabelos naturais expostos à radiação solar. Essas ERO são geradas pela reação entre o oxigênio molecular (O₂) e a melanina radical (formada após a interação da melanina com radiação UV-Vis). Esta reação, assim como outras que ocorrem em sequência (reações em cadeia), são apresentadas nas *reações 1 a 3* (QU; KIRSCHENBAUM; BORISH, 2000).



Legenda: **h** = constante de Planck; **v** = frequência da radiação

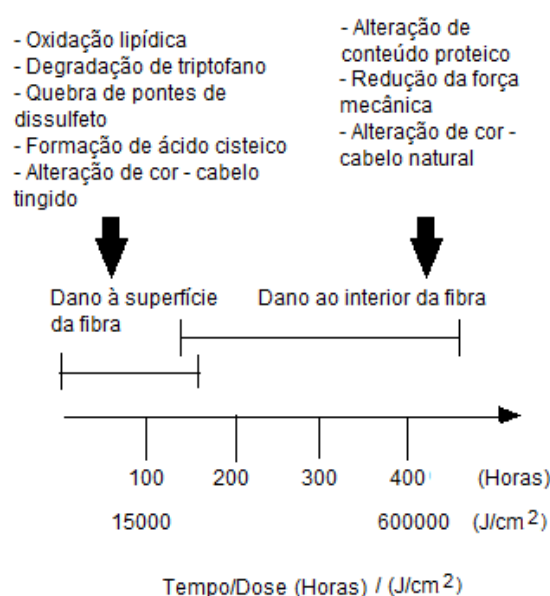
Porém, segundo Signori (2004), a radiação visível é a maior responsável pela modificação da cor natural da fibra capilar, por promover a degradação dos grânulos de melanina, enquanto a radiação UV causa alterações nas proteínas presentes, o que afetaria as propriedades mecânicas (SIGNORI, 2004). Segundo Fernández e colaboradores, a radiação UVA promove a geração de ERO, enquanto a UVB degrada os pigmentos de melanina e modifica as propriedades mecânicas, pois promove a quebra das ligações dissulfídicas de cistina presentes na queratina, o que enfraquece a fibra capilar (FERNANDEZ et al., 2012b).

Portanto, sabe-se que a radiação solar provoca danos à fibra capilar, alterando negativamente suas características de cor, conteúdo proteico e, conseqüentemente, afeta

3. REVISÃO DA LITERATURA

suas propriedades mecânicas, como tração à ruptura e elasticidade. Porém, as alterações de cor são mais perceptíveis na fibra capilar tingida pois a dose de radiação necessária para promover esse efeito é cerca de 20 vezes menor que a requerida pela fibra natural, já que a melanina é uma substância fotoprotetora (**Figura 13**). Além disso, os tons de tinteira vermelhos (ruivos claros, médios e intensos) são os que apresentam as alterações de cor mais pronunciadas (LOCKE; JACHOWICZ, 2005).

Figura 13. Danos estruturais causados pela radiação e alteração de cor em função da dose de radiação (LOCKE; JACHOWICZ, 2005)



Segundo Locke & Jachowicz (2005), cabelos brancos submetidos à tinteira (tom ruivo) apresentaram maiores alterações de cor que os castanhos descoloridos que, por sua vez, apresentaram maiores danos que cabelos naturais tom castanho, quando expostos à radiação solar artificial (LOCKE; JACHOWICZ, 2005). Este fato ocorreu pela presença de melanina com ação fotoprotetora nos cabelos pouco descoloridos ou naturais, em relação aos cabelos brancos, que apresentam reduzida quantidade de melanina.

Portanto, os danos observados dependem de diversos fatores, como: cor natural do cabelo submetido ao processo de tingimento (os pigmentos naturais persistentes no cabelo tingido ou clareado promovem fotoproteção), número de procedimentos de lavagem e faixas de comprimento de onda estudadas (UVA, UVB, visível, IV ou radiação solar total) (HOTING; ZIMMERMANN, 1997). O **Quadro 2** apresenta um

3. REVISÃO DA LITERATURA

resumo dos principais trabalhos publicados, nos últimos anos, sobre os efeitos das diferentes faixas de radiação em mechas de cabelo, sob diversas condições.

Além de alterações de cor, os raios UV causam alterações na estrutura mecânica e propriedades sensoriais do cabelo, como textura, promovendo o ressecamento da fibra, o aumento de porosidade e a perda de maleabilidade. A radiação afeta profundamente a estrutura da queratina, incluindo a foto-oxidação dos aminoácidos, esteróis e ácidos graxos, resultando em ruptura de ligações de enxofre, decomposição de lipídeos, diminuição de melaninas, assim como numerosas lesões micro-moleculares (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008).

Quadro 2. Efeito das diferentes faixas e parâmetros de radiação na fibra capilar (continua)

Radiação	Parâmetros da Exposição	Tipo de fibra	Parâmetros	Principais resultados	Ref.
UVA/UVB/ VIS/IV/ Global	UVA: 20 W; UVB: 400 W; VIS: 575 W; IV: 600 W; Global: 600 W; t: 1008 h	Cabelo preto ou castanho-claro virgens	Cor; AA e de óxido de cistina	VIS - altera cor; UVA/UVB - alteram AA na cutícula, UVA e VIS - elevam ácido cisteico na cutícula	(HOTING; ZIMMERMANN; HOCKER, 1995)
UVA/UVB/ VIS/IV/ Global	UVA: 48 W/m ² ; UVB: 2,5 W/m ² ; VIS: 463 W/m ² ; IV: 440 W/m ² ; Global: 1037 W/m ²	Cabelo castanho: permanente, descolorido ou tingido (cor ruivo)	Cor; propriedades mecânicas e teor de lipídeos	UVA - altera conteúdo proteico, reduz resistência mecânica; VIS - altera cor e lipídeos	(HOTING; ZIMMERMANN, 1997)
UV UV+VIS	UV: 5,06 mW/cm ² ; UV + VIS: 41,272 mW/cm ² ; 95% UR	Cabelo castanho	Superfície da fibra (MEV)	Elevada UR - fundamental para a fusão das camadas da cutícula	(RUETSCH; KAMATH; WEIGMANN, 2000)
Solar natural e artificial	Natural em W/m ² : UVB (7) + UVA (23) + VIS (260); Artificial em W/m ² : UVB (9) + UVA (27) + VIS (100) T: 30,0±2,0° C; 50 ± 2% UR	Mechas castanho, loiro, ruivo, preto	Perda proteica; cor; propriedades mecânicas e ultraestrutura (MEV)	UVB - provoca perda proteica; UVA - altera cor; Cabelos claros - ↑Δ cor; sem alteração das propriedades mecânicas e da cutícula	(NOGUEIRA; JOEKES, 2004)
UVB+UVA + VIS UVA + VIS	T: 30,0° C; 50% UR t: 1344 h (lâmpada de mercúrio) ou 200 h (lâmpada de xenônio)	Cabelo castanho-escuro virgem e descolorido	Propriedades mecânicas	UVB - ↓ resistência mecânica	(NOGUEIRA; NAKANO; JOEKES, 2004)
UV/VIS	1600 W/m ² ou 600 W/m ² ; Dose: 138,24 MJ/m ² ; T: 50,0° C; 85 ou 20% UR	Cabelo loiro	Propriedades mecânicas, Cor	1600 W/m ² - dano estrutural; 600 W/m ² - ↑Δ cor; ↑ UR → ↑ ERO → Δ cor	(MEINERT et al., 2004)

Legenda: AA = teor de aminoácidos; D = dose de radiação; I = irradiância; MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura; t = tempo; T = temperatura; Trp = triptofano; ROS = espécies reativas de oxigênio; UR = umidade relativa; VIS = radiação visível; UV = radiação ultravioleta; IR = radiação infravermelha; b* = coordenada de cor amarelo-azul; Δ = variação

Quadro 2. Efeito das diferentes faixas e parâmetros de radiação na fibra capilar (continuação)

Radiação	Parâmetros da Exposição	Tipo de fibra	Parâmetros	Principais resultados	Ref.
Luz solar artificial	220 kJ/m ² ; 50% UR T: 55,0 ± 10,0° C	Cabelo loiro tratado com tintura cor ruivo com silicones	Cor; penteabilidade	Silicones protegeram a cor; dimeticonol e silicone resina gel melhoraram a penteabilidade	(SCHLOSSER, 2004)
UV+VIS	I: 149,7 J/h cm ² (400-800 nm); t = 8-32 h; 35% UR; T: 45,0-50,0° C	Cabelo branco, castanho ou descolorido tingido (ruivo)	Cor	Melanina protegeu a cor	(LOCKE; JACHOWICZ, 2005)
UV+VIS+IV UVA+VIS+IV	UV+VIS+IV; UVA+VIS+IV; UV+VIS+IV; IV (estufa)	Cabelo castanho-escuro, loiro, ruivo e branco virgens	Cor	Branços: ↑b* no IV; Ruivo, castanho-escuro (UV+VIS+IV): ↑b* Loiro (UVA+VIS+IV): clareamento Loiro (UV+VIS+IV): ↑b* - ↓ melanina	(NOGUEIRA et al., 2007)
UV	UVA = 28,3 mW/cm ² ; UVB = 9,6 mW/cm ²	Cabelo preto e castanho	Nível de melanina radical	UV promoveu a geração de melanina radical	(HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008)
UVA UVB	UVA: 6680 J; UVB: 58,32 J 30% UR	Castanho virgem	Integridade da cutícula; perda proteica; teor de lipídeos	UVB - dano cuticular; UVA e UVB - ↓ camada lipídica; UVA - ↑ perda proteica	(JEON; PI; LEE, 2008)
UVB	I: 35337 W/m ² t: 48h	Lã	Cor; degradação de Trp	Amarelamento da cutícula > córtex; ↓ Trp	(DYER et al., 2010)

Legenda: AA = teor de aminoácidos; D = dose de radiação; I = irradiância; MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura; t = tempo; T = temperatura; Trp = triptofano; ROS = espécies reativas de oxigênio; UR = umidade relativa; VIS = radiação visível; UV = radiação ultravioleta; IR = radiação infravermelha; b* = coordenada de cor amarelo-azul; Δ = variação.

Quadro 2. Efeito das diferentes faixas e parâmetros de radiação na fibra capilar (conclusão)

Radiação	Parâmetros da Exposição	Tipo de fibra	Parâmetros	Principais resultados	Ref.
UVA+VIS	I: 283 W/m ² (t = 45/90 min) 500 W/m ² (t = 9-48 h)	Cabelo ruivo virgem	Perda proteica; decomposição de Trp; peroxidação lipídica; ROS	283 W/m ² → produção de ROS; 500 W/m ² → ↓ Trp; ↑ peroxidação lipídica	(FERNANDEZ et al., 2012a)
UV	500 W/m ² ; t = 18, 24, 36 e 48h	Cabelo castanho virgem e tratado com tintura cor ruivo	Resistência, perda proteica, Trp, peroxidação lipídica, MEV, Cor	18h - degradação proteica, peroxidação lipídica; 24h - ↓ Trp	(FERNANDEZ et al., 2012b)
UVA UVB	UVA: 3,97 mW/m ² UVB: 0,79 mW/m ²	Cabelo preto; eumelanina e feomelanina isoladas	Razão PTCA livre/total (degradação de eumelanina) e TTCA/4-AHP (degradação de feomelanina)	UVA degrada eumelanina e feomelanina	(WAKAMATSU et al., 2012)
UVA UVB	UVA: 20 J/12 h e 40 J/24 h; UVB: 8 J/12 h e 16 J/24 h; 30% UR; T ambiente	Cabelo asiático, caucasiano e negroide	Superfície da fibra (MEV), dano cuticular (MET); camada lipídica	UVB - ↑ dano cuticular, Cabelo negroide - mais afetado; UV causa danos à camada lipídica - ↓ níveis de ácidos graxos livres, exceto no asiático	(JI et al., 2013)
UV + VIS + IV VIS + IR	Artificial: VIS + IR; UV + VIS + IR - períodos de 8 h, seguido de períodos de 16 h no escuro; t > 200 h; T: 28° C; 35% UR. Natural: 10 às 15 h; VIS + IR; espectro solar (UV + VIS + IR); t = 50 h; T: 28° C; 56% UR	Cabelo branco	Cor	VIS - amarelamento; Radicais livres formados durante exposição à radiação contínua agindo durante período no escuro; Luz solar - amarelamento e clareamento UV e calor - amarelamento	(RICHERNA et al., 2014)

Legenda: AA = teor de aminoácidos; D = dose de radiação; I = irradiância; MET = Microscopia Eletrônica de Transmissão; MEV = Microscopia Eletrônica de Varredura; t = tempo; T = temperatura; Trp = triptofano; ROS = espécies reativas de oxigênio; UR = umidade relativa; VIS = radiação visível; UV = radiação ultravioleta; IR = radiação infravermelha; b* = coordenada de cor amarelo-azul; Δ = variação

3.1.5 Fotoproteção capilar

Os pigmentos pertencentes à família das melaninas possuem a propriedade de proteger a fibra capilar e, também, a pele dos efeitos negativos da radiação solar. As melaninas são uma fonte de fotoproteção endógena que, ao interagirem com a radiação solar, transformam-se em oximelaninas, o que acarreta em clareamento da fibra. Os pigmentos naturais previnem quebras das pontes de dissulfeto, preservando a força mecânica do cabelo, porém nesse processo podem ocorrer alterações de cor (DRAELOS, 2006).

Mechas de cabelo pouco pigmentadas naturalmente apresentam maiores danos mecânicos quando expostos à radiação, quando comparados a mechas naturais de cor castanho, o que indica a fotoproteção natural promovida pela melanina, principalmente a eumelanina (PANDE; ALBRECHT; YANG, 2001). Pesquisadores têm demonstrado que o cabelo não-pigmentado (branco ou grisalho) é mais suscetível aos danos induzidos pela radiação UV em comparação aos cabelos pigmentados, o que indica que os grânulos promovem proteção em relação aos danos oxidativos (DRAELOS, 2006).

Porém, não apenas os pigmentos naturais, mas também os artificiais podem apresentar essa característica. As tinturas permanentes provocam danos às propriedades mecânicas da fibra capilar em maior extensão que as tinturas demipermanentes, devido ao seu mecanismo de ação. Porém, como o depósito de pigmento é consideravelmente maior entre as tinturas permanentes, a fotoproteção promovida por este tipo de tintura também é maior (PANDE; ALBRECHT; YANG, 2001).

Cabelos brancos expostos à radiação UV apresentam maior alteração de suas propriedades mecânicas em comparação aos tratados com tinturas semipermanentes, indicando que os pigmentos protegem a estrutura proteica da fibra, mesmo considerando os danos oxidativos causados pela aplicação da tintura. Assim, as tinturas retardam os efeitos foto-oxidativos, evitando o enfraquecimento da fibra capilar por quebra das pontes de dissulfeto. As moléculas que compõem as tinturas absorvem a radiação solar, que as promove a um estado excitado de energia, seguido do retorno ao estado fundamental, por vias radioativas ou não-radioativas (DRAELOS, 2006).

Existem relatos na literatura de que os filtros químicos UVA e UVB, como o *p*-metoxicinamato de octila, salicilato de octila e benzofenona-3, eram incorporados tanto em fotoprotetores capilares do tipo xampus ou condicionadores como para as preparações destinadas à pele. Porém, a maioria destes não apresenta substantividade ao

3. REVISÃO DA LITERATURA

cabelo, ou seja, eles não formam um filme e não aderem muito bem à fibra, o que facilita sua remoção e reduz sua capacidade fotoprotetora (SHAATH, 2006). Assim, este se tornou um grande desafio da indústria cosmética: desenvolver um fotoprotetor capilar que consiga cobrir toda a extensa área superficial dos cabelos, de modo a apresentar efetiva aderência à cutícula (DRAELOS, 2006).

Atualmente, novas moléculas contendo grupos quaternários, que possuem maior afinidade com a fibra capilar naturalmente carregada negativamente, têm sido desenvolvidas com a finalidade de proteger a fibra capilar dos danos foto-oxidativos provocados pela radiação solar. Entre elas, destacam-se: polisilicone-15 (INCI: *Polysilicone-15*), cloreto de cinamidopropil trimetil amônio (INCI: *Cinnamidopropyltrimonium Chloride*) e tosilato de dimetilpabamidopropil lauril dimônio (INCI: *Dimethylpabamidopropyl laurdimonium tosylate*) (SHAATH, 2006).

A eficácia de proteção de mechas de cabelo grisalhas expostas à radiação UV tratadas com xampus contendo cloreto de cinamidopropil trimetil amônio ou o filtro químico *p*-metoxicinamato de octila (filtro químico UVB) foi comparada por Gao & Bedell (2001). Segundo os autores, o composto catiônico apresentou maior eficácia de proteção da fibra em comparação ao filtro químico UVB utilizado, provavelmente devido à maior afinidade da molécula com a fibra capilar (GAO; BEDELL, 2001).

Apesar de muitos produtos capilares apresentarem filtros químicos eficazes em sua composição, não se pode determinar o valor de Fator de Proteção Solar (FPS) de uma formulação capilar visto que não existe um método regulamentado para avaliação desse parâmetro. Portanto, o *claim* "Fotoprotetor capilar" em produtos comerciais não deve ser utilizado, devendo ser substituído pelo termo "previne alteração de cor e brilho", entre outros *claims* similares (DRAELOS, 2011).

A fotoproteção capilar melhora a retenção e uniformidade da cor, aumentando o intervalo de tempo entre as reaplicações das tinturas, uma tendência positiva na dermatologia. Xampus, condicionadores e fixadores são categorias de produtos que podem ser formulados como produtos multifuncionais garantindo, também, a fotoproteção capilar. Porém, o grande desafio está na aplicação uniforme do produto na fibra capilar. Entre todos, os condicionadores, principalmente os do tipo *leave-in* (sem enxague), e os fixadores são os mais promissores visto que permanecem em contato com a fibra capilar durante o tempo de exposição do cabelo à radiação solar (DRAELOS, 2006).

3. REVISÃO DA LITERATURA

Compostos formadores de filme, como os silicones, também podem ser adicionados tanto nas formulações de tinturas capilares quanto em produtos destinados à aplicação pós-tintura (produtos de tratamento) com a finalidade de fotoproteção (SCHLOSSER, 2004).

Além das substâncias citadas, têm se investido muito no estudo da eficácia de antioxidantes, naturais ou sintéticos, moléculas que poderiam evitar a formação das ERO e/ou proteger as estruturas da fibra capilar (pigmentos, proteínas e lipídeos) da oxidação.

Meinert *et al.* (2004) demonstraram os efeitos benéficos da incorporação de antioxidantes em formulações capilares que protegeram a cor de cabelos loiros expostos à radiação UV/Vis (MEINERT *et al.*, 2004). Antioxidantes disponíveis comercialmente, que combinam extrato de chá branco, Oxynex[®], GSP-T (complexo antioxidante que combina procianidinas solúveis em água de sementes de uva e tocoferol) e alecrim, incorporados em formulações pré-sol foram eficazes em proteger as características de luminosidade (dL^*) das fibras de cabelo, um dos fatores importantes que afetam o parâmetro dE^* (que indica mudança total de cor).

Extrato de alcachofra, rico em derivados hidroxicinâmicos, protegeu mechas de cabelo expostas à radiação UV da peroxidação lipídica e degradação proteica, enquanto o extrato de arroz preservou a resistência mecânica, cor e brilho (FERNANDEZ *et al.*, 2012b).

3.2 Quercetina

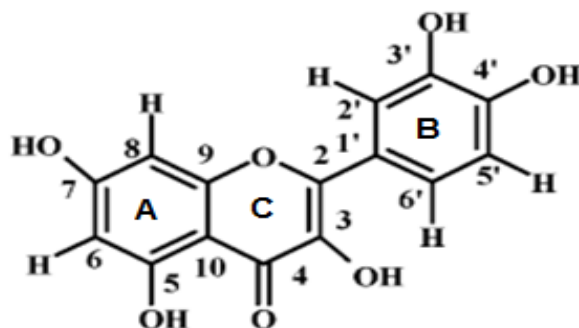
Os flavonoides compõem uma classe de substâncias que apresentam reconhecida atividade antioxidante e, portanto, possuem potencial de retardar as alterações provocadas pela radiação UV solar (VELASCO *et al.*, 2008) no cabelo. As fontes destes compostos incluem frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho. Dentre os flavonoides ingeridos na dieta humana, destaca-se a quercetina ($C_{15}H_{10}O_7$, 3,3',4',5,7-pentahidroxi flavona) (**Figura 14**) (porção aglicona da rutina), que representa cerca de 95% dos flavonoides ingeridos, sendo encontrada principalmente na cebola, maçã, couve, tomate e brócolis (KUNTIC *et al.*, 2003).

Quimicamente, os flavonoides e isoflavonoides são doadores de elétrons. Eles apresentam estruturas químicas conjugadas, ricas em grupos hidroxilas, com potencial ação antioxidante por reagirem e inativarem ânions superóxido, oxigênio singlete,

3. REVISÃO DA LITERATURA

radicais peróxido e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo por meio da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (BIRT; HENDRICH; WANG, 2001). Além da habilidade em atuar como acceptora de radicais livres, a quercetina apresenta a propriedade de complexar metais (Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}), o que contribui para sua atividade antioxidante (CORNARD; MERLIN, 2002). Este flavonoide inibe a formação das ERO em três etapas: iniciação (pela interação com íons superóxidos), formação de radicais hidroxila (por quelar íons de ferro) e peroxidação lipídica (por reagir com radicais peróxido de lipídeos) (BEHLING et al., 2004).

Figura 14. Fórmula estrutural do flavonoide quercetina (LEMANSKA et al., 2001)



Este flavonoide apresenta atividade anti-inflamatória, antiproliferativa, imunossupressora (JACKSON et al., 2006) e tem demonstrado eficácia na prevenção dos danos foto-oxidativos provocados pela radiação UVA ou UVB à pele (INAL; KAHRAMAN; KOKEN, 2001; CASAGRANDE et al., 2006; LIU et al., 2013).

Apesar de sua relativa solubilidade em meios oleosos ($\log P \approx 1,82$) (LUO et al., 2011) e baixa em água (menor que $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ a 20°C), devido a sua fórmula estrutural e elevada massa molar ($\text{MM} = 302,24 \text{ Da}$), a quercetina apresenta reduzida permeabilidade pela pele (BONINA et al., 1996), sendo que a concentração máxima recomendada deste flavonoide em formulações cosméticas (produto acabado) é de 0,5% (p/p) (COUNCIL OF EUROPE'S COMMITTEE OF EXPERTS ON COSMETIC PRODUCTS, 2008).

A quercetina apresenta cinco grupos hidroxila, sendo que os valores encontrados de pK_a podem variar de acordo com a referência consultada, como apresentado no **Quadro 3**. Segundo Kopacz (2003), a ordem de desprotonação seria 5OH, 7OH, 4'OH, 3OH, 3'OH (KOPACZ, 2003), mas há autores que afirmam que as hidroxilas mais facilmente oxidadas seriam 4'OH e, em menor importância, o 7OH, devido à

3. REVISÃO DA LITERATURA

possibilidade de deslocalização eletrônica e estabilização do radical no grupo 4-oxo (LEMANSKA et al., 2001; MEZZETTI et al., 2011; BARNES; FOSS JR.; SCHUG, 2013). Assim, na quercetina há dois grupos que agem como unidades antioxidantes (3'4'OH e 3,5,7-triOH), sendo que o efeito de ambas apresenta resultado sinérgico (LEMANSKA et al., 2001).

Um dos fatores que afeta a atividade antioxidante da quercetina é o valor de pH do meio, de modo que o aumento do valor de pH de 5 a 9,5 promove elevação da sua atividade antioxidante em cerca de duas vezes. Isso está relacionado à desprotonação do grupo 4'OH (LEMANSKA et al., 2001). Assim, de acordo com os valores de pH observados, pode-se esperar maior solubilidade da quercetina a partir de pH fisiológico ou levemente básico (BARNES; FOSS JR.; SCHUG, 2013).

Quadro 3. Valores de pKa da quercetina obtidos da literatura

pKa ₁ (4'-OH)	pKa ₂	pKa ₃	pKa ₄	Ref.
7,30	8,40	-	-	(TYUKAVKINA; POGODAEVA, 1975)
6,74	9,02	11,55	-	(JOVANOVIC et al., 1994)
7,04	8,55	11,26	13,06	(HERRERO-MARTÍNEZ et al., 2005)

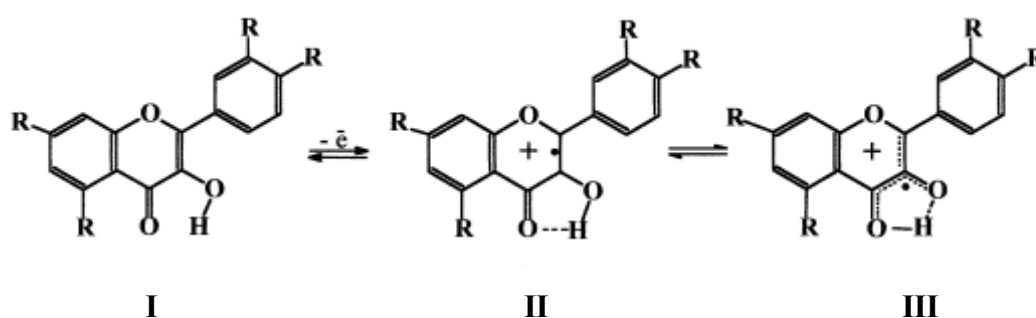
A quercetina preenche os três requerimentos necessários para que um flavonoide apresente excelente atividade antioxidante: (I) estrutura catecol no anel **B**; (II) dupla ligação C2-C3 em conjugação com o 4-oxo no anel **C**; (III) presença de 3OH e 5OH (HU et al., 2013) (**Figura 14**). Segundo Pietta (2000), os substituintes no anel **B** são os que mais afetam a atividade antioxidante dos flavonoides, sendo que a glicosilação do grupo 3'OH (como na rutina) reduz fortemente sua atividade antioxidante (PIETTA, 2000). Além disso, a presença do grupo 3OH no anel heterocíclico aumenta sua atividade, enquanto grupos hidroxila e metoxila nas posições 3,5 e 7 dos anéis **A** e **C** de flavonoides parecem ser menos importantes.

As hidroxilas presentes na posições 3 e 5 interagem por meio de ligações de hidrogênio com o oxigênio da carbonila (C4), o que impede sua desprotonação eficiente e também sua atividade antioxidante por meio da doação do átomo de

3. REVISÃO DA LITERATURA

hidrogênio. Porém, indiretamente, estas hidroxilas (3OH e 5OH) são importantes para a atividade antioxidante já que após a doação de um elétron da ligação dupla entre C2 e C3, forma-se um cátion radical que pode ser estabilizado por meio de uma troca de prótons entre 3OH ou 5OH e o grupo 4-oxo. Este mecanismo de estabilização torna possível a segunda doação de elétrons pelo cátion radical (LEMANSKA et al., 2001) (**Figura 15**).

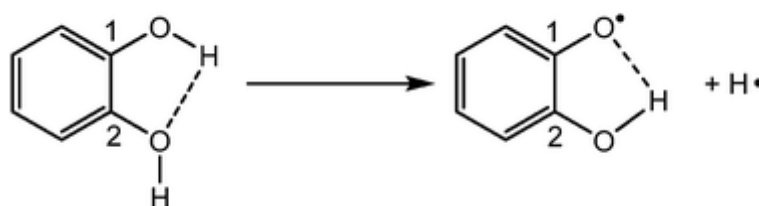
Figura 15. Estrutura de uma 3-hidroxi-favona neutra (I); cátion radical (II); forma tautomérica estável (III) (LEMANSKA et al., 2001)



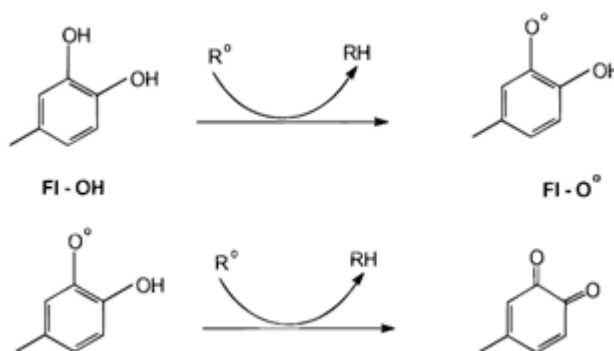
O anel **B**, por ser mais rico em elétrons que o anel **A**, representa um alvo para os compostos oxidantes (JOVANOVIC et al., 1994). O radical aroxila, formado após a oxidação de uma hidroxila no anel **B**, possui um mecanismo adicional de estabilização: formação de ligação de hidrogênio intramolecular, como mostrado na

Figura 16 (LUCARINI; PEDULLI, 2010). Posteriormente, este radical pode reagir novamente com outra ERO, gerando uma estrutura quinona estável (PIETTA, 2000) (**Figura 17**), porém esta não é a rota preferencial. Após a primeira desprotonação, a quercetina apresenta aumento da sua atividade antioxidante, sendo que o principal mecanismo, a partir de então, baseia-se na doação de elétrons e não na doação de demais prótons (LEMANSKA et al., 2001).

Figura 16. Ligação de hidrogênio intramolecular formada no grupo catecol após reação com uma ERO (LUCARINI; PEDULLI, 2010)

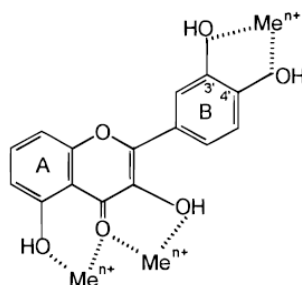


3. REVISÃO DA LITERATURA

Figura 17. Sequestro de um radical livre por flavonoides (PIETTA, 2000)

Legenda: Fl - flavonoide; R - radical livre

Outro mecanismo de atividade antioxidante relaciona-se à propriedade dos flavonoides de quelarem eficientemente metais, como Cu^+ e Fe^{2+} , relacionados ao metabolismo do oxigênio e formação de ERO. Os locais propostos de interação com metais são: grupo catecol no anel **B** e grupos *catecol-like*, como os formados entre 3OH e 4-oxo, e entre 5OH e 4-oxo (**Figura 18**) (PIETTA, 2000).

Figura 18. Sítios de ligação de metais (PIETTA, 2000)

Como citado anteriormente, a quercetina apresenta reduzida solubilidade em água e moderada em compostos lipofílicos. Nos últimos anos, com o objetivo de aumentar a estabilidade de substâncias pouco solúveis nos veículos utilizados e elevar sua eficácia, tem-se pesquisado a incorporação desse tipo de composto em nanoestruturas, nas diversas formas (nanocápsulas, nanoemulsões, entre outras). Além disso, a quercetina incorporada em uma nanoestrutura deve apresentar maior penetração na fibra capilar, principalmente naquelas danificadas por processos químicos como descoloração, alisamento/relaxamento e tintura, potencializando seu efeito antioxidante (HU et al., 2012), o que torna o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo estas substâncias potencialmente interessante para aplicação capilar.

3.3 Nanotecnologia

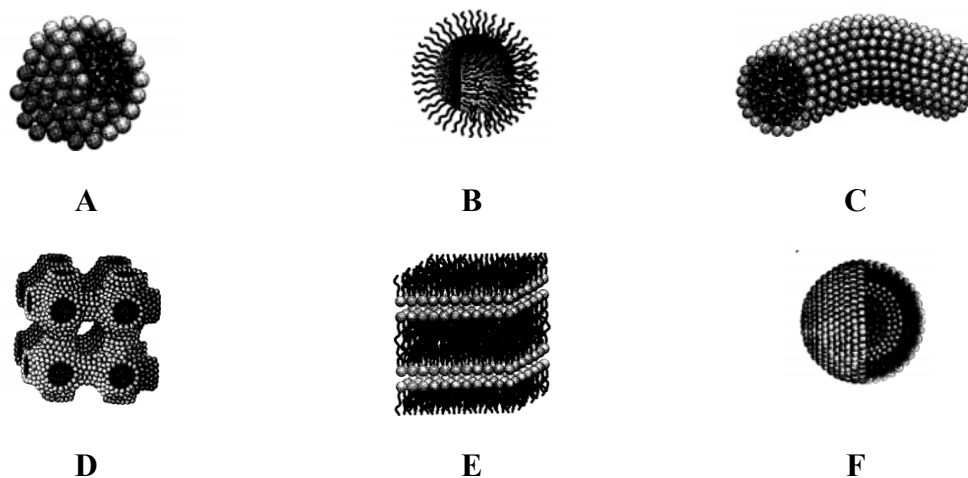
A Nanotecnologia é um termo que define técnicas, materiais e instrumentos que operam na escala nanométrica, sendo considerada a tecnologia mais promissora do século XXI e a protagonista de uma nova revolução industrial. Atualmente, os nanomateriais são muito estudados e utilizados nas áreas relacionadas ao esporte (tecidos e materiais nanotecnológicos), pneus, catalisadores, componentes eletrônicos, tintas, alimentos, medicamentos e cosméticos (NOHYNEK et al., 2007).

Os nanocosméticos apresentam importância dado o crescente mercado global, principalmente o Brasil, considerado o terceiro maior consumidor de cosméticos no mundo (ABIHPEC, 2015). Este tipo de cosmético oferece atributos diferenciados, relacionados à permeação cutânea, viscosidade, aparência, maior concentração de ativos possível de ser incorporado, entre outros. Os nanocosméticos surgiram como alternativa de tecnologia elevada e muito interessante para incorporação de componentes ativos conhecidos, estudados, eficazes e de concentração segura para uso, mas que podem ganhar novas aplicações, em função de aumento de permeabilidade cutânea ou de área de contato com a pele ou o cabelo, por exemplo.

Tanto as nano quanto as microemulsões apresentam-se transparentes ou translúcidas e possuem maior estabilidade física contra a sedimentação ou cremação, em relação às macroemulsões (FERNANDEZ et al., 2004; MARUNO; ROCHA-FILHO, 2009). Porém, apesar da semelhança existente entre nano e microemulsões quanto ao diâmetro de gotícula e aparência, há muitas diferenças.

O termo microemulsão se refere a uma formulação estável termodinamicamente, que se forma por um processo de emulsificação espontânea ($\Delta G < 0$), ao contrário das nanoemulsões que se formam apenas sob agitação, ou seja, neste caso o processo requer energia ($\Delta G > 0$). Dependendo dos componentes e suas proporções, a microemulsão pode apresentar uma, duas, três ou mais fases. As estruturas organizadas dentro das fases (uma ou mais) podem apresentar-se em diferentes formas, como esferoide (gotículas e gotículas reversas), tipo-cilindro (gotícula-bastão ou reversa), tipo plano (lamelar) ou tipo esponja (bicontínua) (**Figura 19**). As diferentes formas de organização são resultado da ultra baixa tensão interfacial (MCCLEMENTS, 2012).

Figura 19. Estruturas organizadas que podem ser visualizadas em microemulsões (MCCLEMENTS, 2012)



Legenda: (A) Gotícula esférica com núcleo hidrofóbico superfície hidrofílica - o raio do núcleo é aproximadamente igual ao comprimento da cadeia hidrofóbica; (B) Gotículas reversa/invertida - cadeias hidrofóbicas estão voltadas para o meio oleoso, enquanto os grupos polares estão no interior das gotículas; (C) Gotículas cilíndricas com secção transversal similar a gotículas esféricas - são geralmente polidispersas devido à incorporação de mais tensoativos, causando o crescimento do cilindro; (D) Estrutura cúbica bicontínua com canais em monocamada separando meio oleoso e aquoso; (E) Estrutura lamelar ou bicamada planar; (F) Vesículas formadas por bicamadas muito próximas, sem conexão entre camadas adjacentes - compartimento oleoso é isolado do aquoso

As nanoemulsões são preparadas com os mesmos componentes utilizados nas microemulsões (óleo, água e tensoativos), mas se organizam somente na forma de gotículas do tipo esferoide devido à elevada pressão de Laplace (diferença de pressão interna e externa do sistema) que age sobre as gotículas (MCCLEMENTS, 2012). Ao contrário das microemulsões, as nanoemulsões apresentam estabilidade cinética, ou seja, não se observa separação de fases em função de sedimentação ou cremação. Isso ocorre devido ao reduzido diâmetro de gotícula e seu elevado movimento Browniano. Porém, caso as forças atrativas superem as repulsivas, pode-se observar a coagulação, resultado da associação de poucas ou muitas gotículas formando agregados (KOROLEVA; YURTOV, 2012; MCCLEMENTS, 2012).

Não há consenso quanto ao valor de diâmetro adequado para definir uma nano ou microemulsão. Alguns autores definem que esses sistemas devem apresentar diâmetro médio de gotícula inferior a 100nm (KOROLEVA; YURTOV, 2012), enquanto que para outros este valor pode estar compreendido entre 20 e 500nm (PORRAS et al., 2004; TADROS et al., 2004; MEI et al., 2011), 50 e 500nm (MORALES et al., 2003) ou entre 20 e 200nm (IZQUIERDO et al., 2004).

3.3.1 Métodos de obtenção

As nanoemulsões, assim como as macroemulsões, são preparadas a partir de uma fase oleosa, fase aquosa, tensoativo e co-tensoativo, quando necessário. Porém, o processo de obtenção e composição dos tensoativos pode diferenciar um tipo de emulsão do outro. Os métodos de preparo das nanoemulsões podem ser classificados em de alta ou de baixa energia, ou combinados (MORAIS et al., 2006).

Os métodos de alta energia incluem elevada agitação (tipo *rotor-stator*, como Ultra-Turrax[®]), homogeneizadores de alta pressão (50-100 MPa) ou geradores de ultrassom. Entre os métodos de baixa energia, encontram-se os métodos de *inversão de fase por alteração da fração volumétrica* (EPI) e o de *temperatura de inversão de fase* (PIT), desenvolvido por Shinoda & Saito (1968) (SHINODA; SAITO, 1968; MAALI; MOSAVIAN, 2013).

No método PIT são utilizados geralmente dois ou mais tensoativos não-iônicos polietoxilados. Segundo o método desenvolvido por Shinoda & Saito (1968), os componentes do sistema são aquecidos no mesmo recipiente, de maneira que os tensoativos, antes hidrofílicos, tornam-se lipofílicos com elevação da temperatura devido à desidratação das cadeias de polioxietileno, formando, inicialmente, uma emulsão água em óleo (A/O) à temperatura PIT (SHINODA; SAITO, 1968). O abaixamento rápido da temperatura do sistema promove novamente a inversão de fase, formando-se uma nanoemulsão óleo em água (O/A) não-iônica (devido à característica dos tensoativos) de reduzido diâmetro de gotícula (KOROLEVA; YURTOV, 2012; SOLANS; SOLÉ, 2012).

A formação de uma nanoemulsão pelo método PIT requer o aquecimento do sistema, de modo que podem ser observadas diversas fases ao longo do procedimento de aquecimento, ou mesmo ao final do processo de resfriamento, dependendo da composição e temperatura, classificadas como *Winsor I, II, III e IV* (CLAUSSE, 1983; ROGER; CABANE; OLSSON, 2011), como apresentado na **Figura 20 e 21**.

- **Winsor I:** fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada (coexistência de duas fases);
- **Winsor II:** fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada (coexistência de duas fases);

3. REVISÃO DA LITERATURA

- **Winsor III:** fases aquosa e oleosa em equilíbrio com fase emulsionada (coexistência de três fases);
- **Winsor IV:** sistema emulsionado, não contém fases oleosa ou aquosa livres, sendo um sistema macroscopicamente monofásico.

Figura 20. Emulsões obtidas com diferentes concentrações do tensoativo polietilenoglicol perfluoroalquilado com a fase oleosa brometo de perfluorooctila (BPFO). Representação da classificação de Winsor. (A) Winsor I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada); (B) *Winsor III* (fase emulsionada em equilíbrio com a fase aquosa e fase oleosa); (C) *Winsor II* (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada); (D) *Winsor IV* (emulsão homogênea); (E) *Microemulsão* (OLIVEIRA et al., 2004)

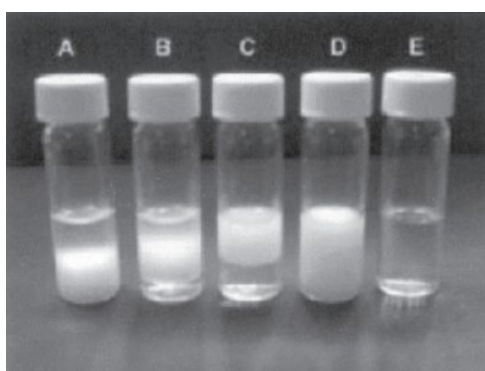
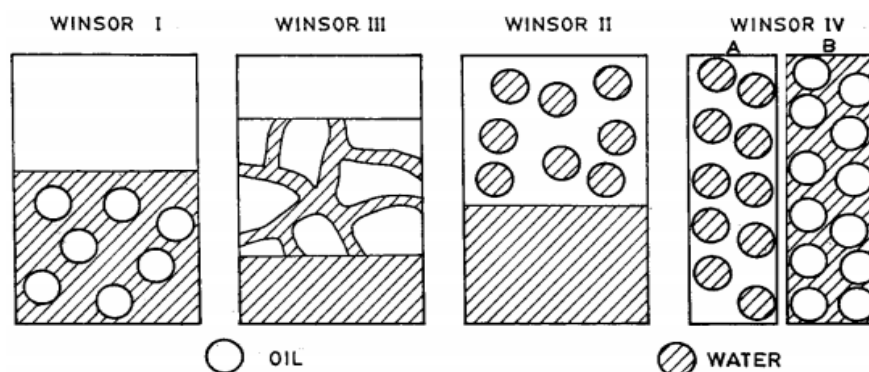


Figura 21. Representação das fases Winsor: I (fase oleosa em equilíbrio com fase emulsionada); III (fase emulsionada em equilíbrio com a fase aquosa e fase oleosa); II (fase aquosa em equilíbrio com fase emulsionada); IV (emulsão homogênea) (MOULIK; PAUL, 1998)

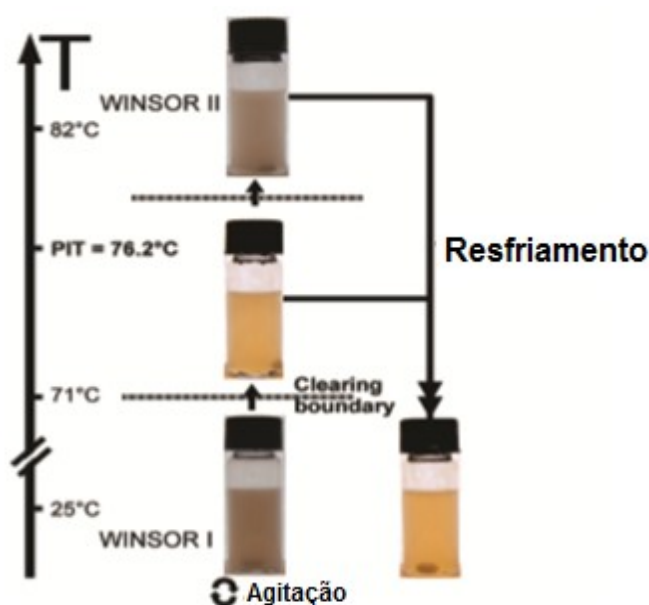


Porém, entre essas fases *Winsor* pode ocorrer uma fase intermediária, pouco entendida, na qual o sistema torna-se translúcido e/ou azulado, à temperatura definida por Roger *et al.* (2010) como *Clearing Boundary Temperature* (T_{cb}) (ROGER; CABANE; OLSSON, 2010). De acordo com esses autores, não seria necessário atingir

3. REVISÃO DA LITERATURA

a PIT (ou seja, a inversão de fase) para que a nanoemulsão se formasse, porém seria imprescindível que o sistema fosse aquecido até a T_{cb} (momento em que a turbidez do sistema é mínima), sendo posteriormente resfriado, propondo assim o método sub-PIT, como indicado na **Figura 22**.

Figura 22. Fotografia dos principais estados observados para uma amostra sob agitação e aquecimento. Observa-se a fase de transição entre Winsor I e Winsor II, denominada *Clearing Boundary* (ROGER; CABANE; OLSSON, 2010)



A partir do estudo de Roger *et al.* (2009), Mei *et al.* (2011) utilizaram o método sub-PIT para obtenção de nanoemulsões catiônicas, visto ser, aparentemente impossível a obtenção desse tipo de formulação pelo método PIT tradicional, proposto por Shinoda & Saito (1968). Nesse caso, o sistema contendo todas as matérias-primas formadoras da nanoemulsão, incluindo um tensoativo catiônico, deve ser aquecido à temperatura T_{cb} , sendo posteriormente resfriado até temperatura ambiente para formação da nanoemulsão catiônica (MEI *et al.*, 2011).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas (Grau de pureza farmacêutico), outros ingredientes (INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*) e materiais

- Ácido cítrico (INCI: *Citric acid*) solução a 10% (IHS Chemical[®])
- Adesivos epicutâneos (Finn Chambers Epitest)
- Água milli-q
- Álcool oleílico etoxilado 20OE (INCI: *Oleth-20*) (Croda[®])
- Álcool oleílico etoxilado 3OE (INCI: *Oleth-3*) (Croda[®])
- Cloreto de cetil trimetil amônio (INCI: *Cetrimonium Chloride*) (BASF[®])
- Cloreto de sódio (INCI: *Sodium Chloride*) (IHS Chemica[®])
- Fenoxietanol e parabenos (INCI: *Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben*) (Croda[®])
- Mechas de cabelo caucasiano virgem castanho-escuro (DeMeo Brothers[®])
- Ovos de galinha galados (granja Irineu Salviato)
- Peróxido de hidrogênio (40 vol) (Amend[®])
- Pó descolorante (Amend[®])
- Quercetina (INCI: *quercetin*) (Sanrisil[®]) - Teor de pureza 91,0%
- Tintura oxidativa cores 12.0 e 6.66 (Amend[®])
- Trietanolamina (INCI: *Triethanolamine*) (Garden Química[®])
- Triglicérides de ácido cáprico/caprílico (INCI: *Caprylic/Capric Triglyceride*) (Croda[®])

4.1.2 Reagentes/Solventes - Grau de pureza analítico (P.A.)

- Ácido acético (Synth[®])
- Álcool etílico absoluto (Synth[®])
- Álcool metílico (Merck[®])
- Carbonato de sódio (Synth[®])
- Cloreto de alumínio hexahidratado (Synth[®])
- DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila) (Sigma-Aldrich[®])
- Hidróxido de sódio (Synth[®])
- Reagente de Folin-Fenol Cioucalteau (Imbralab[®])
- Dodecilsulfato de Sódio (SDS) (Synth[®])
- Sulfato de cobre II pentahidratado (Synth[®])

4. MATERIAL E MÉTODOS

- Tartarato de sódio e potássio (Synth[®])

4.1.3 Padrões de referência- Grau de pureza analítico (P.A.)

- Albumina de soro bovino (Sigma[®]) - Teor de pureza 96,0%
- Quercetina padrão de referência secundário (Sigma-Aldrich[®]) - Teor de pureza 100,0%
- Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) (Sigma-Aldrich[®]) - Teor de pureza 97,0%

4.1.4 Equipamentos

- Agitador mecânico Fisatom[®] 713D
- Balança analítica Shimadzu[®] AUY220
- Balança granatária Gehaka[®] BG4000
- Banho de ultrassom Ultrasonic Clean[®] 1600 Unique
- Calorímetro Diferencial de Varredura – Perkin Elmer[®] DSC 7
- Câmera DigiMicro[®] 2.0 Scale
- Centrífuga Hitachi[®] RX2
- Chapa de aquecimento Ika[®] C-MAG HS 7
- Chroma Meter[®] Minolta CR-300
- Condutivímetro Digimed[®] DM-31
- Corneometer[®] CM 825
- Desumidificador de ar Arsec[®]
- Dia-stron[®] MTT 175 e acessórios
- Espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração Labsphere[®] UV2000S Ultraviolet Transmittance Analyzer
- Espectrofotômetro ThermoScientific Evolution[®] 600 UV-Vis equipado com acessório de reflectância difusa DRA-EV-600
- Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica Bruker[®] EMX
- Geladeira Consul[®]
- Incubadora de ovos, com controle de umidade e temperatura (Chocmaster[®])
- Malvern[®] Zetasizer NanoS
- Micrômetro Mitutoyo[®]
- Microscópio Confocal Invertido de Fluorescência Leica TCS SP5

4. MATERIAL E MÉTODOS

- Microscópio de Força Atômica Nanoscope IIIa Multimode
- Microscópio de Transmissão LEO 912 Ω com suporte de amostras criogênico D626
- Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Quanta 600 FEG
- pHmetro e eletrodo combinado de imersão direta Quimis[®]
- Purificador de água milli-q Simplicity[®] UV
- Reômetro Paar Physica[®] MCR 300
- Simulador solar Atlas Suntest[®] CPS+
- Termohigrômetro digital
- Termômetro de mercúrio
- Tewameter[®] TM 300
- Ultrabalança Mettler[®] XP2U

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Composição das formulações

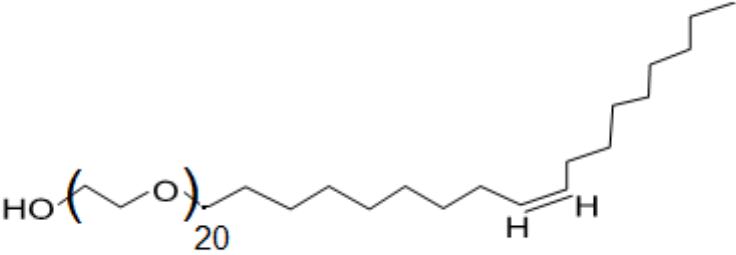
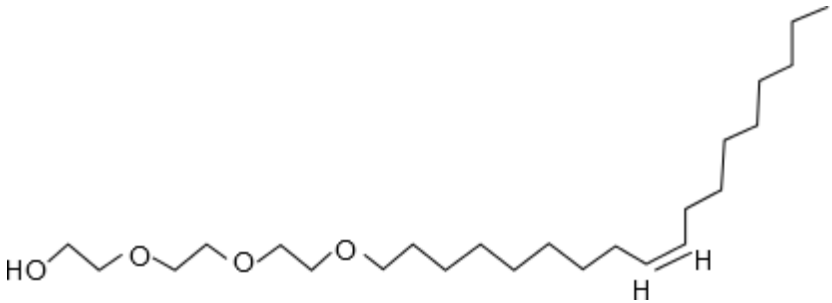
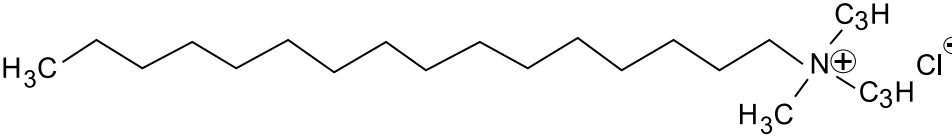
A estabilidade de emulsões, incluindo as nanoemulsões, é altamente influenciada pelo tipo de tensoativo e suas concentrações na formulação, visto que este fator se relaciona ao EHL (Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo) que deve ser atingido para que a preparação seja estável fisicamente. Assim, foram escolhidos três tensoativos, sendo um catiônico e ingrediente ativo (cloreto de cetil trimetil amônio - CCTA) e dois não-iônicos (oleth-20 e oleth-3), cujas fórmulas estruturais encontram-se no **Quadro 4**. O oleth-20 apresenta valor de EHL igual a 15,5; o oleth-3 de 6,6 e o CCTA de 15,8 (ASH; ASH, 2004; VOLPO, 2009).

A composição quantitativa das nove formulações preparadas (identificadas de **Q1** a **Q9**) não será apresentada neste trabalho em função de patente que se encontra em fase de elaboração. As proporções dos tensoativos não-iônicos foram variadas, de maneira que a sua soma fosse igual a 9,0% (p/p), e o EHL do sistema variasse de 8,0 a 15,0. A concentração do CCTA foi mantida constante e igual a 1,0% (p/p), concentração máxima recomendada pela SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety) (EUROPEAN COMMISSION SCCS/1246/09, 2009), sendo que não há limites declarados na legislação brasileira. A quercetina foi adicionada a 0,5% (p/p), não sendo adicionado outro antioxidante na formulação, como seria esperado para uma formulação cosmética, pois isso prejudicaria a análise da eficácia antioxidante da quercetina na

4. MATERIAL E MÉTODOS

formulação. As nove formulações preparadas continham os seguintes componentes (nomenclatura INCI - *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient* - apresentada entre parênteses): água deionizada (*acqua*), álcool oleílico etoxilado 20OE (*oleth-20*), álcool oleílico etoxilado 3OE (*oleth-3*), cloreto de cetil trimetil amônio (*cetrimonium chloride*), triglicérides de ácido cáprico/caprílico (*caprylic/capric triglyceride*), quercetina (*quercetin*), fenoxietanol e parabenos (*phenoxyethanol*, *methylparaben*, *ethylparaben*, *propylparaben*, *butylparaben*, *isobutylparaben*).

Quadro 4. Fórmulas estruturais dos tensoativos não-iônicos e catiônico utilizados (CHEMICAL BOOK, 2016). *INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredient*

Tensoativo (INCI*)	Fórmula Estrutural
Oleth-20	
Oleth-3	
Cetrimonium Chloride	

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.2 Preparo das Formulações

Cerca de 200g de cada formulação foram preparadas, seguindo o método sub-PIT (*Phase Inversion Temperature*). As matérias-primas foram pesadas em conjunto utilizando balança analítica Shimadzu[®] AUY220 ou balança granatária Gehaka[®] BG4000, e colocadas em béquer de vidro. O sistema foi aquecido à temperatura controlada em chapa de aquecimento Ika[®] C-MAG HS 7 e agitação constante a 350rpm utilizando agitador mecânico Fisatom[®] 713D. A condutividade elétrica do sistema foi medida por meio do condutivímetro Digimed[®] DM-31 e a temperatura, por termômetro de mercúrio. As formulações foram aquecidas até atingirem o ponto de turbidez visual mínima, sendo posteriormente resfriadas até atingir temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}$ C).

O valor de pH das formulações foi ajustado para 4,5 - 5,5 em pHmetro Quimis[®] com auxílio de eletrodo combinado de imersão direta Quimis[®], previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0 (Synth[®]), por meio da adição de solução de ácido cítrico (10% p/v) ou trietanolamina, conforme a necessidade.

4.2.3 Avaliação de Estabilidade Preliminar

As formulações, após 48 h do preparo, tempo necessário para finalização do processo de emulsificação, foram submetidas ao Teste de Centrifugação, o que auxilia na escolha das preparações que apresentavam melhor desempenho, ou seja, da composição ideal de tensoativos no sistema (EHL) (BRASIL, 2004).

Teste de centrifugação

Em tubos de ensaio foram adicionados quantidades de amostra, de tal forma que o conjunto pesasse, em balança granatária, o equivalente a 15,0 g. As formulações foram submetidas à centrifugação em centrífuga Hitachi[®] RX2 a 3000 rpm por 30 min, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^{\circ}$ C) (BRASIL, 2004).

Após o ensaio, as formulações foram analisadas macroscopicamente quanto ao aspecto e classificadas como:

- i. (M) Modificada - com presença de separação de fases;
- ii. (N) Normal - sem alteração quanto ao aspecto.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.4 Avaliação de Estabilidade Normal

A formulação selecionada seguindo os critérios anteriormente apresentados foi submetida à *Avaliação de Estabilidade Normal*, em diferentes condições: $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (geladeira); $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (temperatura ambiente ao abrigo da luz) e $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (estufa) pelo período de 90 dias, sendo avaliada nos dias 1º, 7º, 15º, 30º, 60º e 90º (BRASIL, 2004). O dia 1º de análise correspondeu a 48 h após o preparo da formulação. Foram avaliados os seguintes parâmetros:

4.2.4.1 Características organolépticas

As formulações foram avaliadas quanto ao aspecto visual, alteração de cor ou odor.

4.2.4.2 Valor de pH

O pH da formulação foi determinado em pHmetro Quimis[®] utilizando eletrodo de imersão direta a $22,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ Quimis[®], previamente calibrado com soluções-tampão pH 4,0 e 7,0 (Synth[®]) (VELASCO et al., 2012).

4.2.4.3 Diâmetro médio de gotícula e Potencial zeta

O diâmetro médio de gotícula e potencial zeta foram determinados em equipamento Malvern[®] Zetasizer Nano S, a $25,0^\circ \text{C}$ e ângulo de espalhamento de 90° (MEI et al., 2011), utilizando amostras diluídas 20x em água milli-q. A análise de diâmetro foi realizada utilizando-se cubeta de poliestireno de 1 cm de caminho óptico. O potencial zeta foi determinado em célula capilar descartável, a 150 V. As análises foram realizadas em triplicata.

Os resultados obtidos de diâmetro médio de gotícula nas diferentes condições foram utilizados para o cálculo das constantes de *Ostwald ripening*, que indica o tipo de desestabilização predominante no sistema. Assim, quando o aumento no diâmetro ocorre por difusão individual de moléculas de óleo entre as gotículas, a constante de *Ostwald ripening* (ω_3) é dada pela relação linear entre a variação do raio da gotícula ao cubo (dr^3) e o tempo (dt), conforme mostrado na **Equação 1**. Porém, quando o mecanismo principal dá-se pelo transporte das moléculas de óleo por meio de gotículas (ω_2), o aumento do raio é dado por uma relação linear entre a variação do raio da gotícula ao quadrado (dr^2) e o tempo (dt) (**Equação 2**) (WEISS et al., 1997; WEISS; CANCELIERI; MCCLEMENTS, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Assim, as duas equações foram utilizadas com a finalidade de determinar o tipo de estabilidade *Ostwald ripening*.

$$\omega_3 = \frac{dr_N^3}{dt}$$

Equação 1. Constante de Ostwald ripening ω_3 , onde: r_N = raio médio da gotícula; t = tempo

$$\omega_2 = \frac{dr_N^2}{dt}$$

Equação 2. Constante de Ostwald ripening ω_2 , onde: r_N = raio médio da gotícula; t = tempo

O equipamento Malvern® Zetasizer Nano S fornece o raio médio de gotícula (r_I) pela técnica DLS (Dynamic Light Scattering), que se baseia na detecção do espalhamento de luz provocado pelo movimento das partículas. Porém, a teoria LSW (Lifshitz, Slesov e Wagner) utilizada para o cálculo das constantes de *Ostwald ripening* requer o raio médio em termos de número (r_N). Assim, para o cálculo da constante de *Ostwald ripening*, obtêm-se r_N de acordo a **Equação 3** (WOOSTER; GOLDING; SANDUANSRI, 2008).

$$r_I = 1,18 r_N$$

Equação 3. Cálculo do raio médio em termos de número (r_N), onde: r_I = raio médio de gotícula (r_I) em termos de espalhamento de luz, obtido pela técnica DLS (Dynamic Light Scattering)

4.2.4.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante da nanoemulsão desenvolvida foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila). Alíquotas de 50 μ L de nanoemulsão foram colocadas em balões de 10,0 mL e completou-se o volume com etanol P.A. Em tubos de ensaio (triplicata) foram transferidos 0,5 mL da diluição anterior e 2,5 mL de solução de DPPH· 100 μ M, agitou-se manualmente e incubou-se ao abrigo da luz por 30 min à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ$ C). Após este período, a redução do radical livre DPPH· foi mensurada em espectrofotômetro ThermoScientific® Evolution 600 UV-Vis a 517 nm (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O controle negativo foi preparado adicionando-se 2,5 mL de DPPH· 100µM a 0,5 mL de álcool etílico P.A., sendo este utilizado como branco de leitura. O decaimento da absorbância das amostras (**A_{am}**) correlacionado ao do controle (**A_c**) resultou na porcentagem de sequestro de radicais livres (**% SRL**), sendo expressa pela **Equação 4**.

$$\% SRL = \frac{A_c - A_{am}}{A_c} \times 100$$

Equação 4. Cálculo da Porcentagem de Sequestro de Radicais Livres (**%SRL**), onde: **A_c** = absorbância do controle; **A_{am}** = absorbância da amostra

A atividade antioxidante foi expressa em Trolox[®] equivalente, um derivado da vitamina E muito utilizado como antioxidante padrão em métodos de avaliação de atividade antioxidante (THAIPONG et al., 2006). Assim, tornou-se necessária a construção de curva analítica que correlacionasse %SRL e concentração desse padrão. Exatamente 20 mg de Trolox[®] (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) foram pesados em balança analítica e diluídos em balão volumétrico de 100,0 mL com etanol P.A., obtendo-se solução de concentração 800 µM. A partir dessa solução, foram preparadas diluições seriadas, obtendo-se soluções de concentrações finais de Trolox[®] de 15,52; 31,04; 46,56; 62,08; 77,60; 93,12; 108,64; 124,16 e 139,68 µM.

Alíquotas de exatamente 0,5 mL de cada concentração de Trolox[®] foram transferidas para tubos de ensaio, em triplicata. Em seguida, adicionaram-se exatamente 2,5 mL de solução etanólica de DPPH· 100 µM, seguindo-se o método descrito anteriormente. Os valores obtidos foram utilizados para construção da curva analítica, sendo que a equação da reta (determinada pelo método dos mínimos quadrados) e o valor do coeficiente de determinação (r^2) foram obtidos no software Excel[®].

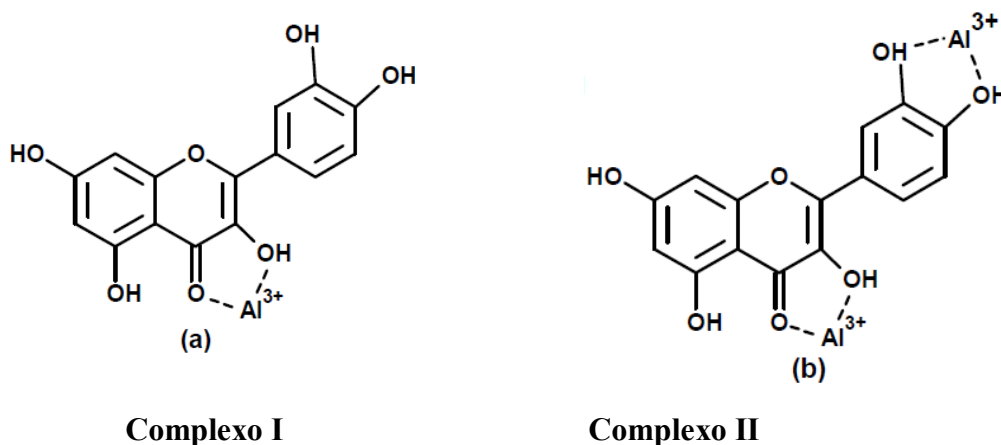
4.2.4.5 Conteúdo de quercetina

A quercetina apresenta máximo de absorção em 372 nm, porém a adição de cloreto de alumínio promove a redução de absorbância nesse comprimento de onda e considerável aumento em 428 nm, aproximadamente. Assim, o aumento da sensibilidade e da especificidade do método pela formação do complexo justificam a quantificação de quercetina ser realizada na presença do sal de alumínio. O grupo 3OH

4. MATERIAL E MÉTODOS

da quercetina apresenta o maior poder de quelação em meio composto por metanol e ácido, ou somente metanol. Neste solvente, em baixa concentração de Al^{3+} (1:1), forma-se o *complexo I*. Porém, a contínua adição de cloreto de alumínio leva à formação do *complexo II*, que possui dois pontos de quelação (3OH e 3'4' diOH). Contudo, na presença de ácido (em baixos valores de pH), somente o grupo 3OH apresenta capacidade de interagir com o Al^{3+} (CORNARD; MERLIN, 2002). Os complexos formados encontram-se na **Figura 23**. O método de quantificação de quercetina validado neste trabalho foi realizado em metanol contendo ácido acético (branco da reação), em excesso de cloreto de alumínio, ou seja, quantificou-se o *complexo I* formado (STAHL; SCHILD, 1981; BANOVA et al., 2006).

Figura 23. Fórmulas estruturais dos *complexos I e II* formados entre quercetina e alumínio, em diferentes condições experimentais (CORNARD; MERLIN, 2002)



Transferiram-se exatamente 0,5 g da nanoemulsão para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Aliquotas de 2,5 mL desta diluição (triplicata) foram transferidas para balões de 25 mL, adicionou-se 2,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (p/v) e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Após 30 min, realizou-se leitura espectrofotométrica a 429 nm (BANOVA et al., 2006).

Validação do método analítico

O método espectrofotométrico de quantificação de quercetina, baseado na reação colorimétrica de formação de complexo entre quercetina e o íon Al^{3+} (BANOVA et al., 2006) foi validado de acordo com os parâmetros: linearidade e construção da curva

4. MATERIAL E MÉTODOS

analítica, precisão, exatidão, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação.

a) Linearidade e Curva Analítica

A curva analítica foi construída a partir de diluições seriadas de padrão secundário de quercetina (Sigma-Aldrich[®]) (teor de pureza 100,0%) na faixa de 3,0 a 10,0 µg/mL. Alíquotas da solução-mãe de quercetina (100,0 µg/mL) foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL (triplicata), adicionando-se 2,0 mL de solução de cloreto de alumínio 2% (p/v), completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Após 30 min, realizou-se leitura espectrofotométrica a 429 nm (BANOV et al., 2006).

Foram construídas cinco curvas analíticas, obtendo-se cinco equações de reta, na forma $y = a x + b$ (sendo y = absorbância; x = concentração de quercetina (µg/mL); a = coeficiente angular; b = coeficiente linear). O cálculo da equação de reta da curva analítica foi realizado por regressão linear por meio do método dos mínimos quadrados e calculado o coeficiente de determinação (r^2) (BRASIL, 2003). Este parâmetro, para ser considerado aceitável, deve apresentar o valor mínimo de 0,99 (ICH, 1996; BRASIL, 2003; FDA, 2015). A partir dos dados provenientes das cinco curvas analíticas, obteve-se uma equação de reta média.

b) Precisão - Repetibilidade

Transferiram-se exatamente 0,5 g da nanoemulsão para um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Desta solução, foram retiradas 10 alíquotas de 2,5 mL para balões volumétricos de 25 mL, repetindo-se o procedimento descrito no *item 4.2.4.4a*. As leituras de absorbância obtidas foram substituídas na equação de reta, determinando-se as concentrações de quercetina na nanoemulsão. A precisão foi calculada em função do desvio padrão relativo (DPR), dado pela relação entre o desvio padrão e a concentração média de leitura (10 determinações) expressa em porcentagem, como apresentado na **Equação 5** (ICH, 1996; BRASIL, 2003; FDA, 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

$$\text{DPR} = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

Equação 5. Cálculo da precisão, *onde*: **DPR** = desvio padrão relativo; **s** = desvio padrão médio obtido por meio da curva analítica; \bar{X} = concentração média determinada de todas as amostras consideradas

Foram calculadas a precisão intra-dia e inter-dia. A precisão intra-dia considera valores encontrados em um período de tempo reduzido, realizados no mesmo laboratório e pelo mesmo analista, representada pela concordância dos resultados nas medições sucessivas do mesmo método. A precisão intermediária ou reprodutibilidade inter-dia envolveu a relação entre os resultados adquiridos no mesmo laboratório em dias diferentes, por analistas diferentes (ICH, 1996; BRASIL, 2003; FDA, 2015).

c) Exatidão

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se o teste de recuperação do padrão. Transferiu-se uma alíquota de 0,5 g da nanoemulsão para um balão de 50 mL e completou-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% v/v. Alíquotas de 2,5 mL foram transferidas juntamente com diferentes volumes da solução padrão de quercetina 100 µg/mL (0,25; 0,5; e 0,75 mL), em triplicata, para balões volumétricos de 25 mL, repetindo-se o procedimento descrito no *item 4.2.4.4a*.

A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (**Equação 6**) (ICH, 1996; BRASIL, 2003; FDA, 2015).

$$E(\%) = \frac{\text{CME}}{\text{CMT}} \cdot 100$$

Equação 6. Cálculo da exatidão, *onde*: **E (%)** = exatidão em porcentagem; **CME** = concentração média determinada experimentalmente; **CMT** = concentração média teórica de todas as amostras consideradas

d) Especificidade

Uma alíquota de 0,5 g da formulação base (sem adição de quercetina) foi transferida para um balão de 50 mL, completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v) (réplicas de dez). Desta dispersão, alíquotas de 2,5 mL foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, repetindo-se o procedimento descrito anteriormente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

e) Limites de quantificação e de detecção

O limite de quantificação (**LQ**) de uma substância é a menor quantidade na amostra que pode ser quantificada com exatidão e precisão (ICH, 1996). Este parâmetro é geralmente calculado para compostos presentes em baixos níveis e também para determinação de impurezas e produtos de degradação. O limite de detecção (**LD**) de uma substância é a menor quantidade na amostra que pode ser detectada mas não quantificada com exatidão e precisão (ICH, 1996).

Os limites de quantificação (**LQ**) e detecção (**LD**) foram calculados de acordo com as **Equação 7** e **Equação 8**.

$$LQ = 10 \cdot \frac{\sigma}{IC}$$

Equação 7. Limite de quantificação, onde: σ = desvio padrão do intercepto; **IC** = inclinação da curva analítica

$$LD = 3,3 \cdot \frac{\sigma}{IC}$$

Equação 8. Limite de detecção, onde: σ = desvio padrão do intercepto; **IC** = inclinação da curva analítica

4.2.4.6 Avaliação dos resultados

Ao final do período de 90 dias, os dados obtidos em todas as análises (pH, atividade antioxidante equivalente em Trolox[®], conteúdo de quercetina, diâmetro médio de gotícula e potencial zeta) foram avaliados estatisticamente, por ANOVA seguido do teste de Tukey ($\alpha = 0,05$), sendo a formulação classificada como segue:

- i. **(M)** Modificada, contendo alterações estatisticamente significativas;
- ii. **(N)** Normal, sem alteração estatisticamente significativa.

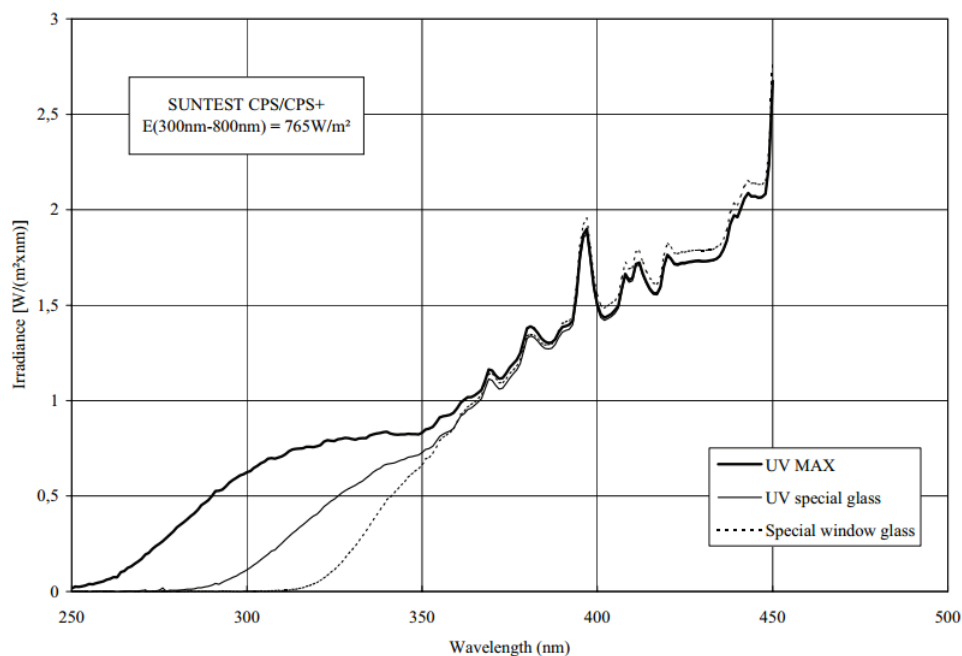
4.2.5 Fotoestabilidade da nanoemulsão

A avaliação da fotoestabilidade da nanoemulsão envolveu a determinação do perfil de absorção e da atividade antioxidante após períodos de exposição à radiação solar artificial (UV/Vis) de 10 min a 8 h. A exposição foi realizada no simulador solar Suntest[®] CPS+ (Atlas, Alemanha) equipado com uma lâmpada de xenônio e filtro *UV special glass*, cuja irradiância espectral é apresentada na **Figura 24**. Tal filtro age eliminando comprimentos de onda menores que 290 nm e radiação infravermelha, com

4. MATERIAL E MÉTODOS

a finalidade de evitar efeitos térmicos. A irradiância do simulador solar foi mantida a 500 W/m^2 .

Figura 24. Irradiância espectral do filtro *UV special glass* utilizado no simulador solar Suntest® CPS+ (ATLAS, 2016)



4.2.5.1 Perfil de Absorção

Amostras da nanoemulsão foram aplicadas uniformemente a $0,75 \text{ mg/cm}^2$ em placas de PMMA (polimetilmetacrilato) (HELIO PLACA HD 6) e secaram a temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ \text{ C}$) durante 25 min no escuro (EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION (COLIPA), 2011; VELASCO et al., 2012). O seu espectro de absorção, antes e após a exposição à radiação solar artificial, foram obtidos no intervalo de 250 - 450 nm, utilizando o espectrofotômetro de refletância difusa com esfera de integração Labsphere® UV-2000S.

4.2.5.2 Atividade Antioxidante

Uma alíquota da nanoemulsão foi transferida para uma cubeta de quartzo fechada com tampa e exposta à radiação solar artificial, conforme as condições descritas anteriormente. As amostras irradiadas foram diluídas 500x em etanol P.A e alíquotas de 0,5 mL foram adicionados a 2,5 mL de uma solução de DPPH· $100 \mu\text{M}$ (triplicata), sendo a atividade antioxidante determinada como descrito no *item 4.2.4.4*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.6 Caracterização da nanoemulsão

A nanoemulsão aprovada na *Avaliação de Estabilidade Normal* foi caracterizada de acordo com os seguintes ensaios:

4.2.6.1 Eficiência de encapsulamento

A eficiência de encapsulamento da quercetina na nanoemulsão foi determinada por meio da diferença entre a quantidade de quercetina total na formulação e a quercetina livre (presente na fase aquosa). A quantidade total foi calculada conforme procedimento descrito no *item 4.2.4.5*. Com a finalidade de calcular a quantidade de quercetina livre na nanoemulsão, a formulação foi submetida a uma etapa de centrifugação utilizando uma unidade de ultracentrifugação (10KDa Amicon; Millipore[®], USA), a 21.400 g por 30 min a $22,0 \pm 1,0^\circ \text{C}$ (OLIVEIRA et al., 2016) e quantificada no sobrenadante pelo método descrito anteriormente (*item 4.2.4.5*). A eficiência de encapsulamento foi calculada conforme indicado na **Equação 9** (WU et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

$$EE (\%) = \frac{M(T) - M(f)}{M(T)} \cdot 100$$

Equação 9. Eficiência de encapsulamento (EE), onde: **M(T)** = quantidade total de quercetina na nanoemulsão; **M(f)** = quantidade de quercetina livre na nanoemulsão

4.2.6.2 Reologia

Os parâmetros reológicos da nanoemulsão foram obtidos no reômetro Paar Physica[®] MCR 300. Empregou-se um cone e fixação de placas (50 mm de diâmetro, 1°). As curvas de fluxo foram determinadas a 20, 30, 35, 40 e 50° C, variando a taxa de cisalhamento de 1 a 200 s⁻¹. A temperatura foi mantida constante, com variação máxima de $\pm 0,05^\circ \text{C}$, por uma placa de Peltier. Um conjunto de uma centena de pontos (10 s/ponto) foi coletado em uma rampa linear (HOWE; PITT, 2008). A viscosidade, η , foi calculada de acordo com a **Equação 10**.

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}}$$

Equação 10. Cálculo da viscosidade (η), onde: τ = tensão de cisalhamento; $\dot{\gamma}$ = velocidade de cisalhamento

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.6.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão Criogênica (Cryo-TEM)

A obtenção das imagens por Cryo-TEM foi realizada na Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Alemanha, utilizando o Microscópio de Transmissão LEO 912 Ω (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) contendo suporte de amostras criogênico D626 (Gatan Inc., Pleasanton, EUA). As imagens foram gravadas em um sistema Proscan (Oxford Instruments, Abingdon, EUA) e processados em software iTEM 5.0 (Build 1054) (soft image System GmbH, Münster, Alemanha) (KLANG et al., 2012). A análise das imagens permitiu confirmar o formato da nanoestrutura formada, assim como calcular o diâmetro médio das gotículas.

4.2.6.4 Microscopia de Força Atômica (AFM)

As imagens por AFM foram obtidas no microscópio de força atômica Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, Bruker, Santa Barbara), utilizando pontas de silício (TESP, Bruker) com frequência de ressonância de 300 kHz, a taxa de ~1,5 Hz. As imagens foram obtidas à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$), colocando-se gotas da nanoemulsão sobre uma superfície de grafite altamente orientado (HOPG).

A determinação da localização da quercetina na nanoestrutura tornou-se fundamental com a finalidade de entender o mecanismo de estabilização adicional que esse flavonoide conferiu à nanoemulsão, visto que a formulação base (preparada sem a adição de quercetina) não apresentou estabilidade física pois se observou separação de fases logo após seu preparo. Para tanto, foram obtidas imagens por Microscopia Confocal de Fluorescência e foram realizados ensaios por análise térmica, visando identificar interações entre os tensoativos presentes na nanoemulsão e a quercetina.

4.2.6.5 Microscopia Confocal de Fluorescência

A característica da quercetina de apresentar fluorescência permitiu sua visualização na nanoemulsão por Microscopia Confocal de Fluorescência. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio confocal invertido de fluorescência Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH CMS, Mannheim, Alemanha) com dois fótons de excitação a 740 nm, excitação linear a 458 nm e emissão recolhidos entre 380 e 500 nm.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.6.6 Análise térmica

A Calorimetria Exploratória Diferencial (*Differential Scanning Calorimetry - DSC*) é um método útil para avaliar a existência de interações entre diferentes componentes de formulações (CRAIG; READING, 2006; SAUNDERS, 2008), que podem, por exemplo, ser evidenciadas por alterações no ponto de fusão e área, alargamento ou aparecimento/desaparecimento dos picos. As curvas DSC foram obtidas com as matérias-primas utilizadas no preparo da nanoemulsão, bem como para a nanoemulsão liofilizada e misturas físicas de tensoativos e quercetina. Os ensaios foram realizados em um Calorímetro Diferencial de Varredura – Perkin Elmer DSC 7, utilizando as seguintes condições experimentais: atmosfera de nitrogênio dinâmica a 30,0 mL/min, faixa de aquecimento 20 - 85° C a 5,0° C/min. Amostras com massas de ~10 mg foram seladas em cadinhos de alumínio e pesadas na ultrabalança Mettler® XP2U (CRAIG; READING, 2006).

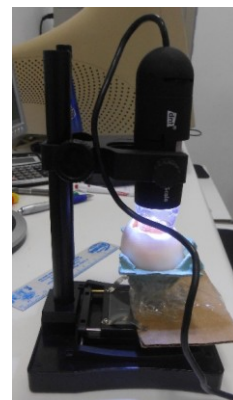
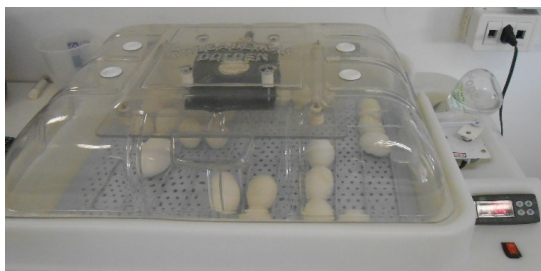
4.2.7 Avaliação do potencial de irritação ocular por método *in vitro* HET-CAM - *Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane*

Ovos de galinhas do tipo *legorne branca*, galados, foram incubados por 10 dias a 37° C e 65% de umidade relativa (UR) na incubadora de ovos Chocmaster® (**Figura 25A**). Após o período de incubação, os ovos foram abertos com auxílio de uma pinça e a membrana da casca foi hidratada com 300 µL de solução fisiológica (NaCl 0,9% p/v), sendo retirada delicadamente com a pinça (**Figura 26**). Posteriormente, o mesmo volume de amostra da nanoemulsão foi depositado sobre a membrana corioalantoide. O controle positivo do teste foi realizado com dispersão de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 1,0% (p/v) e o controle negativo com solução fisiológica (NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS), 2006). O ensaio foi realizado em triplicata.

O ovo foi acomodado em um suporte e a câmera foi posicionada de maneira a gravar as alterações da membrana corioalantoide com nitidez, por 5 min (**Figura 25B**).

4. MATERIAL E MÉTODOS

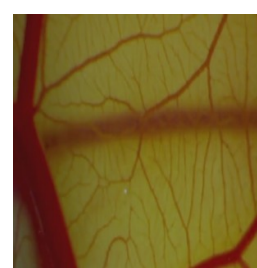
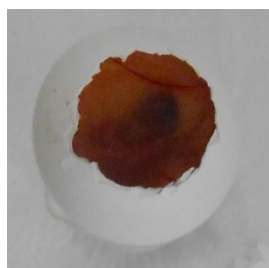
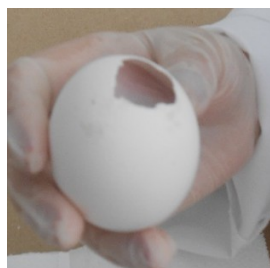
Figura 25. Equipamentos para realização do teste HET-CAM. (A) Incubadora de ovos; (B) Câmera digital



A

B

Figura 26. HET-CAM. (A) Abertura realizada na casca do ovo; (B) Imagem da membrana corioalantoide após procedimento de hidratação com solução fisiológica; (C) Focalização na membrana corioalantoide para gravação dos eventos vasculares



A

B

C

Os eventos vasculares (hemorragia, lise ou coagulação) foram gravados por 5 min (câmera DigiMicro 2.0 Scale) e analisados posteriormente. O índice de irritação ocular (IS) foi calculado de acordo com a **Equação 11** (KALWEIT et al., 1990; NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS), 2006).

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

Equação 11. Índice de irritação ocular (IS), onde: **H** = tempo (s) para iniciar um evento hemorrágico; **L** = tempo (s) para iniciar uma lise vascular; **C** = tempo (s) para iniciar uma coagulação

4. MATERIAL E MÉTODOS

De acordo com a **Equação 11**, os produtos podem ser classificados de acordo com o **Quadro 5**.

Quadro 5. Classificação do potencial de irritação ocular (KALWEIT et al., 1990)

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

4.2.8 Biocompatibilidade da nanoemulsão

O ensaio de biocompatibilidade foi realizado com 12 voluntários do sexo masculino e feminino, com idade média de $24,5 \pm 6,7$ anos, após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Os protocolos experimentais do estudo, bem como o TCLE, foram previamente apresentados e avaliados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde e Tecnologias da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (**Anexo A**). Os procedimentos estavam de acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana e com a Declaração de Helsinki.

Adesivos epicutâneos (Finn Chambers Epitest, Finlândia) foram aplicados sobre os antebraços dos voluntários, mantendo-os em contato com a pele durante 24 h. Cada adesivo apresentava duas câmaras, uma para a nanoemulsão e outra para água destilada (controle negativo). Medidas não-invasivas das propriedades biofísicas da pele foram realizados em cada local de teste. A hidratação do estrato córneo foi avaliada com Corneometer[®] CM 825 (CK Electronics GmbH, Alemanha), e a função de barreira da pele com Tewameter[®] TM 300 (CK Electronics GmbH, Alemanha). O eritema foi quantificado por meio do parâmetro a^* , que está relacionado com a cor vermelha, usando um Chroma Meter Minolta[®] CR-300 (Minolta Camera, Japão). Todas as medições foram realizadas em triplicata. Os valores basais foram determinados antes da aplicação dos adesivos e as outras medições foram realizadas 2 h após a sua remoção (24 h da colocação). Para minimizar o efeito de variabilidade inter-individual, os resultados foram analisados a partir da razão entre os valores obtidos após a aplicação do adesivo e os valores basais (OLIVEIRA et al., 2015). A diferença estatística entre os

4. MATERIAL E MÉTODOS

valores obtidos, antes e após aplicação da nanoemulsão catiônica, foi obtida por teste t para duas médias ($\alpha = 0,05$).

4.2.9 Avaliação de eficácia da nanoemulsão

A eficácia da nanoemulsão na proteção das propriedades de mechas de cabelo tingidas com cores ruivo e loiro, expostas à radiação UV, foi determinada pela avaliação de parâmetros físicos, físico-químicos e químicos: cor do cabelo, propriedade mecânica (tração à ruptura), penteabilidade a seco, fricção e perda proteica. A morfologia das cutículas das fibras capilares foi avaliada por Microscopia de Força Atômica (AFM) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O nível de melanina radical formada durante o processo de exposição à radiação UV, assim como o *Fator de Proteção Radicalar - FPR (Radical Hair Protection Factor - RHF)* foram determinados por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (*Electron Paramagnetic Resonance - EPR*).

4.2.9.1 Amostras de cabelo

4.2.9.1.1 Pré-tratamento

Foram utilizadas mechas de cabelo caucasiano virgens castanho-escuro com 15,0 cm de comprimento e 3,0 cm de largura (DeMeo Brothers[®], NY), que foram pré-tratadas por meio de um procedimento de lavagem para remover quaisquer vestígios de sujidade ou produto cosmético, de acordo com método padronizado. As mechas foram umedecidas por 30 s com água morna ($40,0 \pm 1,0^\circ \text{C}$). Em seguida, foram aplicados 4,0 mL de dispersão de lauril éter sulfato de sódio (10% p/p) e o cabelo foi massageado por 1 min com movimentos suaves utilizando polegar e dedo médio, a partir da raiz até as pontas. As mechas foram, em seguida, enxaguadas durante 1 min com água morna, o excesso de água foi removido, e secaram naturalmente à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$), por pelo menos 24 h (DARIO et al., 2013).

4.2.9.1.2 Procedimentos de descoloração e tintura

Após a secagem, as mechas foram descoloridas com uma mistura de persulfato de amônio e peróxido de hidrogênio (40 vol) (Amend[®]), misturados na proporção 1:2 (p/p), por período de 40 min, seguido pelo procedimento de lavagem descrito anteriormente (*item 4.2.9.1.1*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

As mechas de cabelo foram tratadas com tinturas capilares oxidativas comerciais (Amend[®]). Parte foi tingida com a cor ruivo (6.66) e a outra com a cor loiro (12.0). O produto comercial foi misturado com peróxido de hidrogênio (30 vol), na proporção 1:1 (p/p) e aplicado às mechas na proporção 1:1 (p/p). A reação ocorreu durante 40 min. Após este período, as mechas foram lavadas e secas de acordo com a metodologia descrita anteriormente.

4.2.9.2 Exposição à radiação solar artificial

As mechas permaneceram mergulhadas na nanoemulsão por período de 10 min para possibilitar a penetração da quercetina nanoestruturada pelas camadas da cutícula e córtex (JUNG et al., 2006). Em seguida, o excesso de produto foi retirado utilizando os dedos polegar e médio, a partir da raiz até as pontas. A proporção de produto aplicado foi estimado em 1:1 (p/p) por meio da pesagem das mechas antes e após a realização deste procedimento. As mechas controle foram mergulhadas em água destilada, realizando-se o mesmo procedimento descrito para aquelas tratadas.

As mechas de cabelo foram expostas à radiação solar artificial (UV/Vis) emitida pelo simulador solar Suntest CPS+ (Atlas, Alemanha) equipado com uma lâmpada de xenônio e filtro UV special glass. O teste foi realizado a $35,0 \pm 5,0^\circ \text{C}$; a emissão foi mantida a 500 W/m^2 (300-800 nm), o que corresponde à irradiância de 56 W/m^2 na faixa do UV (300-400nm). As mechas foram expostas durante dois períodos de tempo de 90 h, totalizando 180 h de exposição (FERNANDEZ et al., 2012b; DARIO et al., 2013). Antes de cada período, a nanoemulsão foi reaplicada.

4.2.9.3 Cor

As medidas de cor foram realizadas utilizando o espectrofotômetro Evolution 600 UV/VIS (Thermo Scientific), equipado com acessório de reflectância difusa DRA-EV-600 e os valores do sistema CIE L^* , a^* , b^* foram obtidos no software VISIONlite colorCalc. As medições foram efetuadas em triplicata no meio de cada mecha. Os parâmetros L-a-b foram medidos antes da aplicação da nanoemulsão e após o procedimento de lavagem e secagem realizado para remover o produto após a etapa de exposição à radiação solar artificial. A mudança de cor total das amostras de cabelo foi determinada através do cálculo do parâmetro dE^* , utilizando a **Equação 12** (SCANAVEZ et al., 2000; SIGNORI, 2004).

4. MATERIAL E MÉTODOS

$$dE^* = \{(dL^*)^2 + (da^*)^2 + (db^*)^2\}^{1/2}$$

Equação 12. Cálculo do dE^* = parâmetro de variação de cor total; dL^* = parâmetro que representa a diferença no parâmetro claro-escuro (0 para preto e 100 para branco); da^* = diferença de cor na coordenada verde-vermelho (positivo se mais vermelho e negativo se mais verde); db^* = diferença de cor na coordenada azul-amarelo (positivo se mais amarelo e negativo se mais azul).

A percentagem de proteção oferecida pela nanoemulsão foi calculada de acordo com a **Equação 13** (SIGNORI, 2004).

$$\% \text{ Proteção} = \frac{dE_B - dE_A}{dE_B} \cdot 100$$

Equação 13. Porcentagem de proteção (%), onde: dEB = variação total da cor de cabelos sem tratamento; dEA = variação total da cor de cabelos tratados com a nanoemulsão

4.2.9.4 Tração à ruptura

As curvas tensão-deformação foram obtidas no Dia-stron[®] MTT 175 à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$) e 65% UR. Vinte fios foram selecionados aleatoriamente e crimpados. O ensaio foi realizado à velocidade de 100 mm/min e extensão de 200%. O diâmetro dos fios foi medido com micrômetro Mitutoyo[®], em três posições (raiz, porção média e ponta) e o valor médio foi utilizado para calcular a área transversal da fibra capilar. Esta última variável e a força de ruptura foram utilizados para calcular a tração à ruptura (gmf.mm^{-2}), conforme **Equação 14**. Possíveis diferenças estatisticamente significativas foram verificadas por *teste t* para duas médias ($\alpha = 0,05$).

$$\text{Tração à ruptura} = \frac{\text{Força de ruptura}}{\text{Área transversal da fibra capilar}}$$

Equação 14. Cálculo da Tração à ruptura

4.2.9.5 Penteabilidade

O trabalho total para pentear a seco foi determinado no Dia-stron[®] MTT 175 à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$) e 65% UR. As mechas de cabelo foram inicialmente penteadas 10 vezes usando um pente plástico para desembaraçar os fios, evitando assim danos ao equipamento. Os parâmetros operacionais foram: força de

4. MATERIAL E MÉTODOS

2000g; velocidade do pente de 120 mm/min. Cinco ensaios, no mínimo, foram conduzidos para cada mecha, sendo que entre cada ensaio a mecha era rotacionada 360° por 5 vezes (EVANS; MARSH; WICKETT, 2011). A porcentagem de variação na força necessária para pentear a seco foi calculada comparando-se os valores obtidos para a mesma mecha de cabelo, antes e após a exposição à radiação solar artificial.

4.2.9.6 Fricção

O coeficiente de fricção foi determinado no Dia-stro[®] MTT 175 à velocidade de 600 mm/min, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e 65% UR.

4.2.9.7 Perda proteica

A determinação da perda proteica foi realizada pelo método de Lowry modificado por Peterson (LOWRY et al., 1951; PETERSON, 1977), validado anteriormente em nosso laboratório (GAMA, 2010). Em erlenmeyer foram transferidos 100 mg de cabelo (cortado em fragmentos ~1 cm) e 15 mL de água destilada. A mistura foi sonicada em banho de ultrassom (Ultrasonic Clean[®] 1600 Unique) por 40 min. Posteriormente, 2,0 mL do sobrenadante foram adicionados a 2,0 mL do *Reagente A*. Após 10 min, 1,0 mL do *Reagente B* foi adicionado e a reação ocorreu por 30 min no escuro. A absorbância foi medida a 750 nm no espectrofotômetro Evolution 600 UV-Vis utilizando água destilada como branco de reação (SANDHU; RAMACHANDRAN; ROBBINS, 1995; SILVA; NUNES; GESZTESI, 2004; FARIA et al., 2013). A curva de calibração foi construída utilizando albumina de soro bovino (BSA) e os resultados foram expressos em proteína equivalente em albumina/ massa de cabelo.

Reagente A: no balão volumétrico de 100 mL colocaram-se 25,0 mL de uma solução contendo 0,1% p/v de sulfato de cobre; 0,2% p/v de tartarato de sódio e potássio; 10% p/v de carbonato de sódio; 25,0 mL de uma solução de hidróxido de sódio 0,8N; 25,0 mL de uma solução de dodecilsulfato de sódio 10% p/v. Completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se o conteúdo.

Reagente B: no balão volumétrico de 50 mL, transferiram-se 8,4 mL do reagente de Folin-Fenol Ciocalteau, completando-se o volume com água destilada, seguido de homogeneização.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A análise do impacto da radiação solar artificial, assim como do grau de fotoproteção oferecido pela nanoemulsão nas camadas externas da fibra capilar, foi realizada por meio da obtenção de imagens das cutículas das fibras capilares, por duas técnicas distintas, mas complementares: Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Varredura.

4.2.9.8 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Imagens 3D, 2D e perfil topográfico das cutículas das fibras capilares foram obtidas por AFM no microscópio de força atômica Nanoscope IIIa Multimode (Digital Instruments, Bruker, Santa Barbara), usando pontas de silício (TESP, Bruker) com frequência de ressonância de 300 kHz, e taxa de $\sim 1,5$ Hz, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (SWIFT; SMITH, 2000).

4.2.9.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Três fibras de cada mecha foram recobertas com platina (Baltec MED 020), antes da observação morfológica, utilizando o microscópio eletrônico de varredura (FEI Quanta 600 FEG). Todas as micrografias foram coletadas com voltagem de aceleração de 10 kV, utilizando detector de elétrons secundários, à temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) (SCANAVEZ; SILVEIRA; JOEKES, 2003).

4.2.9.10 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

O nível de melanina radical foi quantificado diretamente por EPR, utilizando amostras de cabelo de 15 cm de comprimento e massa ~ 50 mg. As mechas foram fixadas na superfície externa de um capilar de quartzo de 4 mm de diâmetro e submetidas à espectroscopia de ressonância paramagnética eletrônica em um espectrômetro Bruker EMX de banda X equipado com uma cavidade “Super High Q Cavity”. Os espectros de EPR foram obtidos à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) utilizando os seguintes parâmetros instrumentais: 5 mW de potência de microondas, 1 G de amplitude de modulação, 2,4 G/s de velocidade de varredura e 82 ms de constante de tempo (FERNANDEZ et al., 2012a).

Para obtenção dos espectros de EPR, as mechas de cabelo (tratadas com a nanoemulsão ou não) foram expostas à radiação solar artificial utilizando irradiância de 500 W/m^2 (300-800 nm) por 1 h no simulador solar Suntest[®] CPS+. Os espectros foram obtidos após 10 min do término da exposição UV/visível. O nível de melanina radical

4. MATERIAL E MÉTODOS

foi calculado a partir da dupla integração dos espectros de EPR, no programa Origin[®] (Microcal Software, Inc).

O *Fator de Proteção Radicalar (FPR)* foi calculado utilizando-se a **Equação 15**, que relaciona a quantidade de radicais livres formados no cabelo desprotegido com aquela formada no cabelo ao qual foi aplicada a nanoemulsão (HERRLING; JUNG & FUCHS, 2008).

$$FPR = \frac{N \text{ (radicais livres) desprotegido}}{N \text{ (radicais livres) protegido}}$$

Equação 15. Cálculo do Fator de Proteção Radicalar (FPR)

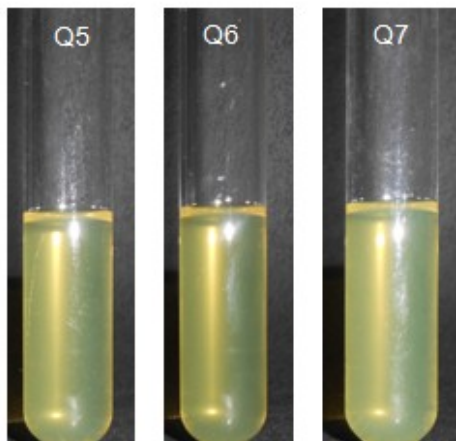
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção das nanoemulsões

As nanoemulsões, em função do reduzido diâmetro de gotícula, apresentam-se transparentes, além de possuírem viscosidade baixa, por vezes muito próxima à da água. Dentre as nove preparações elaboradas, somente três apresentaram aspecto compatível com nanoemulsão (**Q5**, **Q6** e **Q7**) (**Figura 27**), sendo que outras três formaram macroemulsões de aspecto leitoso (**Q1**, **Q3** e **Q4**). Três formulações (**Q2**, **Q8** e **Q9**) apresentaram-se na forma de *Winsor I*, ou seja, composta por fase oleosa (superior) em equilíbrio com fase emulsionada (inferior), sendo que na **Q2** houve acúmulo de quercetina na interface óleo/água. As nanoemulsões **Q8** e **Q9** possuíam fase superior de aparência mais leitosa, provavelmente em função da maior quantidade do tensoativo não-iônico *oleth-20* (sólido branco à temperatura ambiente). Todas apresentaram coloração amarela em função da presença da quercetina. O odor das formulações era característico dos tensoativos utilizados, principalmente dos não-iônicos (*oleth-20* e *oleth-3*).

Figura 27. Aspecto das nanoemulsões desenvolvidas contendo quercetina (0,5% p/p) 48 h após o preparo



Legenda: (% p/p) **Q5** = *oleth-20* (5,03) e *oleth-3* (3,97); **Q6** = *oleth-20* (5,60) e *oleth-3* (3,40); **Q7** = *oleth-20* (6,16) e *oleth-3* (2,84).

5.2 Avaliação de Estabilidade Preliminar

Somente as formulações **Q5** a **Q7** foram submetidas à *Avaliação de Estabilidade Preliminar*, pois as demais apresentaram separação de fases algumas horas após seu preparo ou aspecto de macroemulsão.

As preparações analisadas, como esperado para as nanoemulsões, não apresentaram sinais de instabilidade, sendo cada uma classificada como *Normal* no ensaio. Assim, com a finalidade de escolher uma formulação para ser avaliada no ensaio de *Avaliação de*

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estabilidade Normal, elas tiveram o diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão determinados, sendo os resultados apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Diâmetro médio de gotícula e índice de polidispersão das nanoemulsões

Formulação	D mic _M ± DP (nm)	IPD
Q5	23,55 ± 0,54	0,300
Q6	24,97 ± 0,30	0,272
Q7	29,30 ± 0,46	0,296

Legenda: D mic_M: diâmetro médio de gotícula; DP: desvio padrão; IPD: índice de polidispersão (n=9)

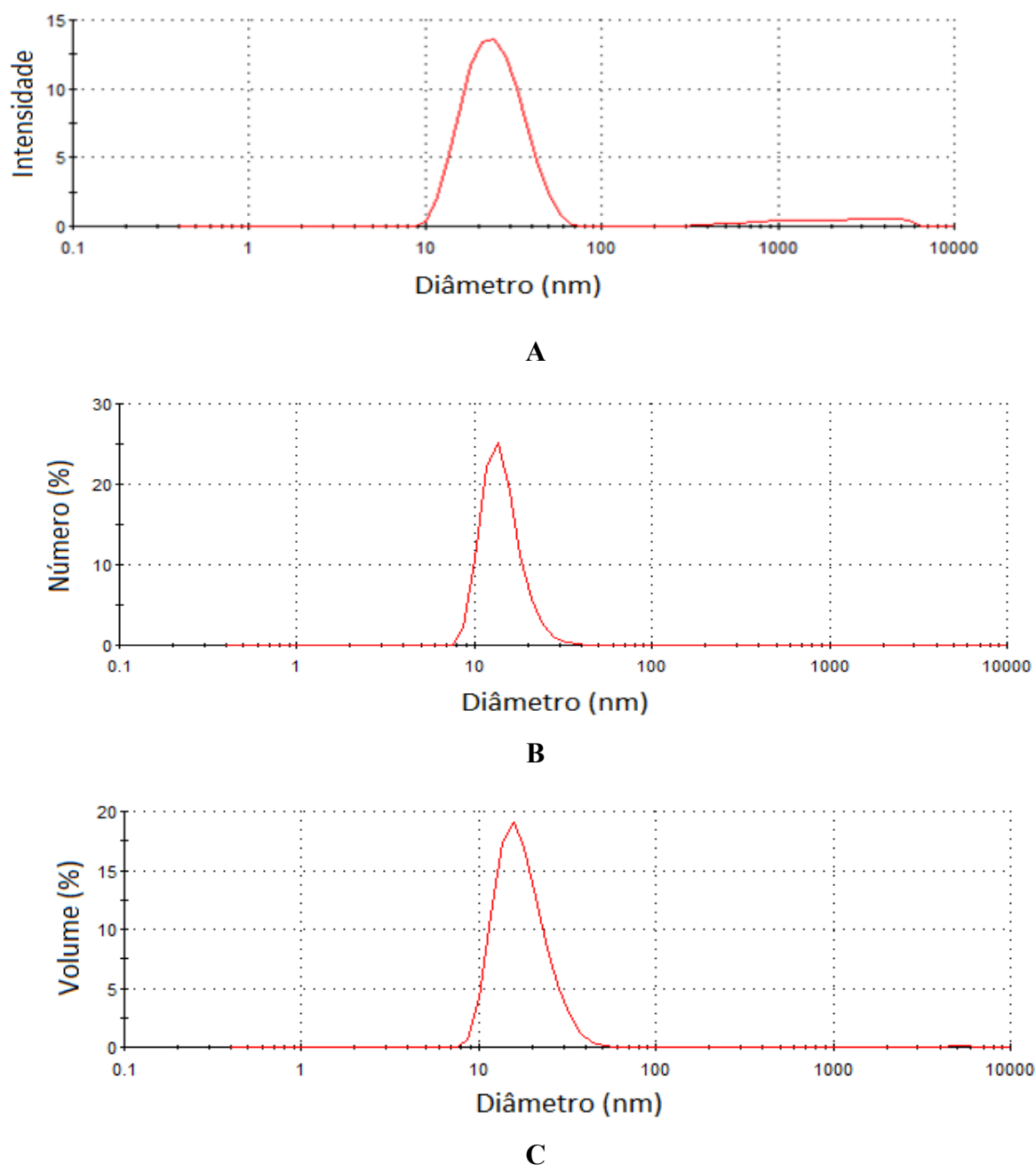
Todas as formulações apresentaram valores referentes ao diâmetro médio de gotícula muito semelhantes, sendo que a escolha baseou-se no índice de polidispersão (IPD), visto que quanto menor a variação entre o tamanho de gotículas, menor será a velocidade do fenômeno de desestabilização denominado *Ostwald ripening*, o mais provável de ocorrer em nanoemulsões.

Assim, a formulação **Q6**, cujos gráficos de distribuição por intensidade, número e volume encontram-se na **Figura 28**, por possuir o menor valor de IPD e diâmetro médio de gotícula compatível, foi selecionada para prosseguir na *Avaliação de Estabilidade Normal*.

Além disso, a partir dos resultados, observou-se que o método de preparo utilizado (sub-PIT) foi eficaz na obtenção da nanoemulsão monodispersa de reduzido diâmetro médio de gotícula (abaixo de 30nm), raramente descrito na literatura, e que o IPD foi adequado, com valor inferior a 0,3 conforme recomendado pela literatura (NEMEN; LEMOS-SENNA, 2011).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 28. Distribuições de diâmetro por intensidade (A), número (B) e volume (C) da nanoemulsão Q6



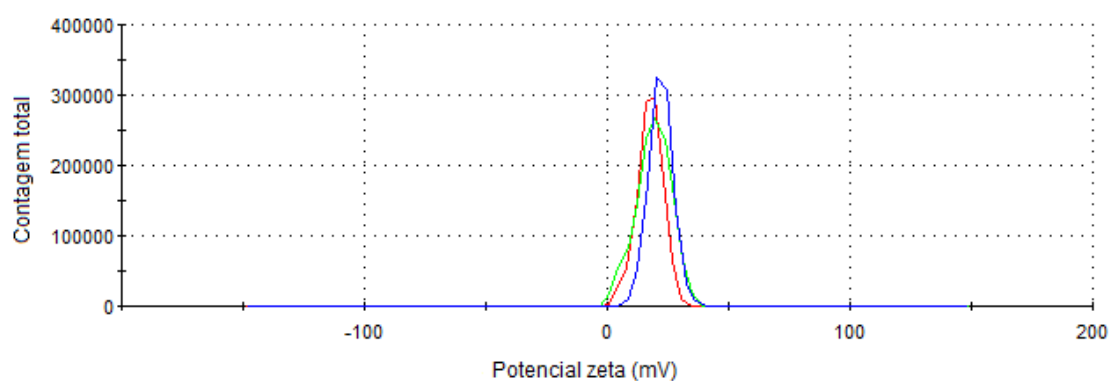
A nanoemulsão Q6, denominada a partir deste momento de *nanoemulsão catiônica*, apresentou potencial zeta positivo ($+19,6 \pm 2,2$ mV), em função da presença do tensoativo catiônico CCTA e pelo emprego do método adequado de preparo (sub-PIT). Valores maiores de potencial zeta, em torno de $|30$ mV], como os recomendados pela literatura (DHAWAN; AGGARWAL; HARIKUMAR, 2014) com a finalidade de minimizar o processo de coalescência entre as gotículas, seriam alcançados com a incorporação de maiores

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

concentrações do tensoativo citado. Porém, desejou-se trabalhar na concentração máxima recomendada (1,0% p/p) pela SCCS com a finalidade de garantir a segurança de aplicação de produto.

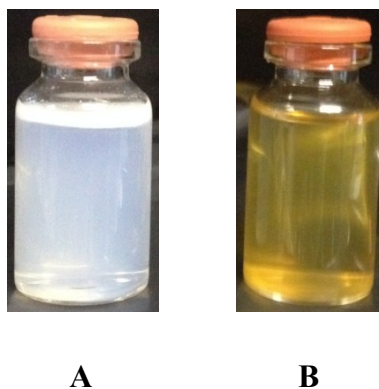
A distribuição de potencial zeta da nanoemulsão, como mostrado na **Figura 29**, indicou homogeneidade de distribuição de cargas nas gotículas.

Figura 29. Distribuição de potencial zeta da nanoemulsão catiônica (n=3)



Uma formulação base de composição semelhante à nanoemulsão catiônica, preparada sem adição de quercetina, foi obtida pelo método sub-PIT. Como pode ser observado na **Figura 30**, a formulação base apresentou-se instável fisicamente, o que sugere a atuação da quercetina como co-tensoativo da formulação, como será discutido mais adiante.

Figura 30. Aspecto macroscópico da formulação base (A) e nanoemulsão catiônica (B)



A

B

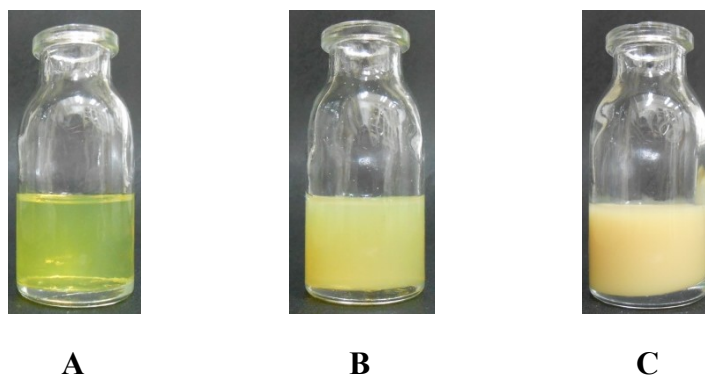
5.3 Avaliação de Estabilidade Normal

Na *Avaliação de Estabilidade Normal*, a nanoemulsão catiônica foi armazenada em diferentes condições de temperatura ($5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$; $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$; $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$) (BRASIL, 2004), sendo avaliados os parâmetros: características organolépticas, valor de pH, diâmetro médio de gotícula, potencial zeta, conteúdo de quercetina e atividade antioxidante equivalente em Trolox[®].

5.3.1 Características organolépticas

A nanoemulsão apresentou alterações de cor e de aparência, principalmente em relação à transparência, nas seguintes condições de armazenamento: $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ e $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$. A $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (**Figura 31A**), nenhuma alteração foi observada ao longo dos 90 dias. Porém, após este período a $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (**Figura 31B**), a nanoemulsão perdeu a transparência mas manteve a coloração amarela. No entanto, a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ (**Figura 31C**), além da opacidade nitidamente observada, a formulação apresentou alteração de cor, apresentando-se laranja/marrom. Estas alterações de cor indicam a ocorrência do processo de oxidação da quercetina, sendo este efeito relacionado à temperatura de armazenamento, pois a oxidação é acelerada por temperaturas mais elevadas (ZENKEVICH et al., 2007; BARNES; FOSS JR.; SCHUG, 2013). O odor da formulação, característico dos tensoativos não-iônicos utilizados, permaneceu inalterado durante todo o período de avaliação, nas diferentes condições de armazenamento.

Figura 31. Aspecto da nanoemulsão catiônica após 90 dias de armazenamento nas diferentes condições de temperatura



Legenda: **A** = $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$; **B** = $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$; **C** = $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

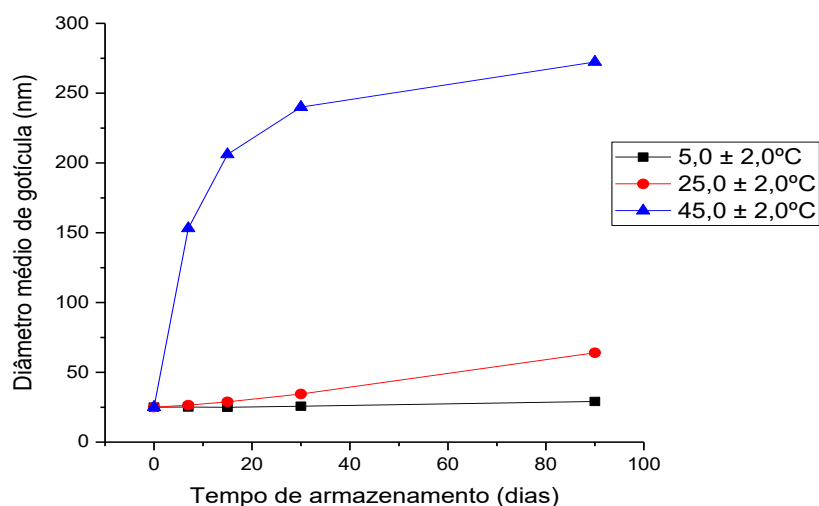
O principal mecanismo envolvido na alteração do diâmetro de gotícula em nanoemulsões, responsável pela redução observada de transparência do sistema, é o fenômeno de desestabilização *Ostwald ripening*, que será discutido detalhadamente no **item 5.3.2**.

5.3.2 Diâmetro médio de gotícula

Na *Avaliação de Estabilidade Normal* observou-se que a condição de temperatura elevada ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) promoveu expressivo aumento no diâmetro médio de gotícula, que alcançou aproximadamente 300 nm, após 90 dias de armazenamento, ou seja, houve elevação de 10 vezes neste parâmetro em relação ao t_0 (**Figura 32**). À temperatura ambiente ($22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$) houve menor variação, sendo que na condição a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, o diâmetro médio de gotícula permaneceu constante. Portanto, a melhor condição de armazenamento da nanoemulsão, considerando apenas o parâmetro diâmetro médio de gotícula, é em baixa temperatura ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$).

O armazenamento a $22,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ por 90 dias promoveu aumento de 2,5 vezes no diâmetro médio de gotícula, porém este parâmetro permaneceu ainda muito reduzido ($\sim 60\text{nm}$), o que viabiliza seu emprego como formulação cosmética, com todos os benefícios que esse tipo de formulação pode apresentar.

Figura 32. Diâmetro médio de gotícula (nm) da nanoemulsão catiônica nas diferentes temperaturas de armazenamento

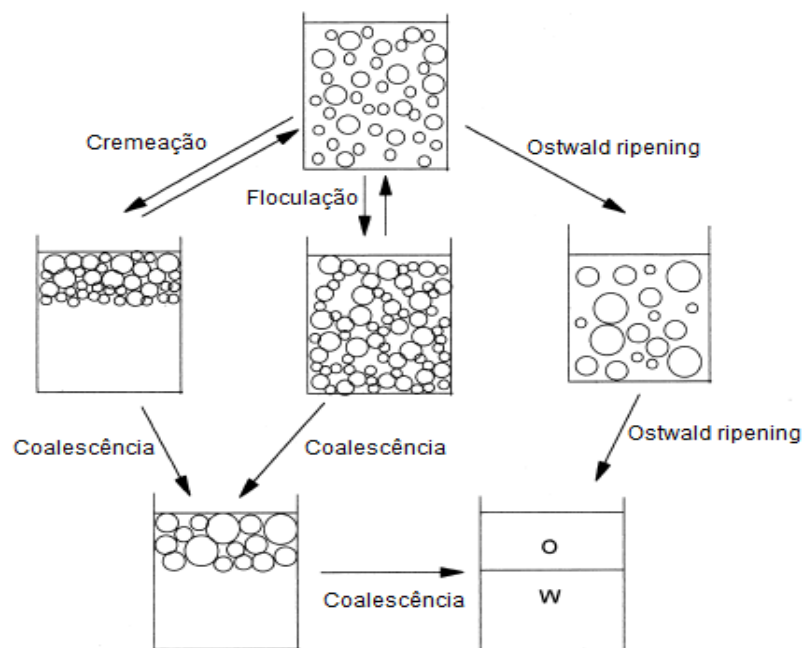


Existem diversos mecanismos de desestabilização de emulsões, como cremeação, floculação e *Ostwald ripening* (**Figura 33**) (TAYLOR, 1998). O reduzido diâmetro médio de

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

gotícula das nanoemulsões as torna resistentes à desestabilização por separação gravitacional, floculação e/ou coalescência. A resistência das nanoemulsões à cremação se deve ao seu elevado movimento Browniano, suficiente para vencer sua baixa força gravitacional. Também, são resistentes à floculação devido à eficiente estabilização estérica em virtude das longas cadeias hidrofílicas dos tensoativos geralmente presentes (TAYLOR, 1998; WOOSTER; GOLDING; SANDUANSRI, 2008).

Figura 33. Representação esquemática dos processos de desestabilização de emulsões (TAYLOR, 1998)



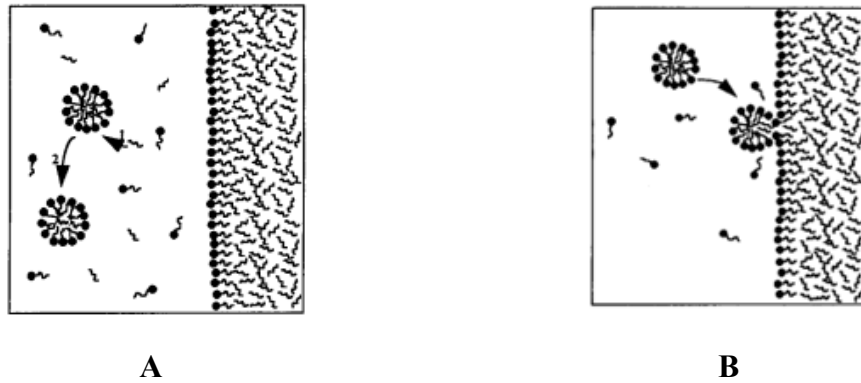
Portanto, o aumento no diâmetro médio de gotícula observado a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ pode ser explicado pelo fenômeno de *Ostwald ripening*, caracterizado pela difusão molecular do óleo entre as gotículas através da fase aquosa. As constantes de *Ostwald ripening* dependem fortemente da solubilidade da fase oleosa na aquosa, como descrito por Lifshitz, Slesov e Wagner (teoria LSW) (TAYLOR, 1998; WOOSTER; GOLDING; SANDUANSRI, 2008). Quando o mecanismo de transferência de massa principal consiste na difusão individual de moléculas de óleo entre as gotículas, como demonstrado na **Figura 34A**, a constante de *Ostwald ripening* (ω_3) é dada pela relação linear entre a variação do raio da gotícula ao cubo (dr^3) e o tempo (dt) (WEISS et al., 1997; WEISS; CANCELIERI; MCCLEMENTS, 2000).

Porém, quando o mecanismo principal se dá pelo transporte das moléculas de óleo por meio de gotículas (ω_2) (**Figura 34B**), o aumento do raio é dado por uma relação linear entre a

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

variação do raio da gotícula ao quadrado (dr^2) e o tempo (dt) (WEISS et al., 1997; WEISS; CANCELIERI; MCCLEMENTS, 2000).

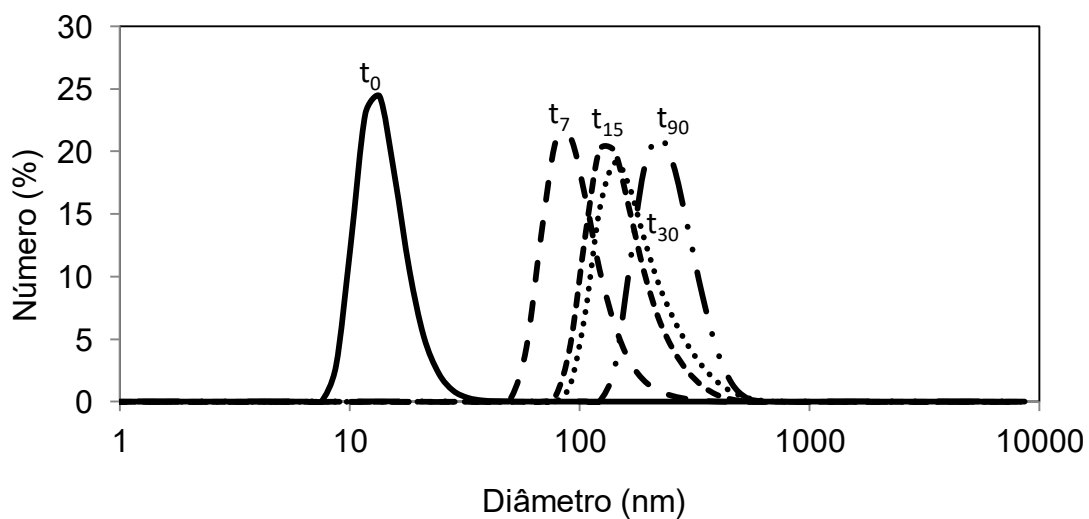
Figura 34. Representação dos mecanismos de solubilização da fase oleosa (WEISS et al., 1997)



Legenda: Mecanismo *Ostwald ripening*: **A** = Solubilização direta das moléculas de óleo na água (ω_3); **B** = Formação espontânea de gotículas contendo fase oleosa, a partir de outra gotícula - Transporte goticular (ω_2).

Como se observou na **Figura 35**, na condição de $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, o número de gotículas apresentou alteração entre t_0 e t_7 (dias), mas permaneceu praticamente constante nos demais períodos analisados. Portanto, uma vez que essa condição tenha se estabelecido, denominada *steady state* (em t_7), as constantes de *Ostwald ripening* podem ser determinadas (TAYLOR, 2003).

Figura 35. Distribuição de tamanho por número da nanoemulsão catiônica armazenada a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, entre t_0 e t_{90} (dias)



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as demais condições de armazenamento, $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ ou $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, considerou-se que a condição *steady-state* foi rapidamente atingida, não sendo possível determinar o momento exato pois o número de gotículas observado permaneceu constante ao longo dos 90 dias de análise.

Na **Tabela 2** encontram-se os valores das constantes de *Ostwald ripening* (ω_2 e ω_3) e os coeficientes de determinação (r^2), que indicam o grau de correlação entre os dois parâmetros (raio da gotícula e tempo).

Tabela 2. Constantes de *Ostwald ripening* para a nanoemulsão catiônica armazenada em diferentes condições de temperatura

Condição de armazenamento	ω_2 ($\text{nm}^2 \text{s}^{-1}$)	r^2 (ω_2)	ω_3 ($\text{nm}^3 \text{s}^{-1}$)	r^2 (ω_3)
$5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$	$5,4 \times 10^{-6}$	0,96	$9,3 \times 10^{-5}$	0,96
$25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$	$8,3 \times 10^{-5}$	0,97	$2,5 \times 10^{-6}$	0,95
$45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$	$1,2 \times 10^{-3}$	0,84	$2,4 \times 10^{-1}$	0,94

Legenda: ω_2 = constante de *Ostwald ripening* - transporte goticular; ω_3 = constante de *Ostwald ripening* - transporte individual; r^2 = coeficiente de determinação.

Como se pode observar, para a condição de $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, existe uma correlação linear ($r^2 = 0,94$) entre a variação do raio da gotícula ao cubo (dr^3) e tempo (dt), confirmando que o fenômeno de difusão individual de moléculas de óleo entre as gotículas (como exemplificado na **Figura 34A**) é o principal mecanismo que promove o aumento do seu diâmetro (TAYLOR, 2003). Além disso, a relação entre variação do raio ao quadrado (dr^2) e tempo (dt) não apresentou resultado semelhante ($r^2 = 0,84$), confirmando o tipo de instabilidade que predomina, em condição de temperatura elevada ($45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$).

Observou-se, também, que na condição de armazenamento a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ são observados os maiores valores das constantes de *Ostwald ripening*, porque a solubilidade da fase oleosa aumenta normalmente com a elevação da temperatura, o que propicia esse fenômeno de instabilidade (TAYLOR, 2003).

A $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ ou $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ não houve o fenômeno de desestabilização prevalente porque os coeficientes de determinação foram muito similares. Os valores das constantes de *Ostwald ripening* a $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ ($\omega_2 = 8,3 \times 10^{-5} \text{nm}^2 \text{s}^{-1}$ e $\omega_3 = 2,5 \times 10^{-6} \text{nm}^3 \text{s}^{-1}$) foram menores que os reportados por Wooster *et al.* (2008), igual a $0,0483 \text{nm}^3 \text{s}^{-1}$, que avaliou fase

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

oleosa composta por triglicérides de ácido cáprico/caprílico estabilizada em nanoemulsão por SDS-PEG, mantida à temperatura ambiente (WOOSTER; GOLDING; SANDUANSRI, 2008). Este comportamento sugeriu que a nanoemulsão catiônica desenvolvida neste trabalho apresentou maior estabilidade que essa descrita na literatura.

5.3.3 Potencial zeta

Em relação ao potencial zeta da nanoemulsão catiônica, observou-se que não houve alterações significativas em todas as condições de armazenamento (**Tabela 2**), de acordo com a análise estatística (ANOVA, $\alpha = 0,05$).

Tabela 3. Potencial zeta (mV) da nanoemulsão catiônica bioativa nas diferentes temperaturas de armazenamento

tempo (dias)	Condição de armazenamento		
	5,0 ± 2,0° C	25,0 ± 2,0° C	45,0 ± 2,0° C
	Potencial zeta (mV)		
0		19,6 ± 2,19	
7	19,3 ± 2,8	18,2 ± 1,6	22,4 ± 1,4
15	16,6 ± 0,9	17,2 ± 2,7	23,6 ± 2,7
30	16,7 ± 1,9	16,9 ± 1,4	22,9 ± 2,2
60	16,6 ± 1,6	16,0 ± 2,2	18,8 ± 1,7
90	19,4 ± 2,3	20,9 ± 1,1	23,4 ± 1,4

5.3.4 Potencial hidrogeniônico (pH)

Alterações no valor de pH de formulações podem indicar a ocorrência de alguma reação química, incluindo degradação dos componentes presentes e oxidação (AULTON, 2005).

Em relação à nanoemulsão catiônica desenvolvida, os valores de pH permaneceram inalterados na condição de baixa temperatura (5,0 ± 2,0° C) e apresentou redução de 6% a 25,0 ± 2,0° C, e 18% quando armazenada a 45,0 ± 2,0° C (**Tabela 4**), sendo o grau de alteração dependente do tempo de armazenamento. Isto pode indicar a aceleração do processo de oxidação de grupos hidroxilas presentes na molécula da quercetina, processo que foi confirmado por meio da avaliação da atividade antioxidante e quantificação do conteúdo de quercetina da nanoemulsão (resultados que serão apresentados adiante). Portanto, a condição

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

de armazenamento em baixa temperatura e temperatura ambiente parecem ser as mais indicadas. Apesar de ter sido observada alteração durante o tempo de armazenamento à temperatura ambiente, o pH permaneceu dentro do valor fisiológico (4,5 - 6,5) e empregado em muitas formulações cosméticas capilares, principalmente em condicionadores (HALAL, 2009).

Tabela 4. Valores de pH (n = 3) nas diversas condições estudadas na *Avaliação de Estabilidade Normal*

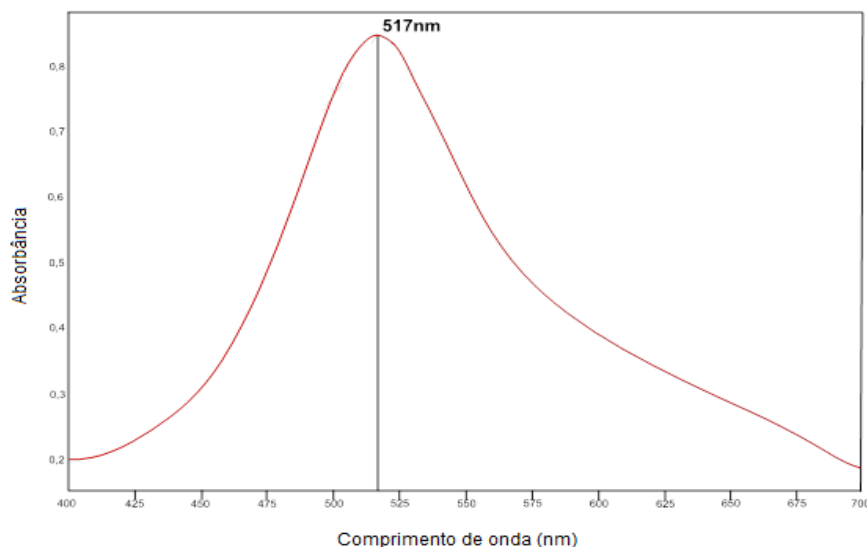
tempo (dias)	Condição de armazenamento		
	5,0 ± 2,0° C	25,0 ± 2,0° C	45,0 ± 2,0° C
	pH		
0	5,45 ± 0,01 ^A		
7	5,4 ± 0,01 ^A	5,4 ± 0,01 ^A	5,0 ± 0,01 ^B
15	5,5 ± 0,01 ^A	5,4 ± 0,01 ^B	4,9 ± 0,01 ^C
30	5,4 ± 0,02 ^A	5,3 ± 0,02 ^B	4,4 ± 0,02 ^D
60	5,5 ± 0,01 ^A	5,2 ± 0,02 ^C	4,2 ± 0,02 ^E
90	5,5 ± 0,01 ^A	5,1 ± 0,02 ^D	4,1 ± 0,03 ^F

Legenda: t₀ = 48 h após o preparo da nanoemulsão catiônica. Valores que não compartilham uma letra, dentro da mesma coluna, são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey ($\alpha = 0,05$).

5.3.5 Atividade antioxidante

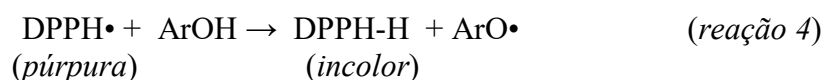
5.3.5.1 Determinação do $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do DPPH·

Um varredura de comprimentos de onda (λ) foi realizada entre 400 e 700 nm com a finalidade de determinar o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do DPPH·, utilizado nas demais determinações de absorbância, visto que este parâmetro pode variar em função do solvente utilizado. Como branco de reação, foi utilizado etanol absoluto P.A. Como pode ser observado na **Figura 36**, o $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção do DPPH· no mesmo solvente ocorreu em 517 nm, como descrito na literatura (SHARMA; BHAT, 2009).

Figura 36. Curva de absorção do radical livre estável DPPH• em etanol absoluto P.A.

5.3.5.2 Curva analítica de Trolox® padrão de referência secundário

O DPPH• é um radical livre estável que apresenta inicialmente coloração púrpura, detectada a 517 nm, como constatado anteriormente. Porém, a intensidade da cor é diminuída ou desaparece quando o radical é reduzido por um agente antioxidante (*reação 4*), de maneira que quanto menor a intensidade da cor ao final da reação, maior a atividade antioxidante do composto estudado (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SHARMA; GOYAL, 2012).



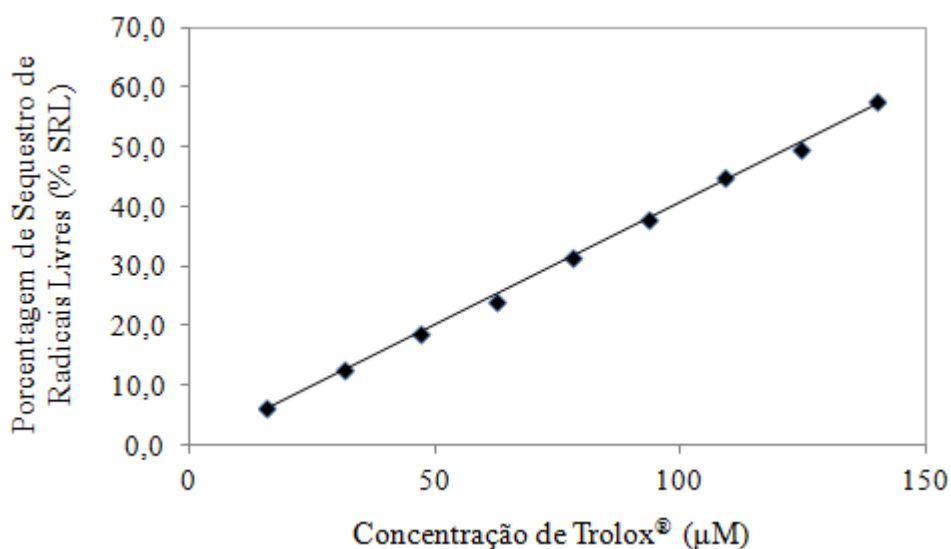
Valores de atividade antioxidante são, geralmente, apresentados em função de um antioxidante padrão reconhecido de concentração conhecida. O Trolox®, por ser um composto antioxidante muito utilizado e descrito na literatura, foi escolhido como padrão de referência neste trabalho. Os dados necessários para construção da curva analítica (**Figura 37**) que relaciona a concentração de Trolox® padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) à porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL), obtidos segundo **Equação 4**, encontram-se na **Tabela 5**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 5. Dados utilizados para construção da curva analítica de Trolox[®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%)

Conc. Trolox [®] (μM)	Abs _M \pm DP	%SRL _M \pm DP
15,52	0,888 \pm 0,006	6,29 \pm 0,58
31,04	0,828 \pm 0,009	12,62 \pm 0,95
46,56	0,771 \pm 0,001	18,71 \pm 0,06
62,08	0,719 \pm 0,003	24,12 \pm 0,32
77,60	0,649 \pm 0,006	31,54 \pm 0,59
93,12	0,589 \pm 0,008	37,83 \pm 0,85
108,64	0,521 \pm 0,010	45,08 \pm 1,02
124,16	0,476 \pm 0,013	49,75 \pm 1,32
139,68	0,402 \pm 0,014	57,63 \pm 1,50

Legenda: **Conc.:** Concentração; **DP:** Desvio padrão; **Abs_M:** Absorbância média (triplicata); **%SRL_M:** Média dos valores de porcentagem de sequestro de radicais livres.

Figura 37. Curva analítica de Trolox[®] padrão de referência secundário (teor de pureza 97,0%) em função da porcentagem de sequestro de radicais livres

A equação de reta que relaciona concentração de Trolox[®] e %SRL encontra-se na

Equação 16.

$$y = 0,4115x - 0,4239$$

Equação 16. Equação de reta que relaciona concentração de Trolox[®] e %SRL, onde: **y** = % Sequestro de radicais livres; **x** = concentração de Trolox[®] (μM), com $r^2 = 0,9988$, valor de acordo com a exigência da legislação (BRASIL, 2003)

5.3.5.3 Atividade antioxidante da nanoemulsão

Os valores de absorvância obtidos para a nanoemulsão (nas diferentes condições e tempo de armazenamento) após a reação com o radical livre DPPH· foram traduzidos em termos de %SRL (**Equação 4**) que, por sua vez, foram substituídos na **Equação 16**, sendo os valores de atividade antioxidante expressos em concentração de Trolox[®] equivalente, apresentados na **Tabela 6**.

Na condição a $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ ou a $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ não foram observadas alterações significativas na atividade antioxidante da nanoemulsão catiônica, conforme análise estatística realizada (ANOVA, $\alpha = 0,05$). Porém, a condição de armazenamento a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ promoveu modificação significativa na atividade antioxidante da nanoemulsão catiônica, observando-se redução de cerca de 25% após 90 dias. Esses resultados corroboram com a alteração nos valores de pH e de coloração da formulação (que adquiriu cor laranja/marrom), como anteriormente apresentados, e indicam a sensibilidade da quercetina a temperaturas elevadas. Estes resultados são mais um indicador de que as condições ideais de armazenamento são temperatura ambiente ou baixa temperatura, ou seja, abaixo de $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$.

À temperatura ambiente, foi demonstrado que a quercetina em solução aquosa degrada-se por oxidação, sendo esse processo acelerado por temperaturas mais elevadas ou adição de metais que catalizam a reação (BARNES; FOSS JR.; SCHUG, 2013). Apesar dos resultados apresentados, a $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ ou a $25,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, a atividade antioxidante se manteve constante. Mesmo a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, somente após 90 dias foi observada alteração significativa desse parâmetro. Este resultado é bastante interessante e demonstrou a elevada estabilidade da quercetina, conforme já demonstrado na literatura científica (BANOV et al., 2006).

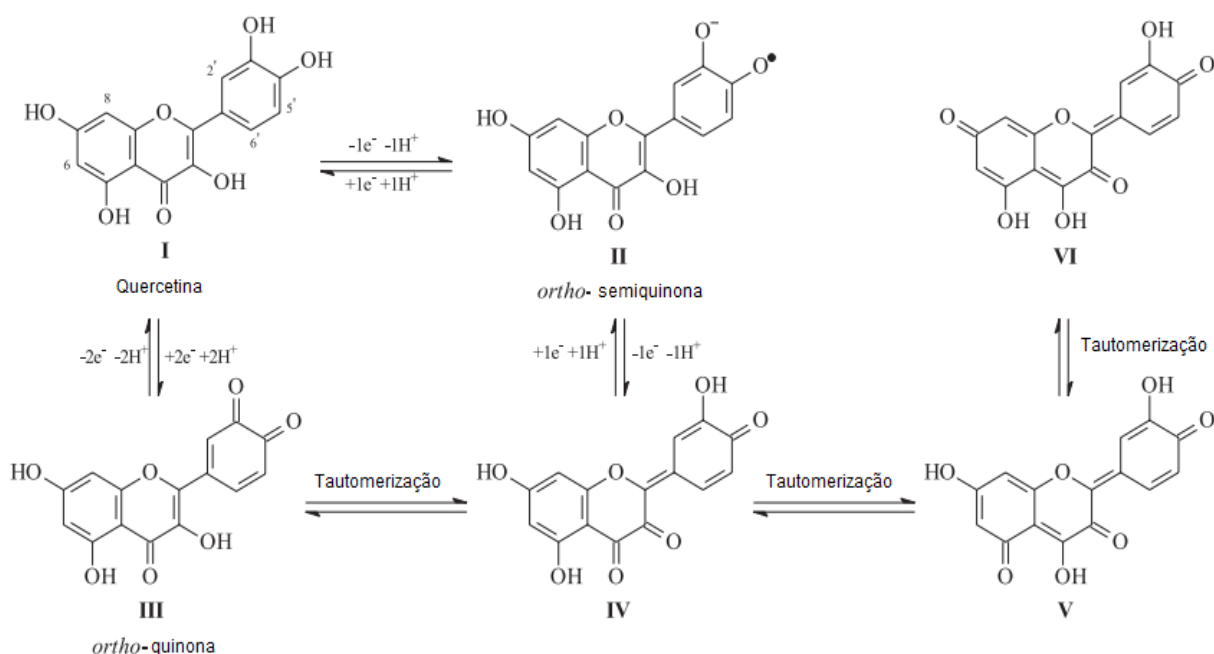
O grupo catecol, presente no anel **B** da quercetina, é o principal responsável pela sua atividade antioxidante seguido, em reduzida importância, pela hidroxila 7OH do anel **A**. Como demonstrado pela **Figura 38**, pressupõem-se que durante o armazenamento em estufa, ocorre oxidação do grupo catecol de parte das moléculas de quercetina com a formação de uma quinona e seus tautômeros que apresentam reduzida atividade antioxidante, como descrito por Timbola *et al.* (2006), sendo que a nanoemulsão a $45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$ continua apresentando atividade antioxidante ($37,74 \pm 2,16 \mu\text{M trolox}^\circ/\mu\text{L nanoemulsão}$) ao final do experimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Atividade antioxidante da nanoemulsão catiônica equivalente em concentração de Trolox® ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{L nanoemulsão}$) (n=3)

t (dias)	Condição de armazenamento		
	$5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$	$25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$	$45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$
Atividade antioxidante ($\mu\text{M Trolox}^{\text{®}}/\mu\text{L nanoemulsão}$)			
0	$50,20 \pm 4,56^{\text{A}}$		
7	$54,87 \pm 1,62^{\text{A}}$	$50,30 \pm 0,75^{\text{A}}$	$50,70 \pm 1,23^{\text{A}}$
15	$54,97 \pm 0,74^{\text{A}}$	$50,22 \pm 1,30^{\text{A}}$	$50,72 \pm 1,22^{\text{A}}$
30	$55,88 \pm 1,41^{\text{A}}$	$50,46 \pm 0,86^{\text{A}}$	$53,00 \pm 1,11^{\text{A}}$
60	$55,36 \pm 2,46^{\text{A}}$	$52,20 \pm 4,89^{\text{A}}$	$51,36 \pm 3,67^{\text{A}}$
90	$51,68 \pm 3,08^{\text{A}}$	$46,81 \pm 1,81^{\text{A}}$	$37,74 \pm 2,16^{\text{B}}$

Legenda: t = dias; Geladeira ($5,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$); Temperatura ambiente ao abrigo da luz ($25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$); Estufa ($45,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$); Valores que não compartilham uma letra, dentro da mesma coluna, são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Figura 38. Sequência de reações indicando a formação de espécies de quinona a partir da quercetina (TIMBOLA et al., 2006)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esses resultados corroboram o que foi discutido anteriormente, em relação à possibilidade de se considerar o armazenamento da nanoemulsão à temperatura ambiente, na qual normalmente os medicamentos e cosméticos são armazenados, visto que a atividade antioxidante permaneceu inalterada de acordo com a análise estatística realizada. Este é o principal parâmetro a ser considerado, pois a eficácia antioxidante da nanoemulsão é fundamental para sua ação fotoprotetora nas mechas de cabelo.

5.3.6 Conteúdo de quercetina

5.3.6.1 Validação do método de quantificação de quercetina

a) Linearidade e Curva analítica

A **Tabela 7** foi construída com os valores médios de absorvância obtidos a partir das concentrações do padrão secundário de quercetina, de 3,0 a 10,0 µg/mL. A partir das médias dos dados apresentados, foi construída a **Figura 39**, obtendo-se uma curva linear, cuja equação de reta encontra-se descrita na **Equação 17**.

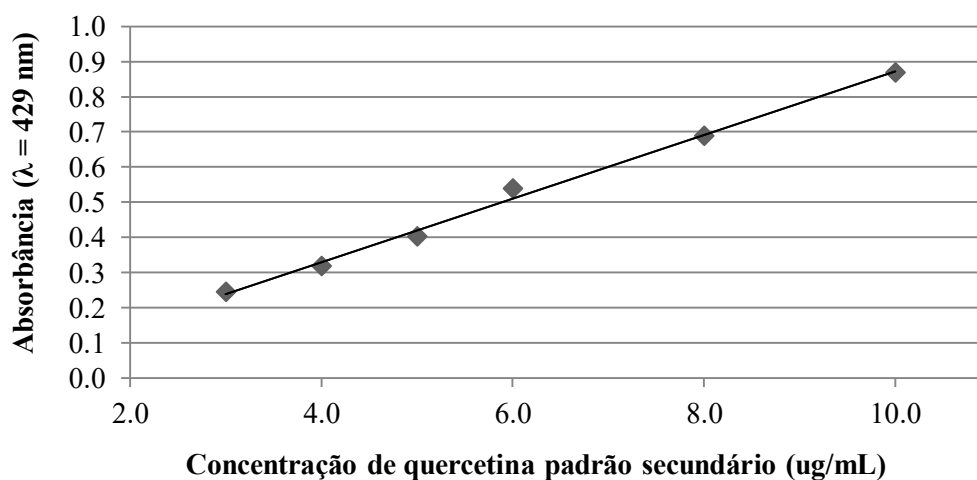
Tabela 7. Absorbâncias médias (n = 6) a 429nm para elaboração da curva analítica, utilizando padrão secundário de quercetina (teor de pureza 100,0%)

Conc. padrão quercetina (µg/mL)	Absorbância					
	Curvas					Média ± DP
	A	B	C	D	E	
3,0	0,248	0,247	0,244	0,246	0,242	0,245 ± 0,002
4,0	0,323	0,308	0,323	0,317	0,323	0,319 ± 0,007
5,0	0,403	0,4	0,408	0,4	0,404	0,403 ± 0,003
6,0	0,546	0,535	0,539	0,54	0,536	0,539 ± 0,004
8,0	0,675	0,673	0,687	0,708	0,702	0,689 ± 0,016
10,0	0,883	0,874	0,858	0,839	0,891	0,869 ± 0,021

Legenda: **Conc.:** concentração; **A, B, C, D e E:** réplicas da curva analítica; **DP:** desvio padrão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 39. Curva analítica média para quercetina padrão secundário (teor de pureza 100,0%) a partir das absorvâncias médias (n = 6) a 429 nm



$$y = 0,0905x - 0,0323$$

Equação 17. Equação da curva analítica que correlaciona absorvância (y) e concentração (x) de quercetina (µg/mL), com $r^2 = 0,9954$

O valor do coeficiente de correlação linear $r^2 = 0,9954$ está de acordo com o critério de aceitação previsto por diversos órgãos, que exigem o valor de $r^2 \geq 0,99$ (BRASIL, 2003; FDA, 2001).

b) Precisão e Exatidão

A precisão, definida como desvio padrão relativo (DPR), é considerada aceitável quando encontra-se abaixo de 15% (BRASIL, 2003; FDA, 2015). Na **Tabela 8** encontram-se as concentrações de quercetina obtidas a partir de 10 réplicas (cujas absorvâncias foram medidas em triplicata) para cálculo de precisão intra-dia (repetibilidade) e inter-dia (intermediária), de acordo com a **Equação 5**. A precisão inter-dia foi obtida variando-se o analista e o dia de ensaio. Como pode-se observar, os valores de precisão estão dentro do intervalo aceitável: 1,51 e 0,72% (precisão intra-dia) e 1,16% (precisão inter-dia).

Na **Tabela 9** encontram-se os valores utilizados para cálculo da exatidão. Conforme apresentado, o método apresenta exatidão aceitável, pois segundo a legislação, os valores obtidos experimentalmente devem estar dentro de uma faixa de 15% da concentração teórica, ou seja, entre 85 e 115% (BRASIL, 2003; FDA, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 8. Concentrações de quercetina ($\mu\text{g/mL}$) nas nanoemulsões formuladas com 0,5% p/p de quercetina (teor de pureza = 91%) para cálculo de precisão intra-dia e inter-dia

	L ₁	L ₂	L ₃	C _{média} ± DP	Precisão intra-dia (%)	Precisão inter-dia (%)
	% p/p					
C1	4,95	4,96	4,95	4,95 ± 0,01	1,51	1,16
C2	4,85	4,83	4,85	4,84 ± 0,01		
C3	4,86	4,85	4,86	4,86 ± 0,01		
C4	4,96	4,97	4,97	4,97 ± 0,01		
C5	4,85	4,84	4,83	4,84 ± 0,01		
C6	4,80	4,80	4,80	0,48 ± 0,00		
C7	5,02	5,00	5,01	4,80 ± 0,00		
C8	4,86	4,89	4,97	5,01 ± 0,01		
C9	4,98	5,02	5,01	5,00 ± 0,02		
C10	4,92	4,91	4,92	4,92 ± 0,01		
C_{ID1}				4,91 ± 0,07		
C11	4,87	4,86	4,87	4,87 ± 0,01	0,72	
C12	4,90	4,91	4,91	4,91 ± 0,01		
C13	4,95	4,94	4,94	4,94 ± 0,01		
C14	4,93	4,91	4,91	4,92 ± 0,01		
C15	4,94	4,97	4,95	4,95 ± 0,01		
C16	4,93	4,93	4,95	4,94 ± 0,01		
C17	4,89	4,90	4,90	4,90 ± 0,01		
C18	4,97	4,98	4,99	4,98 ± 0,01		
C19	4,98	4,96	4,98	4,97 ± 0,01		
C20	4,95	4,92	4,92	4,93 ± 0,02		
C_{ID2}				4,93 ± 0,04		

Legenda: C_{ID}: Concentração média das 30 leituras; L: Leituras das amostras; C_{média}: concentração média da leitura em triplicata; DP: desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 9. Exatidão do método de quantificação de quercetina na nanoemulsão (triplicata de leitura)

Concentração de quercetina ($\mu\text{g/mL}$)				Exatidão (%)
Conc. quercetina nanoemulsão	Conc. P_{ad}	Conc. Teórica	Conc. Experimental	
4,55	1,0	5,55	5,99	107,9
	2,0	6,55	7,13	108,8
	3,0	7,55	8,22	108,9

Legenda: **Conc.:** concentração; **P_{ad}** - Padrão de quercetina adicionado

c) Limites de detecção e de quantificação

Os limites de detecção e de quantificação calculados a partir dos parâmetros da curva analítica foram, respectivamente, 0,39 e 1,19 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, o intervalo da curva analítica (3,0-10 $\mu\text{g/mL}$) foi considerado aceitável, pois encontra-se acima dos LOQ e LOD.

d) Especificidade

A pesquisa de interferentes ou especificidade do método foi realizada a partir da determinação de quercetina na formulação base (sem adição de quercetina). Como pode-se observar na **Tabela 10**, o método pode ser considerado específico, pois os valores de absorbância foram próximos de zero, não havendo absorção dos ingredientes da formulação nem formação de complexos com Al^{3+} detectável no comprimento de onda utilizado ($\lambda = 429$ nm).

Tabela 10. Absorbâncias a 429 nm da formulação base (sem adição de quercetina)

Leitura	Absorbância
L1	-0,002
L2	-0,002
L3	0,000
L4	-0,002
L5	-0,002
L6	-0,002
L7	-0,002
L8	0,000
L9	-0,002
Média \pm DP	-0,002 \pm 0,001

Legenda: **L1 a L9** – réplicas da mesma amostra

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.6.2 Quantificação de quercetina na nanoemulsão catiônica

A porcentagem de quercetina na nanoemulsão apresentou-se constante durante todo o período de avaliação quando a formulação foi armazenada a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ ou $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$. Porém, houve variação estatisticamente significativa quando armazenada a $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, apesar da variação ter sido muito sutil (redução de 9,1%), como pode ser verificado na **Tabela 11**. Esta redução está dentro dos limites de aceitação farmacopeicos (90 - 110%) normalmente encontrados para fármacos (UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, 2014). A capacidade de estabilização da quercetina na nanoemulsão foi considerada muito boa, pois foi adicionado 0,5% (p/p), ou seja, 0,46% em função da correção de concentração (teor de quercetina na matéria-prima = 91,0%) e, tanto a $5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$ quanto a $25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, a concentração se manteve constante por 90 dias. A $45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$, como esperado, ocorreu degradação mais rápida, porém a variação foi muito pequena ao longo dos 90 dias de armazenamento.

Tabela 11. Porcentagem de quercetina na nanoemulsão (p/p) avaliados em 90 dias de armazenamento, em diferentes condições de temperatura (n = 3)

t (dias)	Condição de armazenamento		
	$5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$	$25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$	$45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$
	Porcentagem de quercetina na nanoemulsão (% p/p)		
0	$0,47 \pm 0,01^A$		
7	$0,47 \pm 0,01^A$	$0,48 \pm 0,01^A$	$0,46 \pm 0,02^A$
15	$0,46 \pm 0,01^A$	$0,47 \pm 0,01^A$	$0,47 \pm 0,01^A$
30	$0,46 \pm 0,02^A$	$0,46 \pm 0,04^A$	$0,45 \pm 0,01^{AB}$
60	$0,47 \pm 0,01^A$	$0,46 \pm 0,01^A$	$0,42 \pm 0,01^B$
90	$0,48 \pm 0,04^A$	$0,47 \pm 0,01^A$	$0,40 \pm 0,01^B$

Legenda: Geladeira ($5,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$); Temperatura ambiente ao abrigo da luz ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$); Estufa ($45,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$); Valores que não compartilham uma letra, na mesma coluna, são significativamente diferentes pela análise estatística por ANOVA seguida de Tukey ($\alpha = 0,05$).

A quercetina livre apresenta duas bandas de absorção, uma em 368 - 372 nm, que corresponde às transições eletrônicas que ocorrem no anel **B**, e a segunda em 255 nm que corresponde ao anel **A**. Porém, o aumento na concentração do íon Al^{3+} , acarreta em um desvio batocrômico pois a banda de 372 nm desaparece com o surgimento de outra em aproximadamente 430nm, referente ao *complexo I* (PEKAL; PYRZYNSKA, 2014).

Como o método de quantificação de quercetina utilizado baseou-se na absorbância do *complexo I* formado entre o íon Al^{3+} , 4-oxo e 3OH (incluindo os efeitos causados na

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

ressonância dos anéis **B** e **C**), alterações nesses dois anéis explicariam a degradação observada.

Segundo Barnes *et al.* (2013), a quercetina apresenta limitada degradação à temperatura ambiente e em pH levemente ácido (5,9), sendo que o processo de degradação se acelera na faixa entre 65 a 85° C. Inicialmente, seria observada a desprotonação das hidroxilas 4'OH e 7OH. Além disso, é possível a ocorrência de uma hidroxilação em C2, com a perda da dupla ligação C2 = C3 e, conseqüentemente, da estabilização por ressonância no grupo 4-oxo. Posteriormente, o contínuo processo de degradação pode levar à oxidação por adição nucleofílica (grupo OH) e a quebras na molécula por diversas vias.

Portanto, o armazenamento em temperatura elevada ($45,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$) é o menos indicado para a nanoemulsão catiônica desenvolvida visto que foi observado aumento expressivo no diâmetro médio de gotícula e redução da atividade antioxidante, porém as alterações de pH e no teor de quercetina foram bastante sutis. Em temperatura ambiente não foram observadas modificações que justificassem a exclusão dessa temperatura de armazenamento, apesar da elevação do número médio de gotícula que causou alteração na aparência da formulação, sem prejuízo de sua funcionalidade. A $5,0 \pm 2,0^\circ \text{C}$, todos os parâmetros foram mantidos constantes, inalterados, incluindo a aparência da formulação sendo, assim, uma excelente opção de armazenamento, seguida da temperatura ambiente.

5.4 Fotoestabilidade da nanoemulsão

O perfil de absorção da quercetina na nanoemulsão aplicada na placa de PMMA é mostrado na **Figura 40**. A molécula de quercetina apresentou duas bandas principais de absorção na região do UV-Vis. A *Banda I* a 370 nm corresponde ao anel **B** (sistema cinamoil) e a *Banda II* em 260 nm ocorre devido à absorção do anel **A** (sistema benzoil) (DALL'ACQUA et al., 2012). A radiação UV/Vis causou redução na absorção do sistema cinamoil, como pode ser observado na **Figura 40**. A quercetina incorporada na nanoemulsão foi, no entanto, muito fotoestável (DALL'ACQUA et al., 2012) uma vez que após a exposição a uma dose elevada de radiação UV/Vis ($1,4 \text{ kJ/cm}^2$), apenas 50% da quercetina na nanoemulsão foi degradada.

Embora a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do sistema cinamoil tenha sido afetada pela radiação UV/Vis, a atividade antioxidante não se alterou de forma significativa (**Figura 41**). Esta inconsistência aparente pode ser explicada pelo fato da atividade antioxidante da quercetina estar essencialmente relacionado com o grupo catecol presente no anel **B**, com contribuição

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

menor da hidroxila 7OH do anel A (TIMBOLA et al., 2006). Portanto, a hidroxilação acima mencionada em C2, com a perda da ligação dupla C2 = C3 (BARNES; FOSS JR.; SCHUG, 2013) pode ser responsável pela diminuição da absorção a 370 nm (transição $\pi \rightarrow \pi^*$ do grupo cinamoil) sem redução significativa da atividade antioxidante (**Figura 41**).

Figura 40. Espectro de absorção (250 - 450 nm) da nanoemulsão exposta a doses crescentes de radiação UV/Vis (0 - 1,4 kJ/cm²)

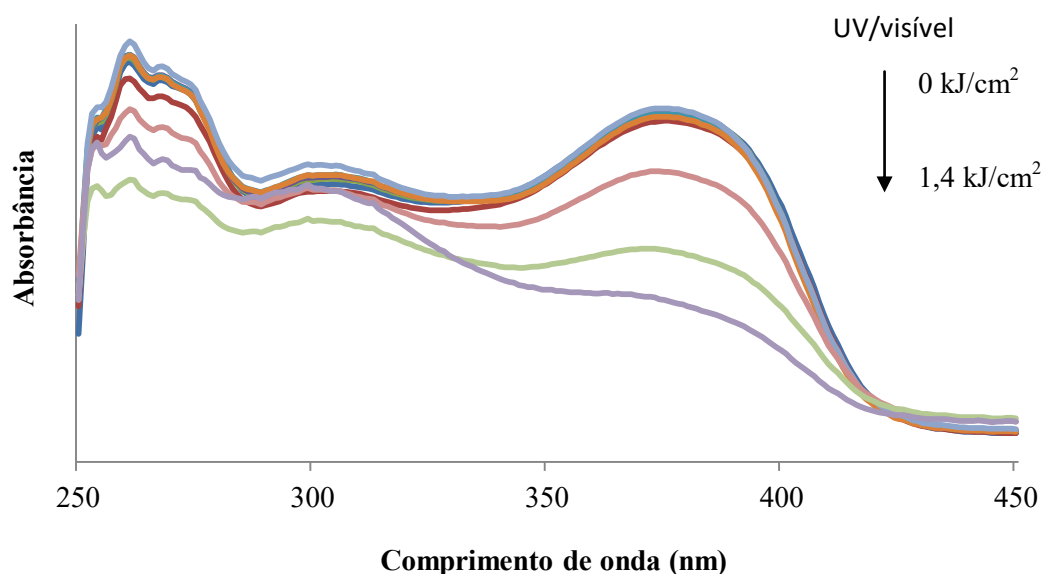
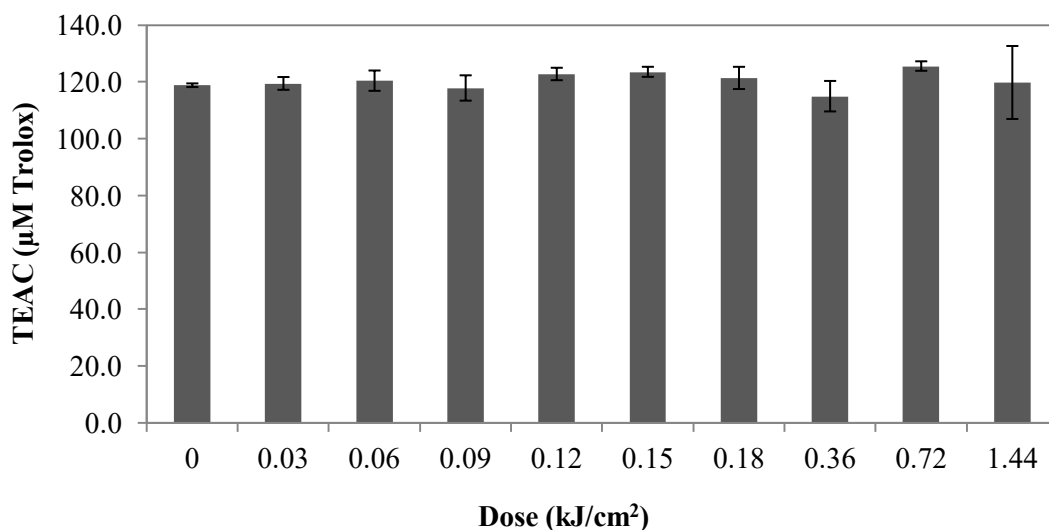


Figura 41. Atividade antioxidante equivalente em Trolox[®] (TEAC) da nanoemulsão exposta a doses crescentes de radiação UV/Vis (0 - 1,4 kJ/cm²)



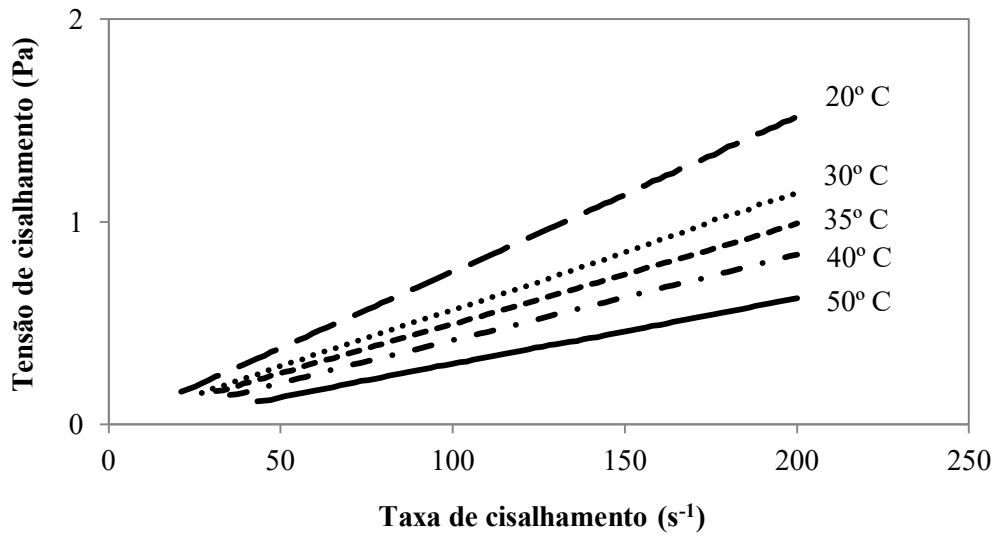
5.5 Caracterização da nanoemulsão catiônica

5.5.1 Eficiência de encapsulamento

De acordo com o método empregado, a quantidade de quercetina na fase externa da nanoemulsão catiônica estava abaixo do limite de detecção da quercetina, (LOD = 0,39 µg/mL) (BANOV et al., 2006). Portanto, considerando a baixa solubilidade da quercetina em água (< 0,01g.L⁻¹ a 20° C), a eficiência de encapsulamento calculada foi de 99,8%, no mínimo. O elevado poder de encapsulamento da quercetina na nanoemulsão acarretou em alta estabilidade física da mesma, visto que a formulação base (sem adição de quercetina) apresentou-se instável pois ocorreu separação de fases logo após seu preparo. Assim, além de agir como antioxidante, a quercetina atuou como um co-tensioativo, como será discutido mais adiante.

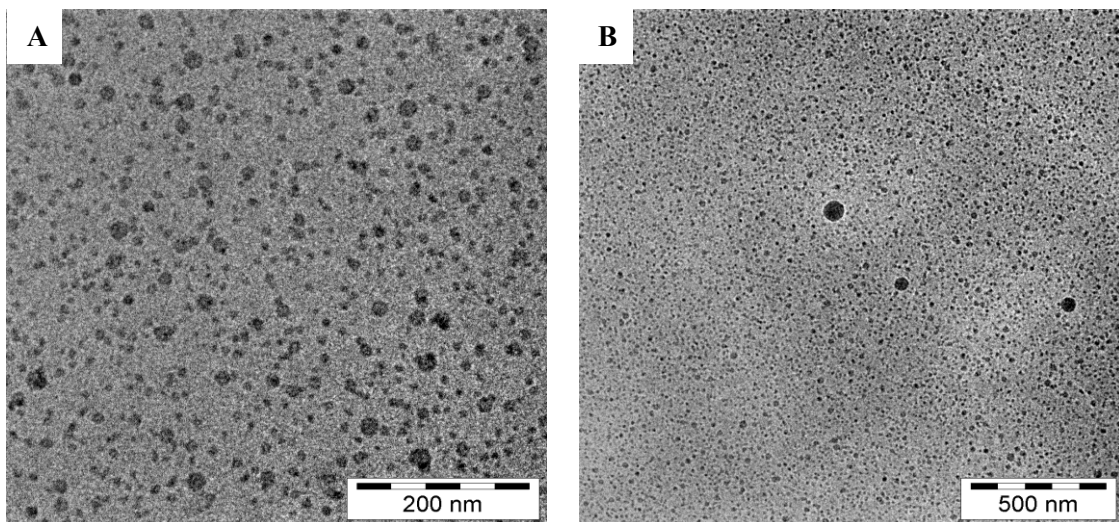
5.5.2 Perfil reológico

Um típico comportamento newtoniano (ideal) foi observado para a nanoemulsão catiônica em todas as temperaturas avaliadas, com a dependência linear característica da tensão de cisalhamento (τ) em relação à taxa de cisalhamento (**Figura 42**). Os valores de viscosidade da amostra foram obtidos a partir da **Equação 10**. A $20 \pm 0,05^\circ$ C, a nanoemulsão tinha uma viscosidade igual a 7,1 cP (sete vezes a viscosidade da água a esta temperatura) (KURIYAN; KONFORTI; WEMMER, 2013), que diminuiu para 3,5 cP a 50° C. Este baixo valor de viscosidade é, geralmente, esperado para gotas em escala nanométrica que não interagem significativamente umas com as outras, como é o caso da nanoemulsão catiônica desenvolvida que apresenta potencial zeta positivo (LAWRENCE; REES, 2000), ou seja, apresenta densidade significativa de cargas positivas na superfície que dificulta a interação entre as gotículas. Além disso, esses resultados indicam que a nanoemulsão obtida apresenta características reológicas compatíveis com sua aplicação como uma formulação cosmética.

Figura 42. Caracterização reológica da nanoemulsão em diferentes temperaturas

5.5.3 Cryo-TEM

Como a técnica DLS, utilizada na determinação do diâmetro médio de gotícula, assume que essas são esféricas (PENCER; HALLETT, 2003), torna-se necessária a observação do formato das nanoestruturas de modo a confirmar os resultados observados. De acordo com a análise das imagens obtidas por Cryo-TEM, apresentadas na **Figura 43**, as gotas na nanoemulsão são, de fato, esféricas e possuem diâmetro médio de ~20 - 30 nm, o que corrobora os valores obtidos anteriormente por DLS.

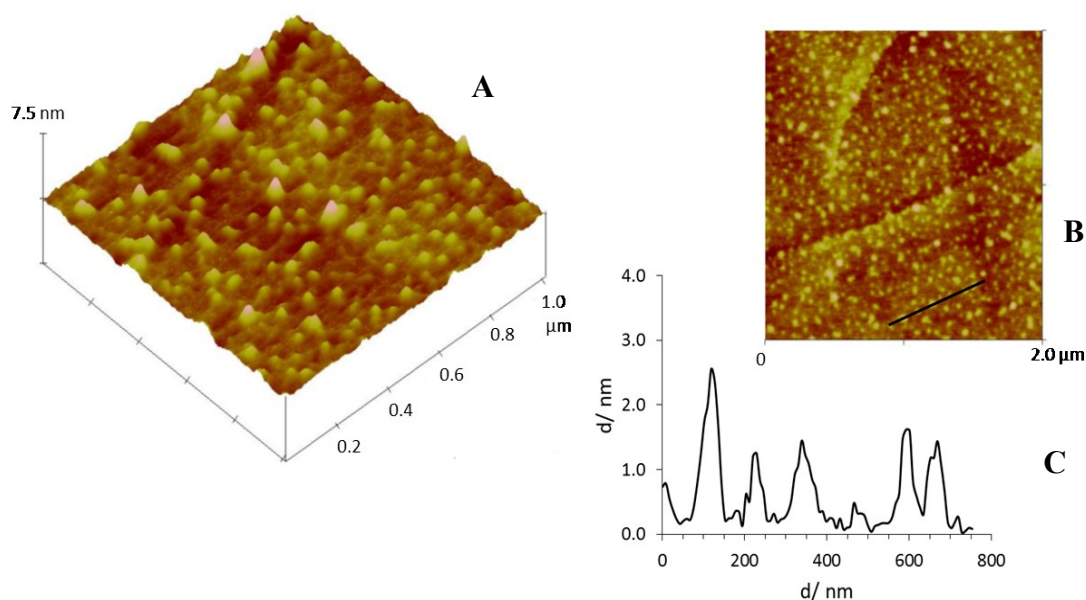
Figura 43. Imagens obtidas por Cryo-TEM da nanoemulsão catiônica em resolução de (A) 200 nm e (B) 500 nm

5.5.4 Microscopia de Força Atômica

A Microscopia de Força Atômica foi uma técnica adicional utilizada na determinação de formato das gotas na nanoemulsão. Além disso, esta técnica permitiu avaliar a tendência da formulação em interagir com uma superfície hidrofóbica, como o substrato HOPG.

A imagem topográfica 3D da nanoemulsão catiônica demonstrou claramente nanogotículas adsorvidas sobre a superfície HOPG atômica plana. O perfil na **Figura 44C** demonstrou que, após a deposição na superfície, as gotas adquiriram um formato elipsoidal indicativo da sua interação com o substrato hidrofóbico. De acordo com esta técnica, observou-se que os diâmetros das gotas variaram de 30 - 50 nm (em concordância com os resultados obtidos por DLS e Cryo-TEM) com alturas entre 1 e 2,5 nm. Estes resultados sugeriram que as nanogotículas, por terem apresentado alteração de formato, de esférico para elipsoidal, podem eficazmente interagir com superfícies biológicas hidrofóbicas, como a pele ou o cabelo (caráter hidrofóbico dado pela camada externa rica em lipídeos constituída por ácidos graxos, como o 18-MEA e outros lipídeos) (ROBBINS, 2012).

Figura 44. Imagens topográficas por Microscopia de Força Atômica, 3D (A) e 2D (B), e uma seção transversal de uma superfície de HOPG (C) onde a nanoemulsão foi depositada e seca ao ar

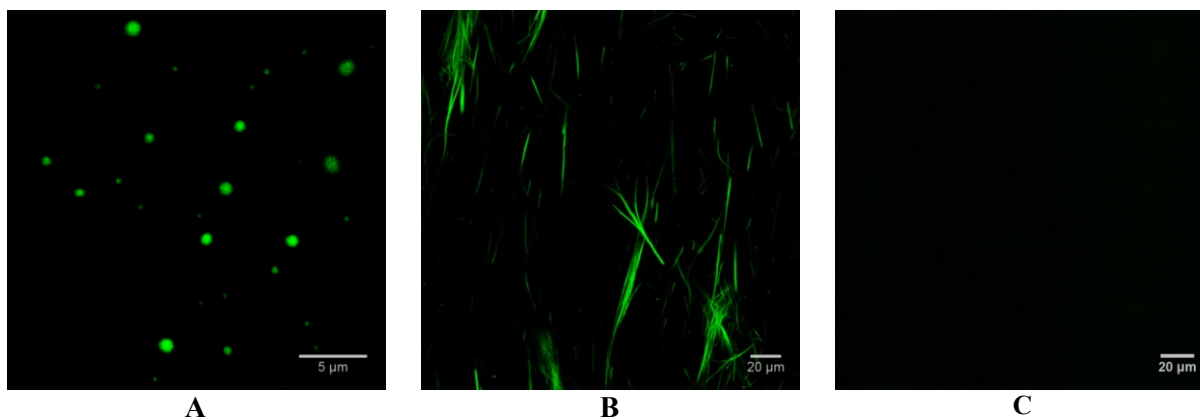


5.5.5 Microscopia Confocal de Fluorescência

A quercetina é um flavonoide que, em função de sua estrutura química, possui elevada tendência a interagir com os tensoativos em uma emulsão (LUO et al., 2011). Assim, dada a estabilidade adicional oferecida pela quercetina na estabilização da gota catiônica, tornou-se interessante estudar seu mecanismo de estabilização, por meio da determinação de sua localização preferencial na nanoemulsão (interface óleo/água ou fase oleosa). A visualização da quercetina por microscopia confocal de fluorescência seria possível em função da propriedade de fluorescência da quercetina. Porém, devido à limitada resolução do microscópio confocal de fluorescência (~300 nm) e o reduzido diâmetro de gota da nanoemulsão, não foi possível discriminar a distribuição preferencial da quercetina, mas pode-se confirmar a sua localização dentro das gotículas (**Figura 45A**), como esperado devido a sua baixa solubilidade em água (fase externa). O mesmo não ocorreu para uma macroemulsão preparada e de mesma composição que a nanoemulsão (**Figura 45B**).

De acordo com as imagens observou-se que na nanoemulsão, a quercetina estava localizada dentro das gotículas (**Figura 45A**), enquanto que na macroemulsão a solubilidade extremamente baixa da quercetina em água conduziu à formação de agregados do flavonóide na forma de agulhas no meio aquoso contínuo (**Figura 45B**). A imagem da formulação base demonstrou que a quercetina é a única substância fluorescente na formulação, pois nada foi observado (**Figura 45C**). Portanto, estas observações indicaram que a estabilização física adicional fornecida pela quercetina dependeu de sua localização na nanoemulsão, método de preparo e do diâmetro final da gotícula.

Figura 45. Imagens obtidas por Microscopia Confocal de Fluorescência de formulações ($\lambda_{exc} = 458$ nm). Nanoemulsão catiônica (**A**); Macroemulsão (**B**); Formulação base (**C**)



5.5.6 Análise térmica

A análise das curvas DSC permite identificar a existência de interações entre componentes de uma formulação, sendo útil na determinação da atuação da quercetina como co-tensoativo da nanoemulsão. Foram avaliadas misturas dos componentes usados para o preparo da nanoemulsão catiônica, a formulação base e a nanoemulsão catiônica liofilizadas.

O tensoativo não-iônico oleth-20 é a única matéria-prima sólida à temperatura ambiente na nanoemulsão, além da quercetina, sendo a alteração de seu ponto de fusão um indicativo de existência de interação com outro componente da formulação. De acordo com a literatura, a fusão deste composto ocorre a 41,6° C (CARBONE et al., 2014), valor consistente com as temperaturas obtidas neste trabalho para o oleth-20 puro ($t_{on} = 35,1$ °C e $t_{máx} = 41,6$ °C) (1 na **Figura 46**). Como mostrado na **Figura 46**, o pico no DSC que corresponde à fusão de oleth-20 (1 na **Figura 46**) está ausente em todas as misturas/formulações (2-7 na **Figura 46**) preparadas. Isto sugeriu que o oleth-20 interagiu com os outros dois tensoativos (oleth-3 e cloreto de cetil trimetil amônio) e também com a quercetina, conforme apresentado na **Figura 47**, confirmando sua atuação como co-tensoativo na nanoemulsão catiônica, além de atuar com um potente antioxidante.

Figura 46. Curvas DSC para: (1) Oleth-20; (2) formulação base liofilizada; (3) nanoemulsão catiônica liofilizada; (4) mistura de todos os componentes usados para o preparo da nanoemulsão catiônica; (5) quercetina; (6) mistura de quercetina + oleth-20 (1:1); (7) mistura de oleth-20 + oleth-3 + CTAC (cloreto de cetil trimetil amônio)

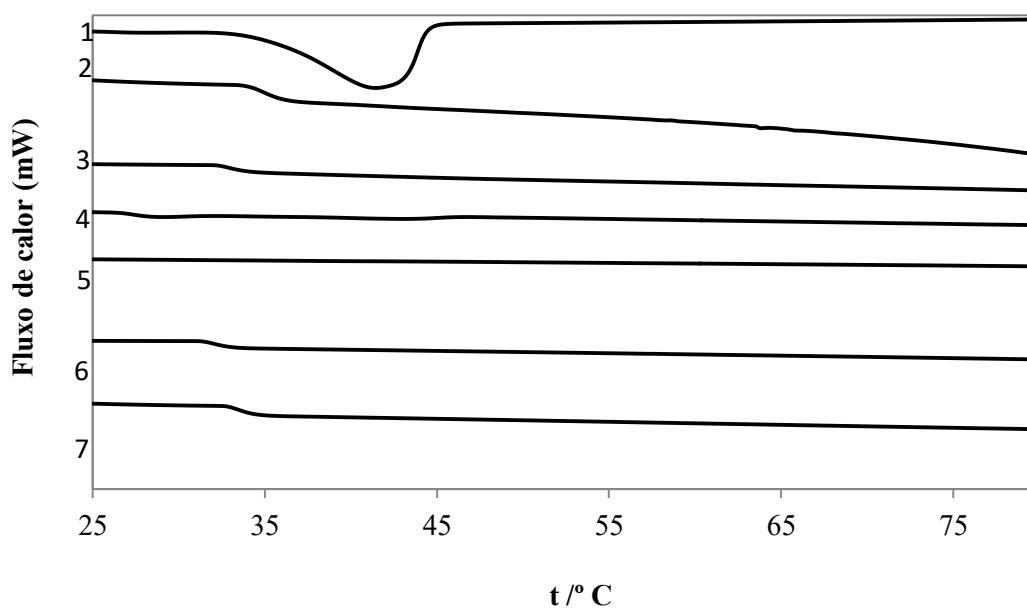
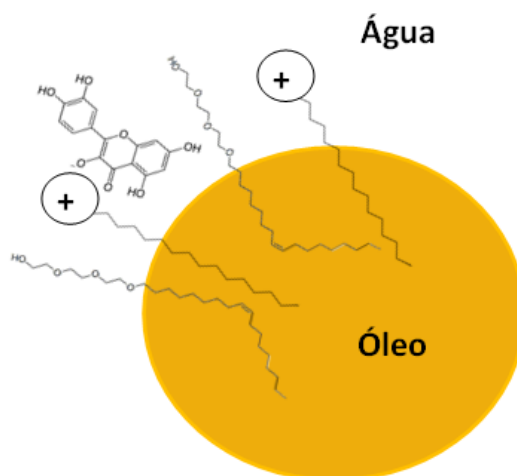


Figura 47. Representação da interação entre os tensoativos oleth-20, oleth-3, cloreto de cetil trimetil amônio e a quercetina na interface óleo/água da nanoemulsão



5.6 Avaliação do potencial de irritação ocular por método *in vitro* – HET-CAM

A avaliação do potencial de irritação ocular da nanoemulsão catiônica pelo método HET-CAM é fundamental como um teste preliminar de segurança de aplicação do produto, visto que ele poderia ser veiculado na forma *spray* em virtude de sua reduzida viscosidade e, desta maneira, haveria a possibilidade de contato da região ocular com as gotículas do produto.

Este método *in vitro* foi escolhido pela facilidade de aplicação, disponibilidade e por apresentar resultados comparáveis ao Teste de Draize, realizados em coelhos e, atualmente não recomendado para testar matérias-primas ou produtos cosméticos, principalmente para substâncias fortemente irritantes ou corrosivas (ALLTOX, 2016).

De acordo com o ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), os resultados do ensaio HET-CAM podem ser aceitos somente se o controle positivo, no caso a dispersão de SDS (dodecilsulfato de sódio) a 1,0% p/v, apresentar índice de irritação ocular (IS) que a classifique como fortemente irritante (ICCVAM, 2010). Como pode ser observado na **Tabela 12**, o controle positivo apresentou resultado aceitável, sendo os fenômenos de hemorragia e lise observados em poucos segundos ($t_{\text{médio}} = 2$ s). O controle negativo (NaCl 0,9% p/v) não desencadeou nenhum processo de alteração vascular. Portanto, os demais dados observados para a nanoemulsão catiônica ou formulação base podem ser aceitos.

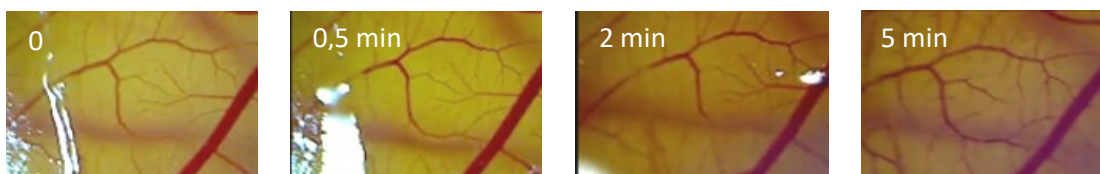
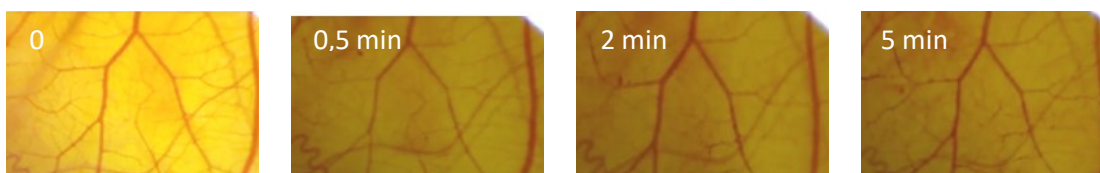
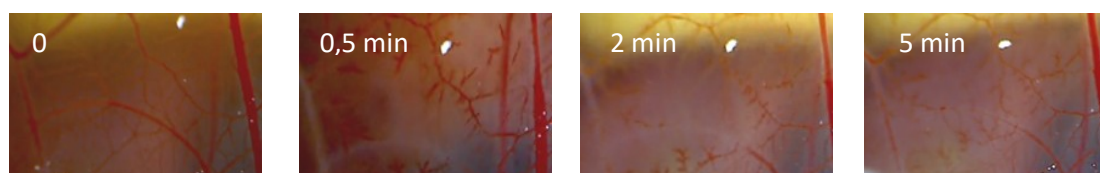
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 12. Classificação do potencial de irritação ocular – HET-CAM - da nanoemulsão catiônica e formulação base

Produto	Concentração (% p/p)	t _{médio} (s) Hemorragia	t _{médio} (s) Lise	IS	Classificação
FB	100,0	35	-	4,43	IL
NQ	100,0	53	-	4,13	IL
SDS	1,0	2	2	11,96	IS

Legenda: **FB** - Formulação base; **NQ** - Nanoemulsão catiônica; **SDS** (dodecilsulfato de sódio) - controle positivo; **IS** – potencial de irritação ocular; **IL** – levemente irritante; **IS** – fortemente irritante

Tanto a formulação base (sem adição de quercetina) quanto a nanoemulsão catiônica (quercetina a 0,5% p/p) provocaram apenas o fenômeno de hemorragia, quando aplicados a 100% (sem diluição) na membrana corioalantoide do ovo de galinha galado, sendo classificadas como levemente irritante. Os demais eventos (lise ou coagulação) não foram observados, fato que reduz seu potencial de irritação ocular. As imagens observadas nos tempos 0; 0,5; 2 e 5 min encontram-se nas **Figura 48** a **Figura 50**.

Figura 48. Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da formulação base (sem adição de quercetina) sobre a membrana corioalantoide**Figura 49.** Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da nanoemulsão catiônica sobre a membrana corioalantoide**Figura 50.** Imagens obtidas em diferentes tempos do efeito da dispersão de SDS (1,0% p/v) - controle positivo - sobre a membrana corioalantoide

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tensoativos não-iônicos utilizados (oleth-20 e oleth-3) pertencem à classe dos álcoois oleílicos etoxilados, muito utilizados em produtos cosméticos. O oleth-3 é empregado, principalmente, em condicionadores capilares, pós e *sprays* para os pés, hidratantes, e outras preparações destinadas à pele. O oleth-20 é encontrado em uma enorme gama de produtos, dentre os quais destacam-se os produtos para a área dos olhos, condicionadores capilares, *sprays* fixadores, xampus e tinturas capilares (ANDERSEN, 1999).

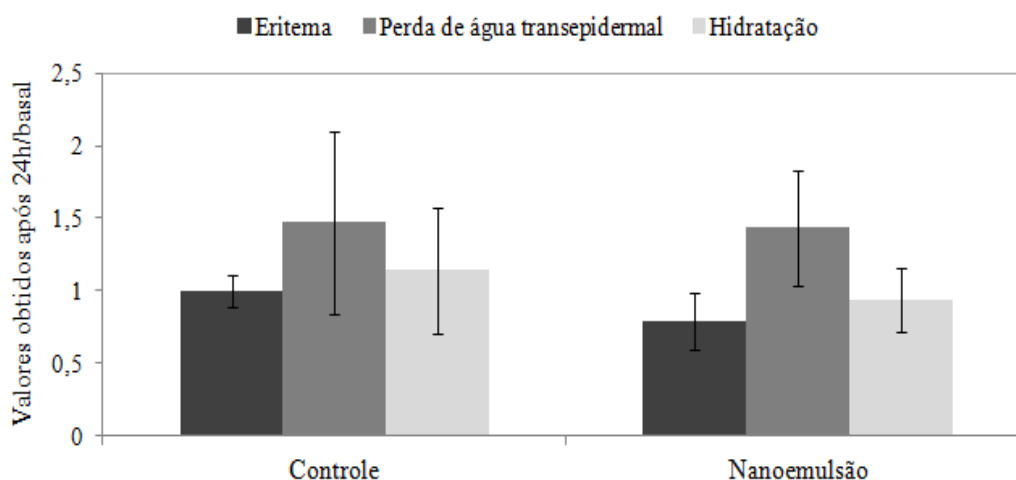
Em função das numerosas aplicações, estas matérias-primas apresentam perfil de segurança estabelecido. De acordo com testes de Draize realizados e descritos na literatura, o oleth-20 e o oleth-3 foram considerados não irritantes ou moderadamente irritantes (ANDERSEN, 1999; FRUIJTIER-POLLOTH, 2005; ALÉPÉE et al., 2013), ao contrário do CCTA. Este tensoativo catiônico, adicionado à formulação com a finalidade de atuar como agente condicionante dos fios, apresenta capacidade de provocar danos oculares irreversíveis, associado à opacidade da córnea e irritação conjuntival (EUROPEAN COMMISSION SCCS/1246/09, 2009). Assim, o potencial de irritação da nanoemulsão ou da formulação base observado deve estar relacionado ao tensoativo catiônico incorporado e sugere-se a recomendação de aplicação apenas no fio de cabelo e não no couro cabeludo, evitando-se que o produto entre em contato com os olhos.

5.7 Biocompatibilidade cutânea

O baixo potencial de irritação ocular observado no ensaio HET-CAM foi corroborado pelo teste de biocompatibilidade cutânea. A nanoemulsão apresentou boa compatibilidade com a pele (**Figura 51**). Após 24 horas, não se observou nenhuma vermelhidão ou qualquer outra alteração das propriedades da pele (hidratação ou perda de água transepidermal), e nenhum dos voluntários relatou qualquer desconforto. Estes resultados indicaram que, mesmo quando aplicada sob oclusão, a nanoemulsão catiônica não causou qualquer eritema ou perda da função de barreira, exibindo boa biocompatibilidade cutânea, sendo considerada segura para uso.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 51. Eritema, hidratação e perda de água transepidermal, antes e após aplicação da nanoemulsão catiônica ($n = 12$). Nenhuma amostra teve diferenças estatisticamente significativas ($\alpha = 0,05$)



Legenda: controle = água destilada

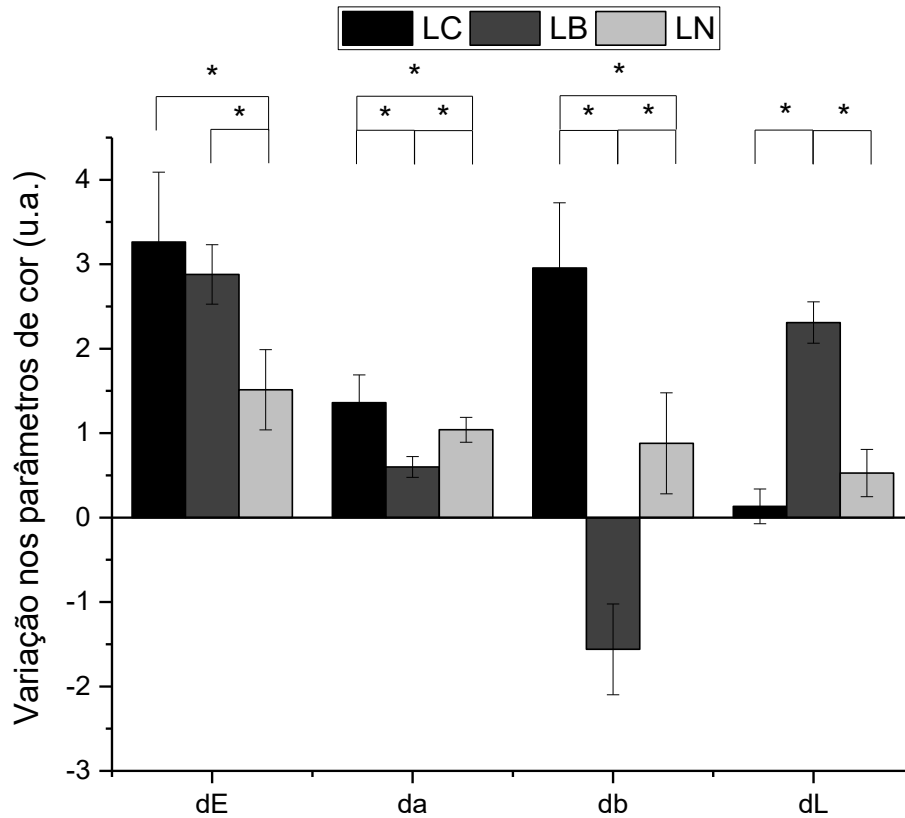
5.8 Estudo de eficácia da nanoemulsão catiônica

5.8.1 Cor

Os cabelos tingidos de loiro tratados com a nanoemulsão catiônica ou a formulação base expostos à radiação UV/Vis por 180 h apresentaram variação no parâmetro dE^* (cor total) igual a $1,51 \pm 0,48$ e $2,83 \pm 0,34$, respectivamente, enquanto que o controle (mecha não tratada com formulação e exposta à radiação UV/Vis) apresentou dE^* igual a $3,26 \pm 0,83$, como mostrado na **Figura 52**. A variação observada para mechas tratadas com formulação base ou o controle foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$), e maior, estatisticamente, do que o valor observado para a mecha tratada com a nanoemulsão. Portanto, a nanoemulsão catiônica protegeu a cor total (dE^*) do cabelo tingido de loiro exposto à radiação UV/Vis por 180 h em 54%, se comparado ao controle, e em 47% em relação à formulação base. Os parâmetros da e db , também apresentaram menores valores para as mechas tratadas com a nanoemulsão, em relação à mecha controle. A variação no parâmetro b^* observada para as mechas tratadas com a formulação base pode ser explicada pela solubilização dos pigmentos amarelos da tintura nos componentes da formulação (ZHOU et al., 2009). O mesmo mecanismo ocorreu com a nanoemulsão, porém a quercetina pode ter penetrado a fibra capilar, depositando-se no córtex e elevando a coloração amarela da fibra, ao mesmo tempo em que protege os pigmentos da oxidação. Estas alterações não são perceptíveis ao olho humano, como pode ser observado na **Figura 53**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

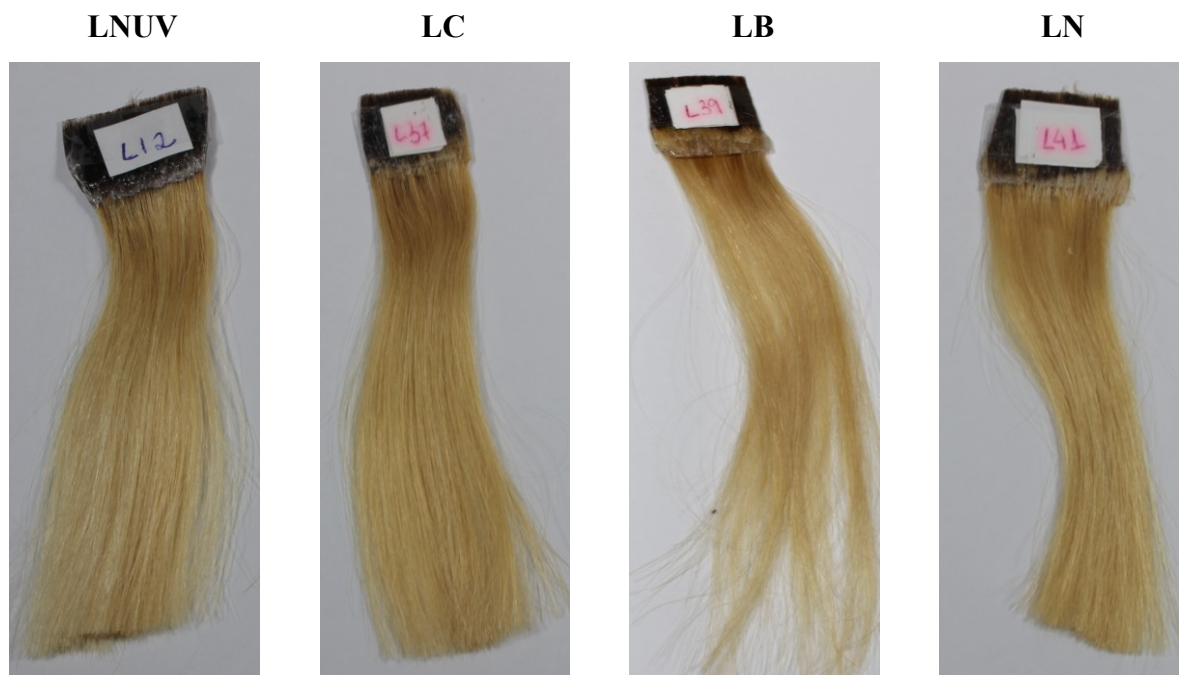
Figura 52. Variação nos parâmetros de cor das mechas de cabelo tingidas de loiro após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h ($n = 3$); $*p \leq 0,05$



Legenda: dE^* = parâmetro de variação de cor total; dL^* = parâmetro que representa a diferença no parâmetro claro-escuro (0 para preto e 100 para branco); da^* = diferença de cor na coordenada verde-vermelho (positivo se mais vermelho e negativo se mais verde); db^* = diferença de cor na coordenada azul-amarelo (positivo se mais amarelo e negativo se mais azul); **u.a.** = unidades arbitrárias; **LC** = mecha tingida de loiro controle (não tratada com formulação); **LB** = mecha tingida de loiro tratada com a formulação base; **LN** = mecha tingida de loiro tratada com a nanoemulsão catiônica

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 53. Imagens das mechas de cabelo tingidas de loiro expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h

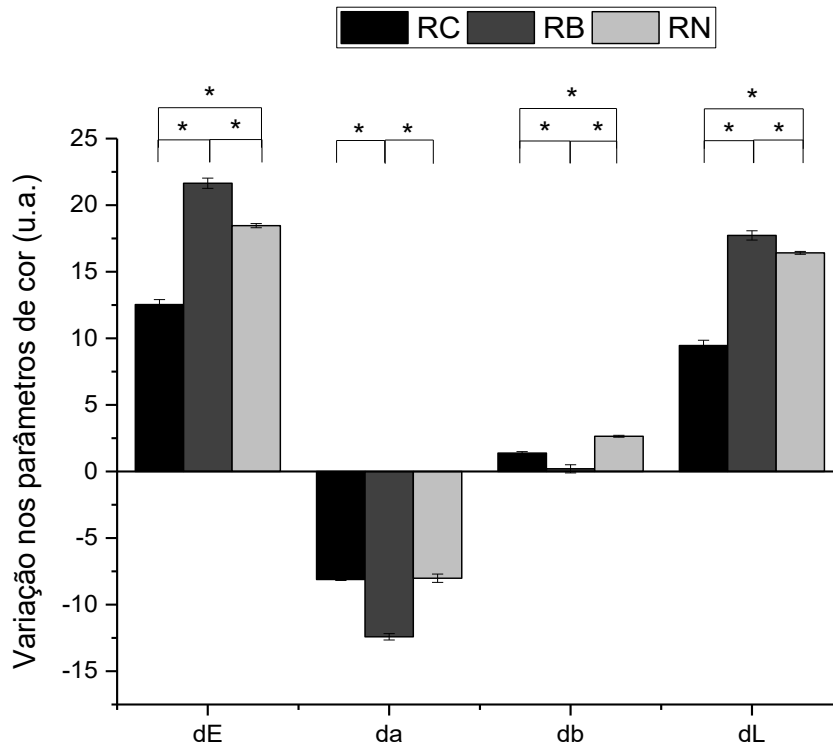


Legenda: **LNUV** = mecha tingida de loiro não exposta à radiação UV/Vis; Mechas expostas à radiação UV/Vis: **LC** = mecha tingida de loiro controle (não tratada com formulação); **LB** = mecha tingida de loiro tratada com a formulação base; **LN** = mecha tingida de loiro tratada com a nanoemulsão catiônica

As mechas de cabelo tingidas de ruivo apresentaram um comportamento diferente do observado para as mechas tingidas de loiro. As tratadas com a nanoemulsão catiônica ou com a formulação base, expostas por 180 h ao UV/Vis, apresentaram variação de cor total (dE^*) de 47% e 73% superior ao observado para as mechas controle, respectivamente (**Figura 54**). Porém, em relação às mechas tratadas com a formulação base, a nanoemulsão promoveu proteção de 15% da cor das mechas tingidas de ruivo. Tais mechas apresentaram expressiva redução da cor vermelho (parâmetro a^*), sendo a variação maior para as mechas tratadas com a formulação base. Ou seja, os componentes presentes na formulação base, provavelmente, promoveram a solubilização dos pigmentos vermelhos (que geralmente apresentam maior solubilidade que as demais cores) (ZHOU et al., 2009), facilitando posteriormente sua retirada da fibra no procedimento de lavagem. A nanoemulsão catiônica promoveu menor variação de cor que as mechas tratadas com a formulação base pela ação da quercetina. O parâmetro dL^* também apresentou elevada variação, de modo que as mechas tornaram-se mais claras, como pode ser observado na **Figura 55**.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 54. Variação nos parâmetros de cor das mechas de cabelo tingidas de ruivo após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h (n=3); * $p \leq 0,05$



Legenda: dE^* = parâmetro de variação de cor total; dL^* = parâmetro que representa a diferença no parâmetro claro-escuro (0 para preto e 100 para branco); da^* = diferença de cor na coordenada verde-vermelho (positivo se mais vermelho e negativo se mais verde); db^* = diferença de cor na coordenada azul-amarelo (positivo se mais amarelo e negativo se mais azul); **u.a.** = unidades arbitrárias; **RC** = mecha controle (não tratada com formulação); **RB** = mecha tingida de ruivo tratada com a formulação base; **RN** = mecha tingida de ruivo tratada com a nanoemulsão catiônica

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 55. Imagens das mechas de cabelo tingidas de ruivo expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h



Legenda: **RNUV** = mecha tingida de ruivo não exposta à radiação UV; Mechas expostas à radiação UV/Vis: **RC** = mecha tingida de ruivo controle (não tratada com formulação); **RB** = mecha tingida de ruivo tratada com a formulação base; **RN** = mecha tingida de ruivo tratada com a nanoemulsão catiônica

5.8.2 Tração à ruptura

A tração à ruptura da fibra de cabelo é um bom indicador da sua resistência à ruptura ou fratura e está altamente relacionada com a área de secção transversal da fibra (FRANBOURG et al., 2003). O diâmetro do cabelo, que varia entre os seres humanos saudáveis entre 50-100 μm , está relacionado com a quantidade de córtex e, consequentemente, com as propriedades de tração do cabelo, principalmente no estado seco (SESHADRI; BHUSHAN, 2008; EVANS; MARSH; WICKETT, 2011). Por esta razão, o parâmetro tração à ruptura é calculado pelo quociente entre o valor da força necessária à ruptura obtida a partir da curva de tensão-deformação (DARIO; BABY; VELASCO, 2015) e a área da secção transversal da fibra capilar.

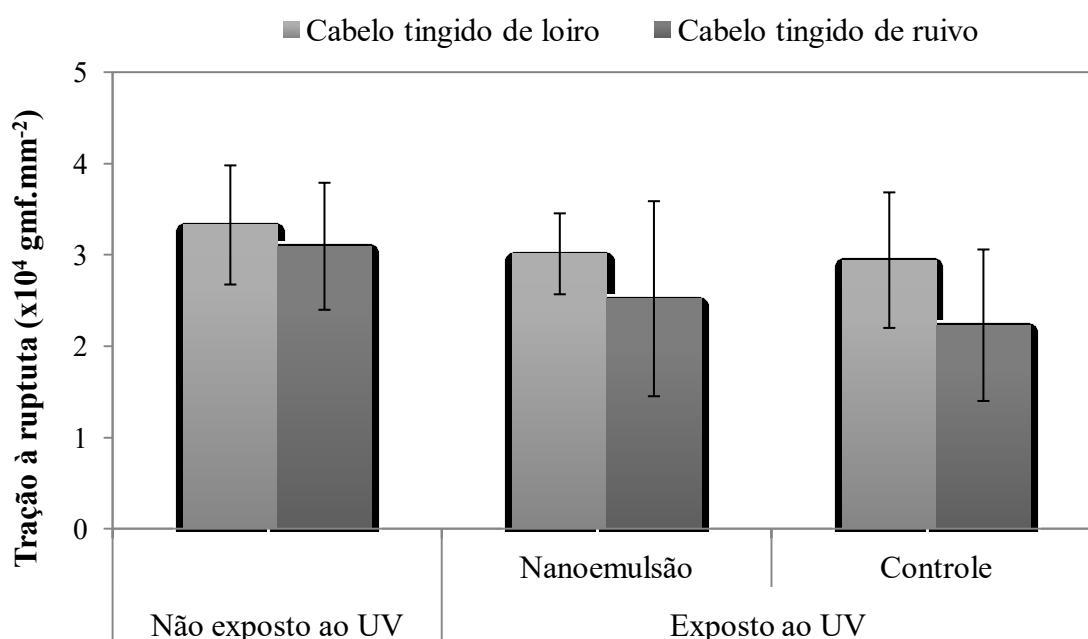
O tratamento com a tintura não diminuiu a resistência mecânica da fibra capilar pois os valores de tração à ruptura do cabelo virgem ($4,4 \times 10^4 \text{ gmf.mm}^{-2}$) foram estatisticamente iguais aos resultados observados para os cabelos tingidos e não expostos à radiação UV/Vis. A descoloração é um tratamento muito agressivo às fibras capilares pois durante o processo ocorre a oxidação da melanina e outras estruturas podem, também, ser quimicamente

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

modificadas como proteínas, aminoácidos e lípidos, causando a perda de proteína (INOUE; ITO; KIZAWA, 2002). Porém, esse processo geralmente ocorre sem redução da resistência mecânica da fibra (NOGUEIRA; JOEKES, 2004). Ou seja, durante o processo de descoloração e tingimento, os feixes de queratina presentes no córtex não apresentam oxidação significativa em função de sua elevada resistência química. Assim, a oxidação ocorre predominantemente nas cutículas, processo relacionado à elevada perda proteica, como será discutido adiante (*item 5.8.4*).

Da mesma forma, a radiação UV/Vis (500 W/m² por 180 h) não afetou a resistência mecânica das fibras tingidas de ruivo ou loiro (**Figura 56**). Assim, como a radiação UV/Vis não afetou a estrutura do córtex dos cabelos tingidos significativamente, não se observou qualquer melhoria causada pela nanoemulsão catiônica.

Figura 56. Tração à ruptura da fibra capilar após exposição à radiação UV/Vis (500 W/m²) por 180 h (n = 20)



5.8.3 Penteabilidade e Fricção

O atrito é um parâmetro importante para a ciência do cuidado do cabelo, porque é altamente relacionado com a nossa percepção de um cabelo macio e sedoso. Esse é sentido durante o ato de pentear e ocorre devido às interações entre a superfície do cabelo e o material do pente. Assim, o atrito deve ser baixo para permitir o pentear, bem como a adesão entre as fibras, de modo a minimizar o embaraçamento (LATORRE; BHUSHAN, 2006).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Condicionadores são produtos cosméticos destinados a reduzir o coeficiente de fricção (COF) e lubrificar a fibra, proporcionando um revestimento protetor à superfície do cabelo (LATORRE; BHUSHAN, 2006). Por meio da combinação de silicones, álcoois graxos e agentes tensoativos catiônicos, estes produtos asseguram a proteção aos danos futuros, como a exposição à radiação UV, por exemplo.

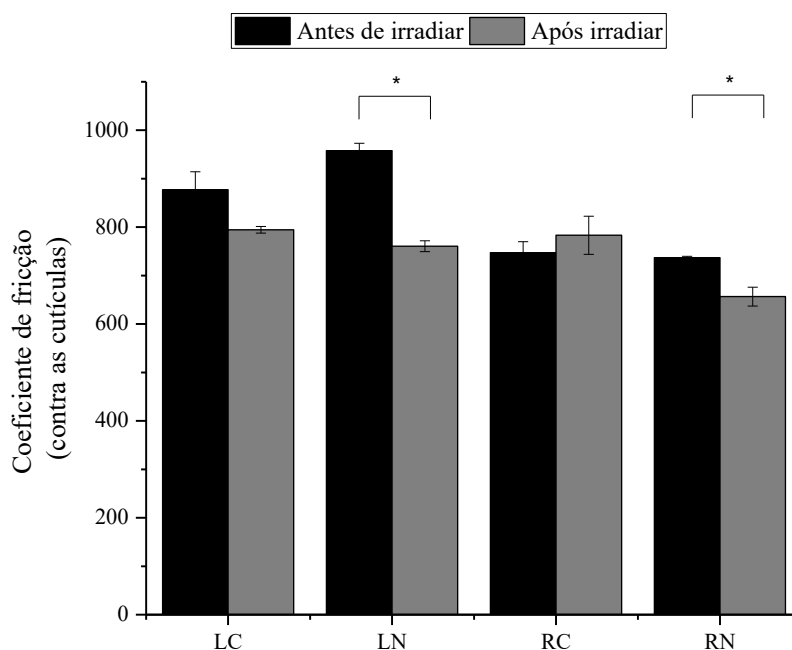
A penteabilidade pode ser influenciada por vários fatores como fricção estática, fricção cinética, rigidez, curvatura, diâmetro e carga estática da fibra (ROBBINS; REICH, 1986). Além disso, a quantidade de cabelo em cada mecha e o seu comprimento influenciam o resultado fornecido pelo equipamento, o que justifica a análise da mesma mecha, antes e após um tratamento. Como mencionado, os condicionadores funcionam principalmente reduzindo o COF, mas também por neutralização de cargas negativas presentes na superfície da fibra capilar (KORTE et al., 2014).

Os resultados apresentados na **Figura 57** indicaram que nem a cor da tintura (loiro ou ruivo) nem a exposição à radiação UV/Vis afetaram o coeficiente de fricção (contra ou a favor das cutículas) observado para as mechas de cabelo. Ou seja, nenhuma alteração significativa de sensorial deve ser observada quando se realiza esses tipos de tratamentos, químico ou físico. Como será apresentado adiante, a radiação UV/Vis promoveu redução na espessura ou desgaste das cutículas (**item 5.8.5**), acarretando em perda proteica. Essas alterações na região externa da fibra capilar não se traduziram em mudanças significativas nos valores dos coeficientes de fricção, de acordo com os resultados observados e a sensibilidade do equipamento utilizado. Ao contrário, a aplicação da nanoemulsão catiônica promoveu redução de ambos os coeficientes de fricção, contra ou a favor das cutículas, em função do caráter lubrificante de alguns componentes oleosos da formulação, principalmente os triglicérides de ácido cáprico/caprílico (emoliente e fase oleosa da nanoemulsão).

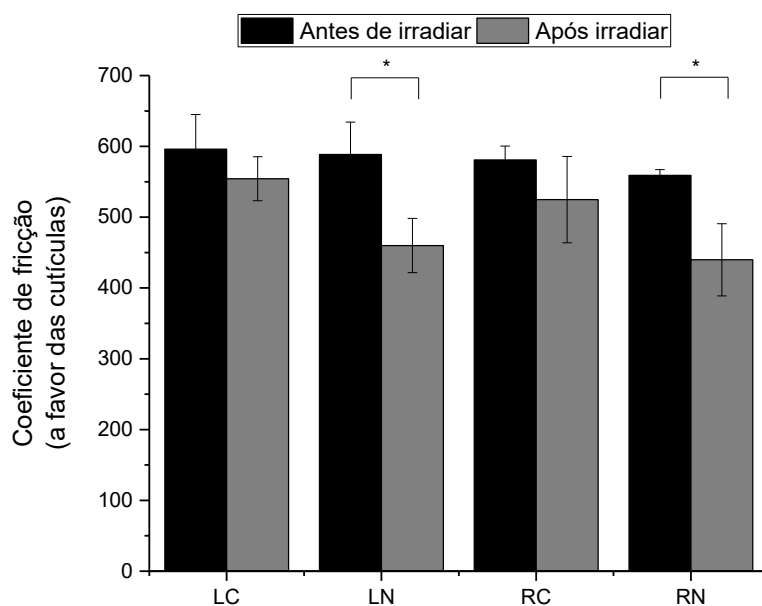
Em relação ao parâmetro penteabilidade (**Figura 58**), a nanoemulsão catiônica aplicada às mechas de cabelo atuou como um condicionador uma vez que contém, além do lubrificante mencionado anteriormente, o CCTA, agente tensoativo catiônico mais utilizado nesta categoria de produto. A neutralização das cargas negativas presentes na superfície da fibra capilar foi, também, responsável pela redução do trabalho total para pentear, ou seja, a nanoemulsão promoveu melhora do atributo penteabilidade.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 57. Coeficiente de fricção contra (A) e a favor das cutículas (B) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, antes e após período de exposição à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h ($n=3$); $*p \leq 0,05$



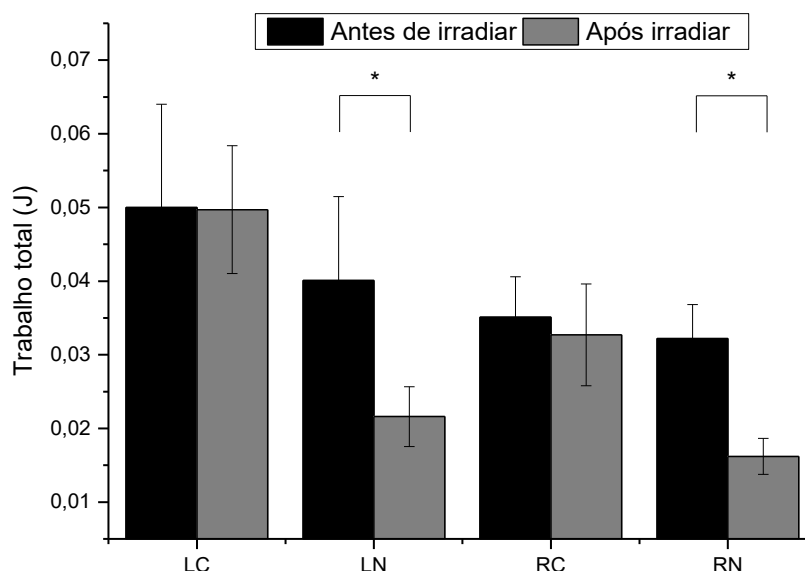
A



B

Legenda: **LC** = mecha tingida de loiro controle (não tratada com formulação); **LN** = mecha tingida de loiro tratada com a nanoemulsão catiônica; **RC** = mecha tingida de ruivo controle (não tratada com formulação); **RN** = mecha tingida de ruivo tratada com a nanoemulsão catiônica

Figura 58. Trabalho total para pentear (J) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, antes e após período de exposição à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 180 h ($n = 3$); $*p \leq 0,05$



Legenda: LC = mecha tingida de loiro controle (não tratada com formulação); LN = mecha tingida de loiro tratada com a nanoemulsão catiônica; RC = mecha tingida de ruivo controle (não tratada com formulação); RN = mecha tingida de ruivo tratada com a nanoemulsão catiônica

5.8.4 Perda proteica

As mechas tingidas mas não expostas à radiação UV/Vis apresentaram pequena perda proteica, igual a $1,77 \pm 0,13 \text{ mg/g}$ de cabelo para mechas tingidas de loiro e $2,06 \pm 0,13 \text{ mg/g}$ para as tingidas de ruivo. Após 90 h de exposição à radiação UV/Vis, ambos os tipos de mechas apresentaram aumento de perda proteica, porém as mechas tingidas de loiro apresentaram-se mais susceptíveis que as tingidas de ruivo pois foi observada perda proteica superior (**Figura 59**).

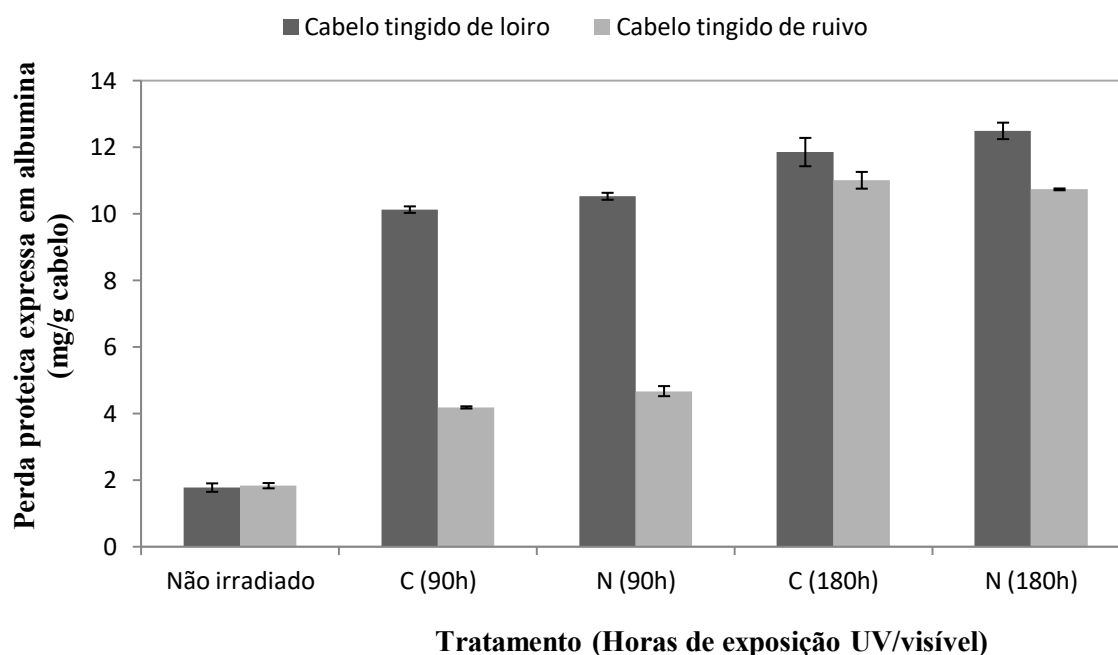
As moléculas de pigmento presentes na tintura capilar, e que ficam retidas nas camadas da cutícula e no córtex, podem atuar como filtros solares, protegendo as estruturas lipídicas ou proteicas da degradação induzida pela radiação UV/Vis (PANDE; ALBRECHT; YANG, 2001). As mechas controle tingidas de ruivo apresentaram, após 90 h de exposição à radiação, significativa e elevada alteração de cor ($dE = \sim 8$) e perda proteica inferior ($4,18 \pm 0,03 \text{ mg/g}$ cabelo) à observada para as mechas controle tingidas de loiro ($10,1 \pm 0,1 \text{ mg/g}$ cabelo) que tiveram pequena alteração de cor ($dE = 1,5$). Portanto, o comportamento de alteração de conteúdo proteico das mechas controle (não tratadas com formulação) pode ser

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

explicada pelo efeito fotoprotetor intrínseco aos pigmentos da tintura capilar. A tintura cor ruivo foi mais eficaz na proteção das estruturas proteicas, oxidando-se e prevenindo a oxidação e quebra de ligações químicas nas proteínas. No entanto, os pigmentos da tintura cor loiro não passaram pelo processo oxidativo, pois mostraram-se mais resistentes à degradação induzida pelo UV/Vis permitindo, assim, a oxidação de proteínas da estrutura capilar.

Com aumento do tempo de exposição das mechas à radiação, os pigmentos de cor ruivo, já muito oxidados, não foram capazes de proteger a queratina da degradação, o que acarretou em elevação de perda proteica ($11,0 \pm 0,2$ mg/g cabelo), valor muito próximo ao observado para as mechas tingidas de loiro ($11,8 \pm 0,4$ mg/g cabelo). A nanoemulsão catiônica não teve nenhum impacto, positivo ou negativo, na perda proteica das mechas de cabelo tingidas de ruivo ou loiro, como apresentado na **Figura 59**.

Figura 59. Perda proteica equivalente em albumina das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro ou ruivo, expostas ou não à radiação UV/Vis (500 W/m^2) por 90 ou 180 h



Legenda: C = mecha controle (não tratada com formulação); N = mecha tratada com nanoemulsão

5.8.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A técnica de obtenção de imagens de cabelo por AFM apresenta algumas vantagens em relação à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) pois na AFM as amostras não precisam ser tratadas previamente, ao contrário do preparo requerido pelo MEV, que consiste de recobrimento da superfície do cabelo (cutícula) com metais, seguido de exposição ao

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

vácuo. Estas etapas de preparo da amostra, potencialmente, induzem modificações em sua superfície, o que pode prejudicar a análise das alterações provocadas pelos tratamentos químicos ou físicos realizados na fibra capilar (POLETTI et al., 2003). Além disso, a AFM permite obter perfis topográficos e imagens 3D, o que contribui para a avaliação e quantificação dos danos provocados pelos tratamentos, assim como a proteção oferecida pelos produtos cosméticos.

Na **Figura 60** são apresentadas as imagens obtidas por AFM e perfil topográfico das mechas tingidas de loiro. Aquela que não foi submetida à radiação UV/Vis (**Figura 60A**) apresentou as camadas de cutícula com aspecto normal, bem delimitadas, sendo o valor médio de espessura das cutículas igual a $302,65 \pm 65,54$ nm (valores apresentados na **Figura 62**). A etapa de exposição à radiação UV/Vis por 180 h provocou redução desse parâmetro em aproximadamente 50%, de modo que as cutículas fundiram parcialmente, como foi discutido por Ruetsch et al. (RUETSCH; KAMATH; WEIGMANN, 2000) ou tiveram intenso processo de desgaste, hipótese corroborada pela elevada perda proteica observada. Os aminoácidos da cutícula são mais susceptíveis a degradação que os presentes no córtex, pois a região externa recebe uma dose de radiação maior, principalmente UVB (NOGUEIRA et al., 2007; SEBETIĆ et al., 2008) enquanto a radiação UVA penetra parcialmente no córtex (JEON; PI; LEE, 2008). Esse tipo de alteração nas cutículas pode provocar modificações de sensorial no cabelo e, principalmente, de brilho.

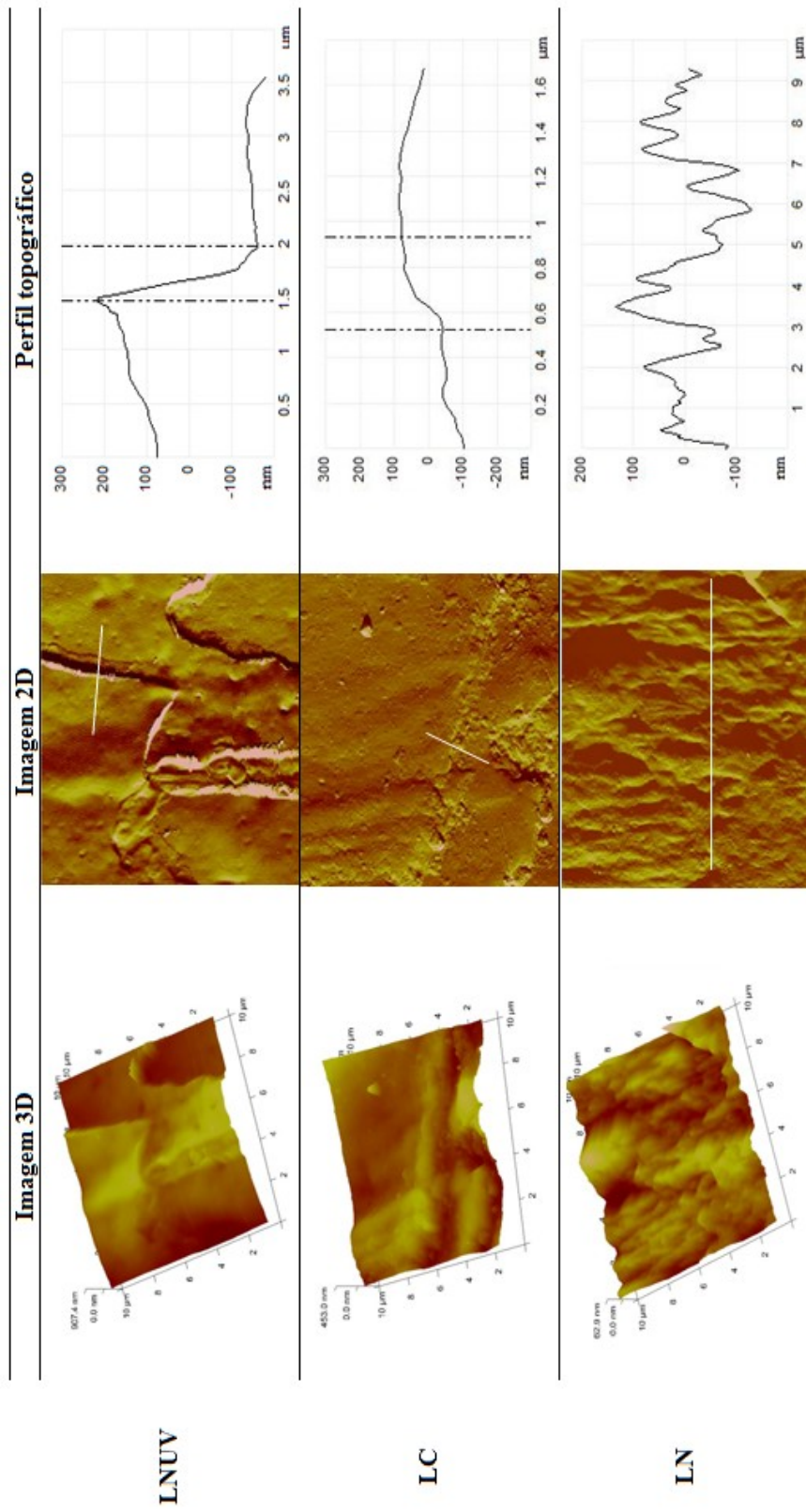
O mesmo padrão foi observado para as mechas tingidas de ruivo (**Figura 61**) pois aquelas não expostas ao UV/Vis apresentaram espessura de cutícula igual a $268,83 \pm 32,34$ nm, enquanto que as mechas expostas tiveram suas cutículas fundidas ou desgastadas, de modo que a distância entre cutículas reduziu para $151,67 \pm 23,76$ nm (**Figura 62**). Não foi possível avaliar o efeito protetor da nanoemulsão catiônica por esta técnica porque as imagens obtidas mostraram elevada deposição de material sobre a fibra, apesar da etapa de lavagem realizada posteriormente à exposição ao UV/Vis.

A quercetina, em função de sua elevada interação com os tensoativos utilizados (oleth-3 e oleth-20) localizou-se, predominantemente, na interface óleo/água da nanoemulsão. Esta localização preferencial associada à propriedade da quercetina de interagir fortemente com proteínas, inclusive covalentemente no caso de proteínas plasmáticas (KALDAS et al., 2005), permitiu a interação entre a quercetina e as proteínas presentes na cutícula. Assim, como os componentes presentes na nanoemulsão, inclusive a quercetina, aderiram fortemente à

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

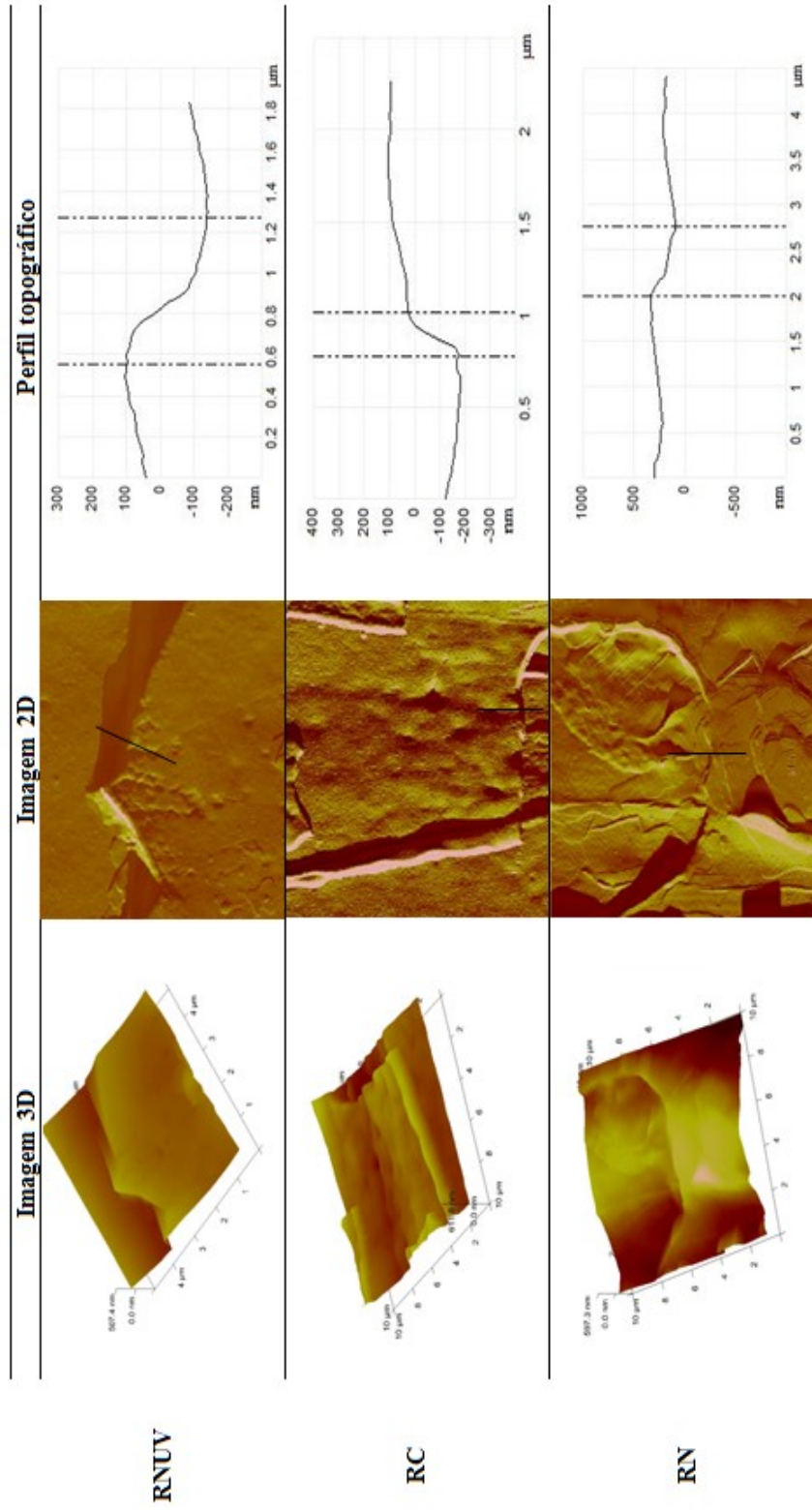
superfície externa da fibra capilar, não foi possível avaliar a altura das cutículas nas mechas tratadas com formulação.

Figura 60. Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro



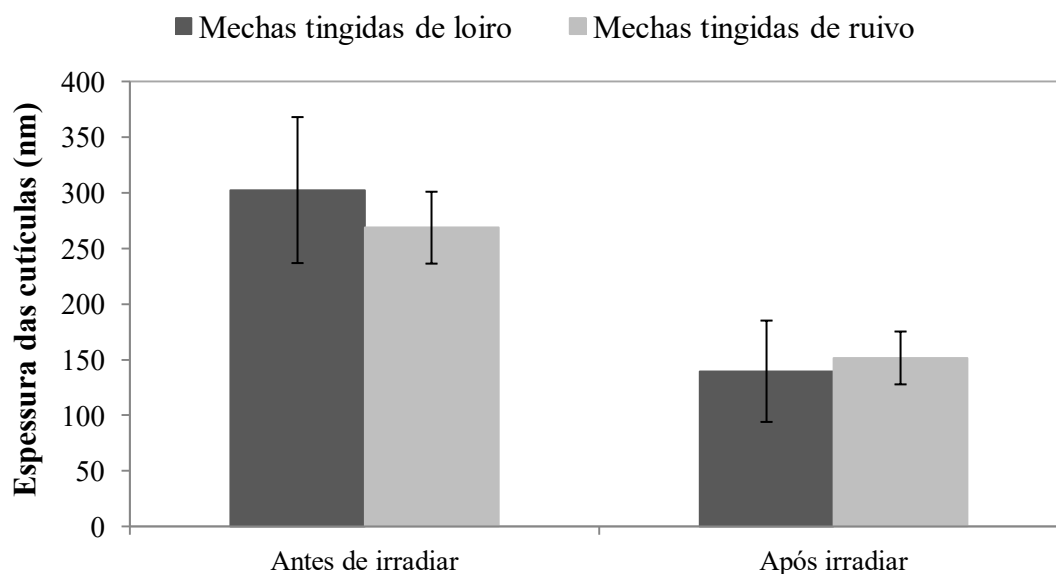
Legenda: LNUV = mecha de cabelo não exposta ao UV; LC = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; LN = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão exposta à radiação UV/Vis; Linha branca identifica o segmento da imagem cujo perfil topográfico é indicado

Figura 61. Imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica (AFM) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor ruivo



Legenda: **RNUV** = mecha de cabelo não exposta ao UV/Vis; **RC** = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; **RN** = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão e exposta à radiação UV/Vis; Linha branca identifica o segmento da imagem cujo perfil topográfico é indicado

Figura 62. Espessura das cutículas de acordo com o perfil topográfico obtido por Microscopia de Força Atômica (AFM)

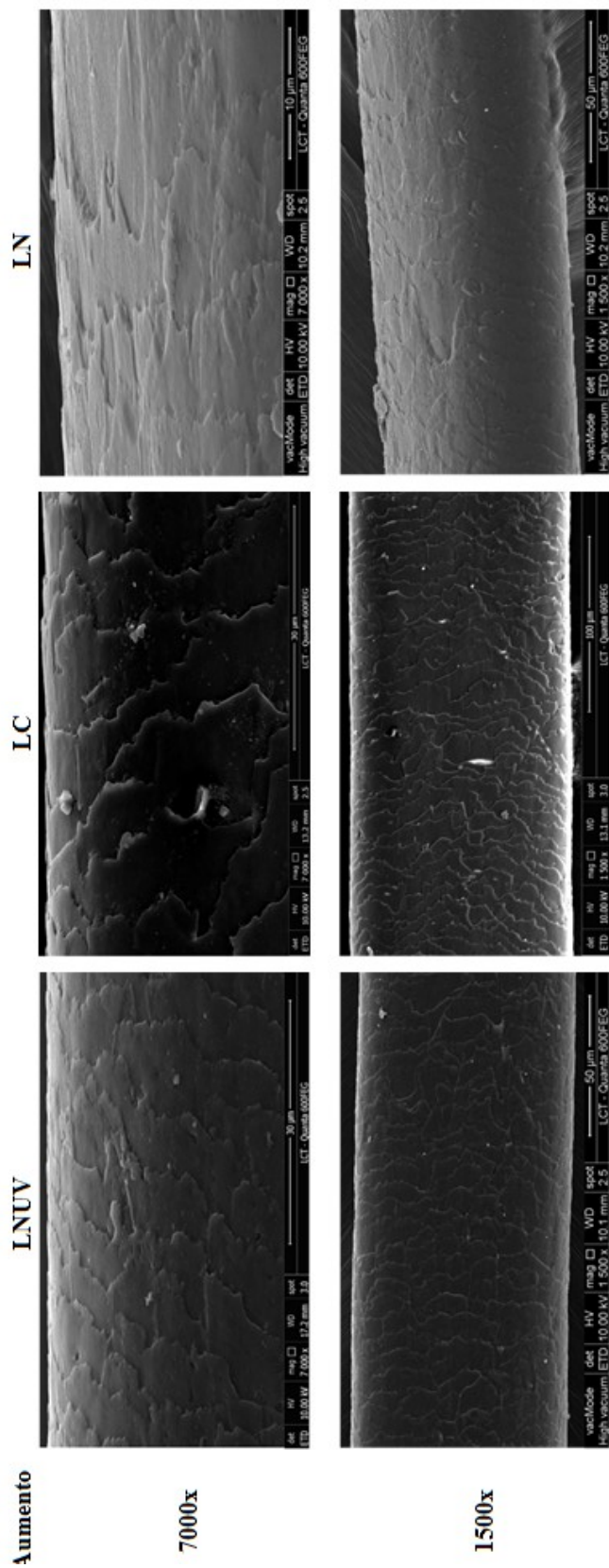


5.8.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

De acordo com as imagens obtidas por MEV, apresentadas na **Figura 63**, pode-se observar que a radiação UV/Vis não provocou alteração importante na cutícula dos fios tingidos de loiro pois a morfologia da borda das cutículas se assemelha a do fio não exposto à radiação (NI). A redução na espessura das cutículas não pode ser observada por esta técnica, o que torna a AFM mais interessante para visualização de alterações mais sutis e imperceptíveis do que a MEV. Porém uma desvantagem do AFM é a visualização de porções muito pequenas do material analisado, o que impossibilita a observação do estado geral das cutículas da fibra capilar, em maior extensão.

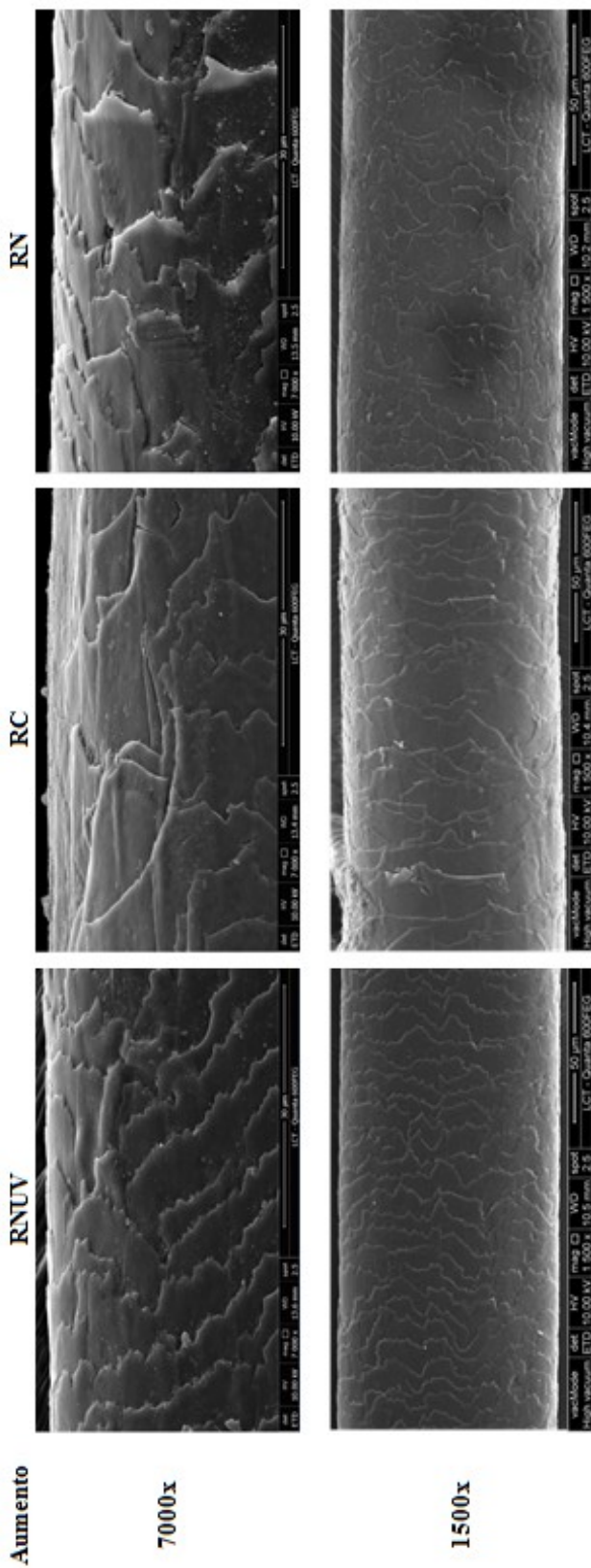
A mecha tratada com a nanoemulsão, também, não aparentou nenhuma alteração significativa nas cutículas, nem mesmo é possível visualizar a deposição de nanoemulsão sobre a fibra, como foi observado por AFM. Resultados semelhantes foram observados para as mechas tratadas com tinta cor ruivo (**Figura 64**).

Figura 63. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor loiro



Legenda: LNUV = mecha de cabelo não exposta ao UV/Vis; LC = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; LN = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão exposta à radiação UV/Vis

Figura 64. Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das mechas de cabelo tratadas com tintura cor ruivo



Legenda: RNUV = mecha de cabelo não exposta ao UV/Vis; RC = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; RN = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão exposta à radiação UV/Vis

5.8.7 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

A formação de radicais livres é apontada como uma das principais responsáveis pelos efeitos negativos que a radiação UV/Vis, indiretamente, exerce sobre a fibra capilar, acarretando na perda de propriedades, como cor (DARIO; BABY & VELASCO, 2015).

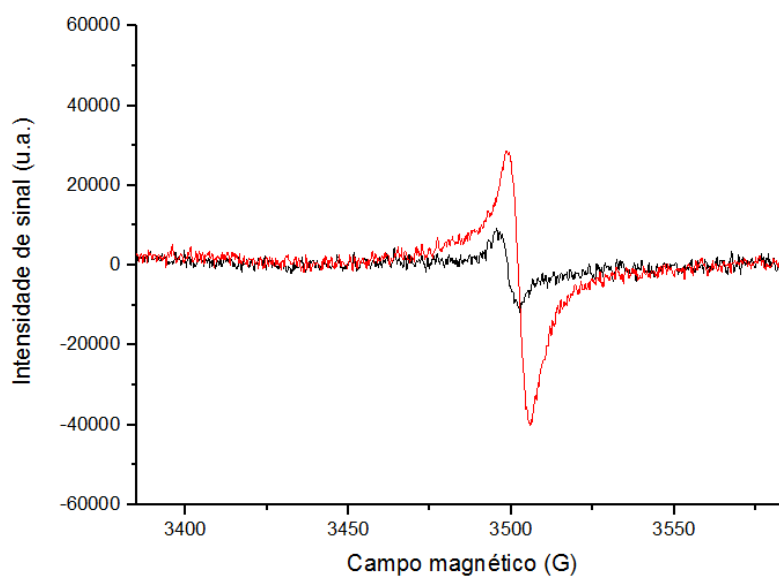
A Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) permite identificar o nível de melanina radical gerado durante a exposição à radiação UV/Vis. A melanina, por ser um polímero, apresenta diversos radicais de semiquinona em sua estrutura. Sua sensibilidade à luz, como mostrado na *Reação 1*, acarreta em aumento do sinal de melanina radical detectado por EPR após exposição à radiação. Assim, a inibição na geração de tal radical permite inferir sobre a capacidade fotoprotetora ou antirradicalar de um produto capilar, por meio do cálculo do Fator de Proteção Radicalar – FPR (*Radical Hair Protection Factor, RHF*) (HERRLING; JUNG & FUCHS, 2008). Este fator relaciona a quantidade de melanina radical formada após a exposição à radiação UV/Vis, em amostras de cabelo tratadas ou não com a formulação a ser testada.

O nível de melanina radical formada foi obtido pela dupla integração da área dos espectros de EPR para as amostras tratadas ou não com a nanoemulsão. Na **Figura 65** são apresentados os espectros demonstrativos obtidos de uma mecha tingida de loiro, enquanto na **Figura 66** aqueles obtidos para a mecha tingida de ruivo (ensaios realizados em triplicata). A partir da quantificação relativa de melanina radical formada, foi possível calcular o valor de FPR.

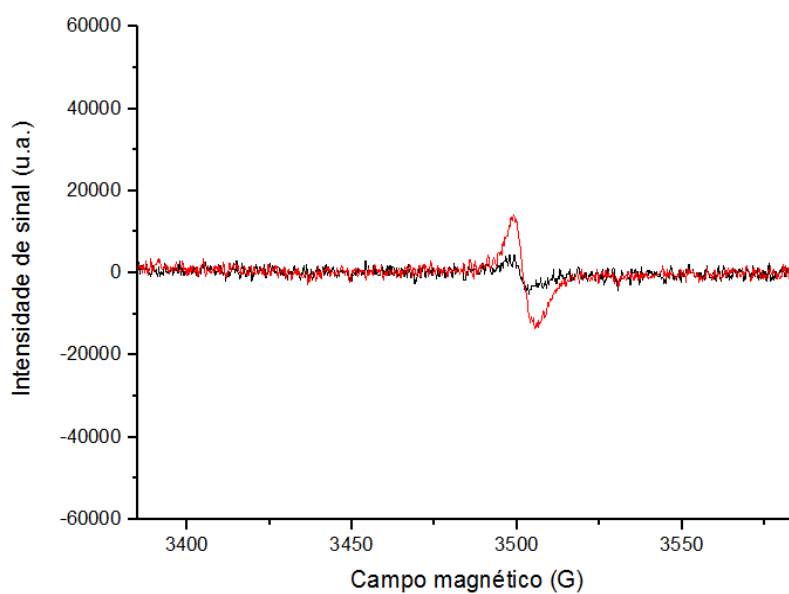
Como apresentado na **Tabela 13** e **Figura 67**, a exposição das mechas tingidas de loiro à radiação UV/Vis elevou a quantidade de melanina radical em 348%, ou seja, a radiação solar artificial, de fato, induziu a formação de radicais livres no córtex da fibra capilar (onde se localizam os grânulos de melanina). Porém, as mechas tratadas com a nanoemulsão apresentaram aumento de apenas 105%, o que indicou proteção oferecida pela nanoemulsão de quercetina. No caso das mechas tingidas de ruivo, a radiação UV/Vis promoveu aumento no nível de melanina radical em 464%, enquanto a nanoemulsão aplicada foi capaz de reduzir o nível do radical formado, de modo que o aumento foi de apenas 112%. Os valores de FPR da nanoemulsão catiônica obtidos para as mechas tingidas de loiro ou ruivo foram iguais a 3,31 e 4,14, respectivamente. Esses valores são próximos aos reportados por Herrling *et al.*, que avaliou a eficácia de filtros químicos e antioxidantes encapsulados em lipossomas na redução do nível de melanina radical formada por indução da radiação UV (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 65. Espectros de EPR do cabelo tingido de loiro antes e após a exposição à radiação UV/Vis



LC

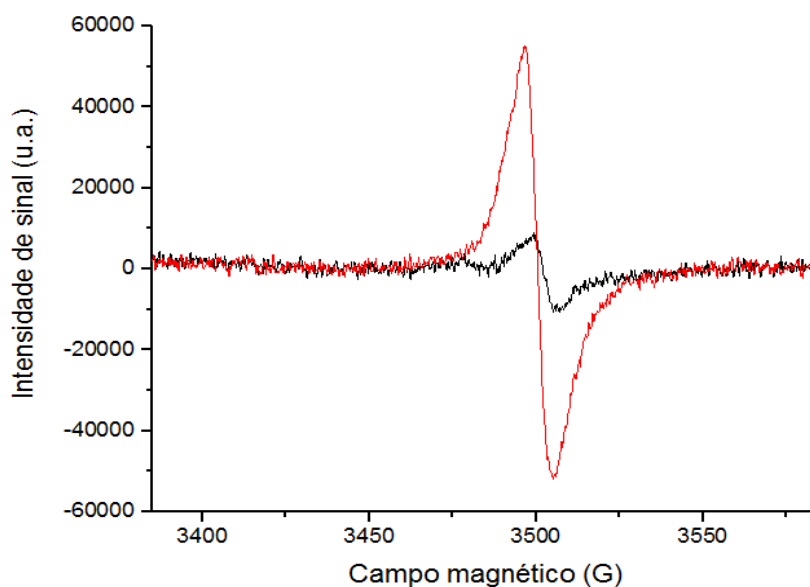


LN

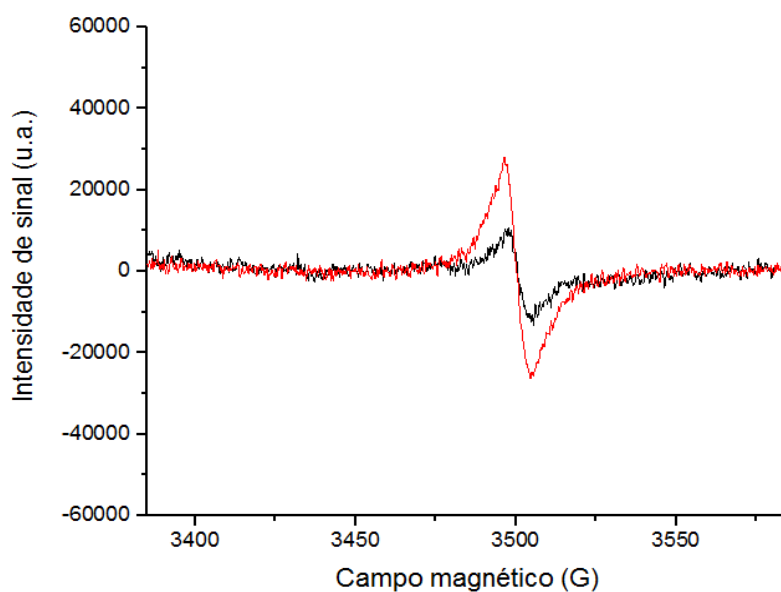
Legenda: u.a. = unidades arbitrárias; **LC** = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; **LN** = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão exposta à radiação UV/Vis; (-) sinal antes da exposição ao UV/Vis; (-) sinal após exposição ao UV/Vis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 66. Espectros de EPR do cabelo tingido de ruivo antes e após a exposição à radiação UV/Vis



RC



RN

Legenda: u.a. = unidades arbitrárias; **RC** = mecha de cabelo controle exposta à radiação UV/Vis; **RN** = mecha de cabelo aplicada de nanoemulsão exposta à radiação UV/Vis; (-) sinal antes da exposição ao UV/Vis; (-) sinal após exposição ao UV/Vis

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quercetina poderia atuar na proteção da fibra capilar por dois mecanismos: como antioxidante mas também como absorvedora da radiação UV/Vis. A quercetina apresenta elevado coeficiente de extinção molar ($28400 \pm 1700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 374nm; $28300 \pm 1700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 256 nm) (CHEN; AHN, 1998), valores semelhantes ou até mesmo maiores que os observados para alguns filtros químicos comumente utilizados em fotoprotetores, como avobenzona ($30500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 357 nm) ou octocrileno ($12600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 303 nm) (HARRIPERSAD; RHEIN, 2006). Além disso, como a quercetina apresenta potencial de interagir fortemente com proteínas (BOULTON; WALLE; WALLE, 1998) e localizava-se na interface óleo/água da nanoemulsão, ou seja, encontrava-se disponível para interagir com as proteínas existentes na cutícula (**Figura 47**), a quercetina pode ter ficado retida na superfície externa da fibra capilar. Assim, haveria elevada possibilidade de ela atuar como absorvedora da radiação UV/Vis aderida à cutícula, reduzindo assim a entrada de radiação para camadas mais profundas da fibra capilar.

A quercetina também, em função do reduzido diâmetro médio de gotícula, poderia ter penetrado a fibra capilar atingindo o córtex, local onde sua ação antioxidante promoveria a redução no nível de melanina radical induzida. Assim, sua atuação tanto como molécula absorvedora de radiação UV/Vis na cutícula quanto como antioxidante no córtex explicaria a redução do nível de melanina radical formada por indução da radiação solar artificial.

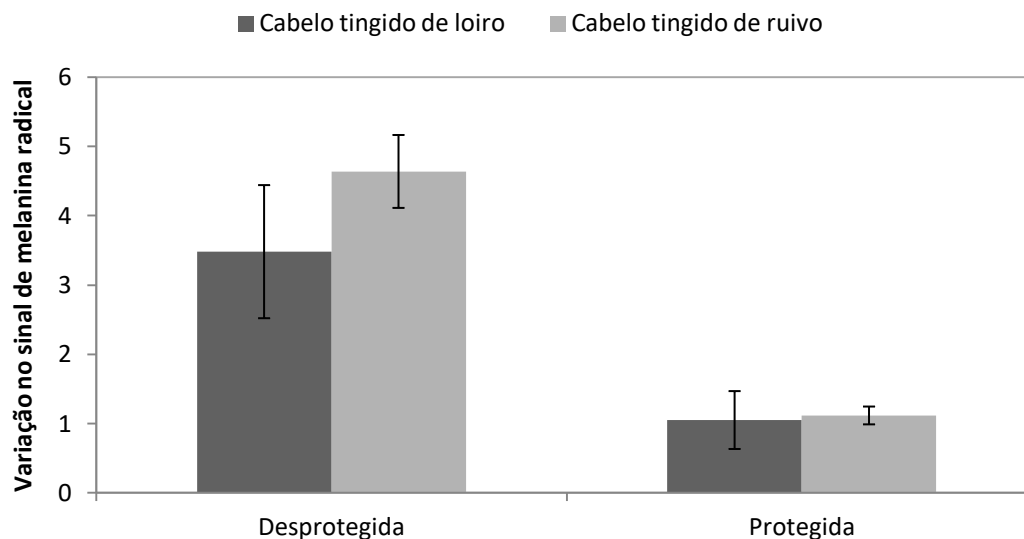
Tabela 13. Sinal de melanina radical médio das mechas tratadas ou não com a nanoemulsão catiônica bioativa, antes e após o período de exposição à radiação UV/Vis

Exposição UV/Vis	Sinal de melanina radical \pm DP (u.a.)			
	LC	LN	RC	RN
Antes	$207706,3 \pm$	$211707,9 \pm$	$192533,5 \pm$	$194810,4 \pm$
	2761,4	8814,3	55426,7	120793,8
Após	$929305,5 \pm$	$431992,5 \pm$	$1071035,5 \pm$	$404332,2 \pm$
	187233,2	70425,8	211155,6	230443,6

Legenda: u.a. = unidades arbitrárias; DP = desvio padrão; LC = mecha tingida de loiro controle (não tratada com formulação); LN = mecha tingida de loiro tratada com a nanoemulsão catiônica; RC = mecha controle (não tratada com formulação); RN = mecha tingida de ruivo tratada com a nanoemulsão catiônica

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Figura 67. Variação no sinal de melanina radical das mechas tingidas de ruivo ou loiro tratadas ou não com a nanoemulsão catiônica bioativa



5.8.8 Avaliação do estudo de eficácia da nanoemulsão catiônica

Na **Tabela 14** são apresentados, de forma concisa, os principais resultados obtidos na Avaliação de Eficácia da nanoemulsão catiônica. A nanoemulsão apresentou-se eficaz a redução do nível de radicais livres, quantificados em termos de melanina radical, das mechas de cabelo tingidas de ruivo ou loiro expostas à radiação UV/VIs. O FPR, parâmetro interessante na avaliação de eficácia, indica a capacidade de uma formulação fotoprotetora ou antioxidante em reduzir o nível de radicais livres formados por indução da radiação. Como este parâmetro está relacionado a apenas um fator que induz alterações de cor na fibra capilar tingida, sem considerar os efeitos diretos da radiação UV/Vis ou de solubilização de pigmentos, que se mostraram bastante importantes de acordo com os resultados obtidos neste estudo, torna-se necessária a avaliação de todos os parâmetros em conjunto, com a finalidade de avaliar a eficácia fotoprotetora da nanoemulsão catiônica.

Tabela 14. Resumo dos ensaios de avaliação de eficácia realizados e seus resultados

Ensaio	Resultados/Observações
Avaliação de cor	<ul style="list-style-type: none"> • Nanoemulsão protegeu a cor total (dE^*) do cabelo tingido de loiro em 58% • Nanoemulsão elevou a alteração de cor do cabelo tingido de ruivo em 47% em relação à mecha controle (180 h a 500 W/m²), mas promoveu proteção da cor em 15%, se comparado às mechas tratadas com a formulação base
Tração à ruptura	<ul style="list-style-type: none"> • A radiação UV/Vis não afetou a resistência mecânica da fibra capilar
Penteabilidade	<ul style="list-style-type: none"> • A nanoemulsão reduziu a força necessária ao pentear, melhorando o atributo penteabilidade, indicando condicionamento
Fricção	<ul style="list-style-type: none"> • Radiação UV/Vis não alterou os coeficientes de fricção • Nanoemulsão reduziu ambos os coeficientes de fricção (contra ou a favor das cutículas)
Perda proteica	<ul style="list-style-type: none"> • Os pigmentos presentes na tintura cor ruivo foram mais eficazes na proteção das estruturas proteicas, oxidando-se e prevenindo a degradação proteica. Os pigmentos da tintura cor loiro mostraram-se mais resistentes à degradação induzida pelo UV/Vis permitindo, assim, a oxidação de proteínas. • A radiação UV/Vis provocou elevada perda proteica nas mechas de cabelo • A nanoemulsão não teve nenhum impacto, positivo ou negativo, na perda proteica das mechas de cabelo tingidas de ruivo ou loiro
AFM	<ul style="list-style-type: none"> • A radiação UV/Vis (180 h a 500 W/m²) provocou redução da espessura das cutículas em aproximadamente 50%, independentemente da cor da tintura • Nanoemulsão catiônica apresentou elevada substantividade à fibra capilar
MEV	<ul style="list-style-type: none"> • A radiação UV/Vis não provocou alteração importante na cutícula dos fios tingidos de loiro ou ruivo
EPR	<ul style="list-style-type: none"> • A nanoemulsão apresentou valor de FPR (Fator de Proteção Radicalar) igual a 3,31 e 4,14, para as mechas tingidas de loiro ou ruivo, respectivamente

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A radiação UV/Vis afetou apenas alguns dos parâmetros analisados: cor, perda proteica, espessura cuticular e nível de melanina radical. Porém, em função da elevada substantividade da nanoemulsão catiônica à fibra capilar, e em especial à aderência da quercetina às proteínas cuticulares, não foi possível visualizar o perfil topográfico da cutícula tratada com a formulação por AFM, de modo a determinar o grau de proteção oferecido pela nanoemulsão. Porém, como a perda proteica esteve associada ao desgaste cuticular, pois a região do cortex não foi significativamente afetada (não houve redução de resistência mecânica), pode-se supor que a nanoemulsão não protegeu a região da cutícula do desgaste causado pela radiação UV/Vis.

A alteração de cor observada nas mechas de cabelo tingidas ocorreu, em menor ou maior grau, pela soma de três fatores: remoção dos pigmentos em função de sua solubilização durante o período em contato com a formulação, oxidação promovida pela ação direta da radiação UV/Vis e oxidação dos pigmentos pelas ERO formadas.

O primeiro fator relaciona-se com a maior solubilidade dos pigmentos de tons vermelhos, como os presentes na tinta utilizada (cor 6.66), em água (ZHOU et al., 2009) em comparação com outras cores, sendo esses pigmentos mais facilmente removidos durante os procedimentos de lavagem. Antes da exposição à radiação UV/Vis, as mechas eram colocadas em contato com a nanoemulsão por 10 min (JUNG et al., 2006; HERRLING; JUNG; FUCHS, 2008), de modo a permitir a penetração da quercetina incorporada na nanoemulsão em camadas mais profundas da fibra capilar. Assim, os componentes base da nanoemulsão promoveram a solubilização dos pigmentos retidos nas camadas mais superficiais da fibra, o que contribuiu para a alteração significativa da cor das mechas tingidas de ruivo, mas também das tingidas de loiro.

Além disso, a radiação UV/Vis interage diretamente com os pigmentos, principalmente os de tons mais escuros que atuam, também, como moléculas fotoprotetoras, garantindo maior proteção à estrutura capilar que os tons mais claros, como os loiros (PANDE; ALBRECHT; YANG, 2001). Portanto, no processo de exposição à radiação UV/Vis, as moléculas da tinta podem ter sua estrutura modificada, o que provoca alteração de cor na fibra capilar tingida.

Os resultados obtidos por Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) indicaram que a radiação UV/Vis, de fato, induziu a geração de radicais livres, de modo que o sinal de melanina radical (presente no córtex) tornou-se mais intenso após o período de exposição à radiação solar artificial. Como a alteração

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

de cor em mechas tingidas está, de acordo com a literatura, fortemente associada à ação dos radicais livres (HERRLING; JUNG; FUCHS, 2007), esperar-se-ia que a menor elevação no nível de melanina radical fosse acompanhado de menor variação da cor. Porém, isso não foi observado para as mechas tingidas de ruivo tratadas com a nanoemulsão, porque os pigmentos mais escuros absorveram fortemente a radiação UV/Vis, degradando-se. Portanto, na exposição das mechas tingidas de ruivo à radiação UV/Vis, os resultados indicam que predominam os danos diretos causados pela interação entre radiação solar e pigmentos.

Diferentemente, no caso de exposição de mechas tingidas de loiro, parece haver maior atuação dos radicais livres formados por indução da radiação UV/Vis. Neste caso, a nanoemulsão catiônica atuou reduzindo a variação de cor total, por meio da ação antioxidante e/ou absorvedora da radiação UV/Vis, mas também reforçando o tom amarelo das mechas, em função de coloração natural da quercetina.

A quercetina possui elevado potencial fotoprotetor visto que seu coeficiente de extinção molar apresenta-se muito próximo ao observado em filtros solares comumente empregados em formulações fotoprotetoras. Porém, a nanoemulsão catiônica foi desenvolvida com concentração de quercetina (0,5% p/p) cerca de 5 a 20 vezes menor que a concentração de filtros solares utilizados em fotoprotetores. Tal concentração é elevada quando se busca atividade antioxidante em uma formulação cosmética, considerando também sua baixa solubilidade, porém é insignificante quando se busca atividade fotoprotetora. Isto explicaria a ineficácia da quercetina nanoestruturada aderida à superfície externa da fibra capilar na proteção contra a perda proteica, desgaste cuticular e alteração de cor nas mechas tingidas de ruivo.

Assim, considerando que a radiação UV/Vis atua na fibra capilar tingida tanto por mecanismos diretos (promovendo oxidação das moléculas de tintura), mas também por indiretos (por meio da indução da geração de radicais livres), e com a finalidade de proteger tanto as moléculas presentes no córtex (queratina e pigmentos) quanto na cutícula, deve ser incorporada à formulação fotoprotetora capilar filtros solares eficazes nas concentrações de uso associados a antioxidantes nanoestruturados, com elevado potencial de penetrar a fibra capilar. Tais filtros solares devem ficar aderidos à cutícula, de modo a protegê-la da degradação proteica e reduzir a entrada de radiação para o interior da fibra capilar, local onde os antioxidantes nanoestruturados devem atuar como uma segunda linha de defesa (SEBETIĆ et al., 2008).

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

- O método de preparo sub-PIT foi adequado e eficaz na obtenção da nanoemulsão catiônica de diâmetro médio de gotícula reduzido ($24,97 \pm 0,30$ nm) e potencial zeta positivo ($19,6 \pm 2,2$ mV), o que a torna interessante para aplicação nos cabelos, com a finalidade de elevar a área superficial de cobertura ao longo dos fios e promover seu condicionamento, com neutralização das cargas negativas naturalmente presentes na fibra capilar;
- De acordo com a *Avaliação de Estabilidade Normal*, determinou-se que a condição de armazenamento a $45,0 \pm 2,0^\circ$ C (estufa) promoveu alteração de todos os parâmetros analisados: características organolépticas, pH, conteúdo de quercetina (-9,1%), atividade antioxidante (-18%) e diâmetro médio de gotícula (+1000%), exceto potencial zeta. As modificações observadas, exceto no diâmetro médio de gotícula, podem ser explicadas por reações de oxidação, principalmente no grupo 4'OH localizado na estrutura catecol presente no anel **B** da quercetina;
- O aumento no diâmetro médio de gotícula observado a $45,0 \pm 2,0^\circ$ C (estufa) ocorreu devido ao fenômeno de desestabilização *Ostwald ripening* (ω_3) caracterizado pela difusão individual de moléculas de óleo entre as gotículas, promovendo aumento no seu diâmetro. Esse fenômeno ocorreu em função do aumento da solubilidade da fase oleosa (triglicérides de ácido cáprico/caprílico) com elevação da temperatura do sistema;
- À temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ$ C), observou-se discreta alteração no diâmetro médio de gotícula, sendo que em temperatura baixa ($5,0 \pm 2,0^\circ$ C) nenhuma mudança foi observada. Portanto, o armazenamento a $5,0 \pm 2,0^\circ$ C ou a $25,0 \pm 2,0^\circ$ C parecem ser adequados para a nanoemulsão catiônica desenvolvida, pois, em ambos os casos, nenhum parâmetro fundamental, como atividade antioxidante, foi alterado;
- No ensaio de fotoestabilidade, observou-se que a radiação UV/Vis causou redução na absorção do sistema cinamoil da quercetina, sem causar alteração da atividade antioxidante, indicando elevada fotoestabilidade da molécula, em particular do grupo catecol presente no anel **B**, principal responsável pela sua atividade funcional;
- O processo de obtenção da nanoemulsão catiônica apresentou eficiência de encapsulamento da quercetina de 99,8%, no mínimo, contribuindo para a elevada estabilidade física da nanoestrutura.

6. CONCLUSÕES

- A caracterização reológica da nanoemulsão mostrou que a mesma apresenta típico comportamento newtoniano (ideal), o que é compatível com sua aplicação cosmética.
- As imagens obtidas por Microscopia Confocal de Fluorescência mostraram a localização preferencial da quercetina dentro da gotícula, enquanto o ensaio de Análise Térmica confirmou a interação existente entre a quercetina e os tensoativos utilizados (oleth-20 e oleth-3), indicando, assim, sua função como co-tensoativo da formulação, além de atuar como antioxidante;
- As imagens obtidas por Cryo-TEM e Microscopia de Força Atômica demonstraram que a gotícula da nanoemulsão é esférica e apresenta diâmetro de ~20-50 nm, em concordância com os resultados obtidos por DLS. Além disso, as imagens por AFM sugeriram que as nanogotículas apresentavam elevada substantividade à fibra capilar;
- De acordo com a avaliação de segurança preliminar pelo método HET-CAM, que avalia o potencial de irritação ocular da formulação, a nanoemulsão catiônica apresentou-se como levemente irritante, em função da presença do tensoativo catiônico cloreto de cetil trimetil amônio. O baixo potencial de irritação observado pelo HET-CAM foi confirmado pelo teste de biocompatibilidade cutânea em voluntários. A nanoemulsão apresentou boa compatibilidade com a pele pois, mesmo quando aplicada sob oclusão, não causou qualquer eritema ou perda da função de barreira.
- Na avaliação de eficácia, observou-se que a nanoemulsão protegeu a cor total (dE^*) do cabelo tingido de loiro em 54%, e elevou a alteração de cor do cabelo tingido de ruivo em 47%, quando exposto por 180 h à radiação UV/Vis. Além disso, a nanoemulsão reduziu a força necessária ao pentear, melhorando o atributo penteabilidade e reduziu ambos os coeficientes de fricção (contra ou a favor das cutículas).
- A radiação UV não afetou a resistência mecânica da fibra capilar nem os coeficientes de fricção, mas provocou elevada perda proteica e redução da espessura das cutículas (observado por AFM) em aproximadamente 50%, independentemente da cor da tintura.
- A nanoemulsão apresentou valor de FPR (Fator de Proteção Radicalar) igual a 3,31 e 4,14, para as mechas tingidas de loiro ou ruivo, respectivamente. Como este

6. CONCLUSÕES

parâmetro considera apenas a redução do nível de radicais livres formados nas mechas tratadas e não tratadas, sem considerar os efeitos diretos da radiação solar, outros parâmetros como alteração de cor e conteúdo proteico devem ser avaliados em conjunto, de modo a determinar o potencial fotoprotetor de uma formulação.

- A radiação UV/Vis atua tanto por mecanismo diretos (promovendo oxidação das moléculas de tintura, principalmente os tons mais escuros) quanto indiretos (por meio da indução da geração de radicais livres). Assim, com a finalidade de proteger a fibra capilar integralmente deve ser incorporada à formulação fotoprotetora capilar filtros solares, que deverão ficar aderidos à cutícula, assim como antioxidantes incorporados em nanoestruturas, que devem atuar neutralizando os radicais livres formados no interior do córtex capilar.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- ABIHPEC. **Caderno de tendências 2014-2015**. São Paulo: BB Editora, 2013. 193p.
- ABIHPEC. **Panorama do setor 2015**. São Paulo: Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos, 2015. 24p.
- AHN, H.; LEE, W. An ultrastructural study of hair fiber damage and restoration following treatment with permanent hair dye. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 2, p. 88–92, 2002.
- ALÉPÉE, N.; BESSOU-TOUYA, S.; COTOVIO, J.; SMEDT, A.; WEVER, B.; FALLER, C.; JONES, P.; LE VARLET, B.; MARREC-FAIRLEY, M.; PFANNENBECKER, U TAILHARDAT, M.; VAN GOETHEM, F MCNAMEE, P. Cosmetics Europe multi-laboratory pre-validation of the SkinEthic™ reconstituted human corneal epithelium test method for the prediction of eye irritation. **Toxicology in vitro**, v. 27, n. 5, p. 1476–1488, 2013.
- ALLTOX. **Non-animal Methods for Toxicity Testing. Table of Validated and Accepted Alternative Methods. Validation & Regulatory Acceptance Status of Alternative Test Methods & Testing Strategies**. Disponível em: <<http://www.alttox.org/ttrc/validation-ra/validated-ra-methods.html>>. Acesso em: 17 jun 2016.
- ANDERSEN, F. A. Final Report on the Safety Assessment of Oleth-2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -15, -16, -20, -23, -25, -30, -40, -44, and -501. **International Journal of Toxicology**, v. 18, n. 2, p. 17–24, 1999.
- ASH, M.; ASH, I. **Handbook of green chemicals**. New York: Synapse Information Resources, 2004. 1348p.
- AULTON, M. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 677p.
- BANOV, D.; BABY, A.; DEL BOSCO, L.; KANEKO, T.; VELASCO, M. Caracterização do Extrato Seco de Ginkgo biloba L. em formulações de uso tópico. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 25, n. 2, p. 219–224, 2006.
- BARNES, J.; FOSS JR., F.; SCHUG, K. Thermally accelerated oxidative degradation of quercetin using continuous flow kinetic electrospray-ion trap-time of flight mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 24, n. 10, p. 1513–1522, 2013.
- BEHLING, E.; SENDÃO, M.; FRANCESCATO, H.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.
- BIRT, F.; HENDRICH, S.; WANG, W. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 2–3, p. 157–177, 2001.
- BONINA, F.; LANZA, M.; MONTENEGRO, L.; PUGLISI, C.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SAIJA, A. Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 145, n. 1–2, p. 87–94, 1996.

7. REFERÊNCIAS

- BOULTON, D.; WALLE, U.; WALLE, T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 2, p. 243–249, 1998.
- BRAGULLA, H.; HOMBERGER, D. Structure and functions of keratin proteins in simple, stratified, keratinized and cornified epithelia. **Journal of Anatomy**, v. 214, n. 4, p. 516–559, 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. **Resolução R.E. n. 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bionalíticos”**. Disponível em: <<http://www.portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 17 fev 2013.
- BRASIL. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 47p.
- CARBONE, C.; CAMPISI, A.; MUSUMECI, T.; RACITI, G.; BONFANTI, R.; PUGLISI, G. FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, p. 12–20, 2014.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.; VERRI JR., W.; DORTA, D.; SANTOS, A.; FONSECA, M. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, n. 1, p. 21–27, 2006.
- CHEN, X.; AHN, D. Antioxidant Activities of Six Natural Phenolics Against Lipid Oxidation Induced by Fe²⁺ or Ultraviolet Light. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 75, n. 12, 1998.
- CHEN, Y.; LI, Q.; ZHANG, W. P.; CUI, J. J.; WU, X. J. Effect of Honeysuckle Extract for Color Protection of Human Hair Exposed to Sunlight Radiation. **Advanced Materials Research**, v. 821–822, p. 28–31, 2013.
- CLAUSSE, M. Dielectric properties of emulsions and related systems. In: BECHER, P. (Ed.). **Encyclopedia of Emulsion Technology**. New York: Marcel Dekker, 1983. p. 481–715.
- CORNARD, J.; MERLIN, J. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, n. 1, p. 19–27, 2002.
- COUNCIL OF EUROPE’S COMMITTEE OF EXPERTS ON COSMETIC PRODUCTS. **Active ingredients used in cosmetics: safety survey**. Strasbourg: Council of Europe Publishing, 2008.
- CRAIG, D.; READING, M. **Thermal analysis of pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC Press, 2006. 416p.
- DALL’ACQUA, S.; MIOLO, G.; INNOCENTI, G.; CAFFIERI, S. The

7. REFERÊNCIAS

- Photodegradation of Quercetin: Relation to Oxidation. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 8898–8907, 2012.
- DARIO, M.; BABY, A.; VELASCO, M. Effects of solar radiation on hair and photoprotection. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 153, p. 240–246, 2015.
- DARIO, M. F.; PAHL, R.; CASTRO, J. R.; LIMA, F. S.; KANEKO, T. M.; PINTO, C. A. S. O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Efficacy of Punica granatum L. hydroalcoholic extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 120, p. 142–147, 2013.
- DHAWAN, B.; AGGARWAL, G.; HARIKUMAR, S. Enhanced transdermal permeability of piroxicam through novel nanoemulgel formulation. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 4, n. 2, p. 65–76, 2014.
- DRAELOS, Z. D. Sunscreens and hair photoprotection. **Dermatologic Clinics**, v. 24, n. 1, p. 81–84, 2006.
- DRAELOS, Z. D. **Cosmetic dermatology: products and procedures**. Oxford: Blackwell Publishing, 2010. 548p.
- DRAELOS, Z. D. Innovations in Photoprotection. **Cosmetic Dermatology**, v. 24, p. 358–360, 2011.
- DUNN, S.; KEOUGH, R.; ROGERS, G.; POWELL, B. Regulation of a hair follicle keratin intermediate filament gene promoter. **Journal of Cell Science**, v. 111, n. 23, p. 3487–3496, 1998.
- DYER, J. M.; PLOWMAN, J. E.; KRSINIC, G. L.; DEB-CHOUDHURY, S.; KOEHN, H.; MILLINGTON, K. R.; CLERENS, S. Proteomic evaluation and location of UVB-induced photo-oxidation in wool. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 98, n. 2, p. 118–127, 2010.
- EUROPEAN COMMISSION SCCS/1246/09. **Opinion on alkyl (C16, C18, C22) trimethylammonium chloride for other uses than as a preservative**. Colipa nº p72. Brussels: European Commission, 2009.
- EUROPEAN COSMETICS ASSOCIATION (COLIPA). **In vitro method for the determination of the UVA protection factor and “critical wavelength” values of sunscreen products**. Disponível em: <<http://www.colipa.com>>. Acesso em: 4 maio 2015.
- EVANS, A.; MARSH, J.; WICKETT, R. The structural implications of water hardness metal uptake by human hair. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 5, p. 477–482, 2011.
- FARIA, P.; CAMARGO, L.; CARVALHO, R.; PALUDETTI, L.; VELASCO, M.; GAMA, R. Hair Protective Effect of Argan Oil (*Argania spinosa* Kernel Oil) and Cupuassu Butter (*Theobroma grandiflorum* Seed Butter) Post Treatment with Hair Dye. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 3, p. 40–44, 2013.

7. REFERÊNCIAS

FDA. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics: Guidance for Industry**. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em: 21 fev 2016.

FERNANDEZ, E.; BARBA, C.; ALONSO, C.; MARTI, M.; PARRA, J. L.; CODERCH, L. Photodamage determination of human hair. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 106, p. 101–106, 2012a.

FERNANDEZ, E.; MARTINEZ-TEIPEL, B.; ARMENGOL, R.; BARBA, C.; CODERCH, L. Efficacy of antioxidants in human hair. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 117, p. 146–156, 2012b.

FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 251, n. 1–3, p. 53–58, 2004.

FEUGHELMAN, M. Morphology and properties of hair. In: JOHNSON, D. (Ed.). **Hair and Hair Care**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 1–12.

FRANBOURG, A.; HALLEGOT, P.; BALTENNECK, F.; TOUTAIN, C.; LEROY, F. Current research on ethnic hair. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. S115–S119, 2003.

FRANÇA, S. A.; DARIO, M. F.; ESTEVES, V. B.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. Types of Hair Dye and Their Mechanisms of Action. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 110–126, 2015.

FRUIJTIER-POLLOTH, C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products. **Toxicology**, v. 214, n. 1–2, p. 1–38, 2005.

GAMA, R. **Avaliação do dano à haste capilar ocasionado por tintura oxidativa aditivada ou não de substâncias condicionadoras**. 2010. São Paulo, 2010. 181p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2010.

GAO, T.; BEDELL, A. Ultraviolet damage on natural gray hair and its photoprotection. **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, n. 2, p. 103–118, 2001.

HALAL, J. **Hair structure and chemistry simplified**. 5. ed. New York: Cengage Learning, 2009. 304p.

HARRIPERSAD, S.; RHEIN, L. Sunscreens. In: RHEIN, L.; SCHLOSSMAN, M.; O'LENICK, A.; SOMASUNDARAN, P. (Ed.). **Surfactants in Personal Care Products and Decorative Cosmetics**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. p. 277–322.

HARRISON, S.; SINCLAIR, R. Hair colouring, permanent styling and hair structure. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3–4, p. 180–185, 2003.

HERRERO-MARTÍNEZ, J.; SANMARTIN, M.; ROSÉS, M.; BOSCH, E.; RÀFOLS, C. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis.

7. REFERÊNCIAS

Electrophoresis, v. 26, n. 10, p. 1886–1895, 2005.

HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. UV - Generated Free Radicals (FR) in Skin and Hair – Their Formation, Action, Elimination and Prevention A General View. **SÖFW-Journal**, v. 133, n. 8, p. 2–11, 2007.

HERRLING, T.; JUNG, K.; FUCHS, J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 69, n. 5, p. 1429–1435, 2008.

HOTING, E.; ZIMMERMANN, M. Sunlight-induced modifications in bleached, permed, or dyed human hair. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 48, n. 2, p. 79–91, 1997.

HOTING, E.; ZIMMERMANN, M.; HOCKER, H. Photochemical alterations in human hair. Part II: Analysis of melanin. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 46, n. 4, p. 181–190, 1995.

HOWE, A.; PITT, A. Rheology and stability of oil-in-water nanoemulsions stabilised by anionic surfactant and gelatin 1) addition of nonionic, cationic and ethoxylated-cationic co-surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 144, n. 1–2, p. 24–29, 2008.

HU, F.; BU, Y.; LIANG, R.; DUAN, R.; WANG, S.; HAN, R.; WANG, P.; AI, X.; ZHANG, J.; SKIBSTED, L. Quercetin and daidzein b-apo-14'-carotenoic acid esters as membrane antioxidants. **Free Radical Research**, v. 47, n. 5, p. 413–421, 2013.

HU, Z.; LIAO, M.; CHEN, Y.; CAI, Y.; MENG, L.; LIU, Y.; LV, N.; LIU, Z.; YUAN, W. A novel preparation method for silicone oil nanoemulsions and its application for coating hair with silicone. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5719–5724, 2012.

ICCVAM. **Iccvam test method evaluation report: current validation status of in vitro test methods proposed for identifying eye injury hazard potential of chemicals and products. nih publication no. 10-7553**. Research Triangle Park, NC: NIEHS, 2010.

ICH. **ICH Q2B - International Conference on Harmonization. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073384.pdf>>. Acesso em: 5 mar 2016.

INAL, M.; KAHRAMAN, A.; KOKEN, T. Beneficial effects of quercetin on oxidative stress induced by ultraviolet A. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 26, n. 6, p. 536–539, 2001.

INOUE, T.; ITO, M.; KIZAWA, K. Labile proteins accumulated in damaged hair upon permanent waving and bleaching treatments. **Journal of Cosmetic Science**, v. 53, n. 6, p. 337–344, 2002.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; FENG, J.; GARIA-CELMA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. Phase behavior and nano-

7. REFERÊNCIAS

- emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 20, n. 16, p. 6594–6598, 2004.
- JACKSON, J.; HIGO, T.; HUNTER, W.; BURT, H. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. **Inflammation Research**, v. 55, n. 4, p. 168–175, 2006.
- JEON, S. Y.; PI, L. Q.; LEE, W. S. Comparison of hair shaft damage after UVA and UVB irradiation. **Journal of Cosmetic Science**, v. 59, n. 2, p. 151–156, 2008.
- JI, J. H.; PARK, T. S.; LEE, H. J.; KIM, Y. D.; PI, L. Q.; JIN, X. H.; LEE, W. S. The ethnic differences of the damage of hair and integral hair lipid after ultra violet radiation. **Annals of Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 54–60, 2013.
- JOVANOVIĆ, S.; STEENKEN, S.; TOSIĆ, M.; MARJANOVIĆ, B.; SIMIĆ, M. Flavonoids As Antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 11, p. 4846–4851, 1994.
- JUNG, K.; HERRLING, T.; BLUME, G.; SACHER, M.; TEICHMÜLLER, D. Detection of UV Induced Free Radicals in Hair and their Prevention by Hair Care Products. **SÖFW-Journal**, v. 132, n. 7, p. 32–36, 2006.
- KALDAS, M.; WALLE, U.; WOUDE, H.; MCMILLAN, J.; WALLE, T. Covalent binding of the flavonoid quercetin to human serum albumin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4194–4197, 2005.
- KALWEIT, S.; BESOKE, R.; GERNER, I.; SPIELMANN, H. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicology in vitro**, v. 4, n. 4/5, p. 702–706, 1990.
- KELCH, A.; WESSEL, S.; WILL, T.; HINTZE, U.; WEPF, R.; WIESENDANGER, R. Penetration pathways of fluorescent dyes in human hair fibres investigated by scanning near-field optical microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 200, n. 3, p. 179–186, 2000.
- Kirk-othmer chemical technology of cosmetics**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012. 832p.
- KLANG, V.; MATSKO, N.; VALENTA, C.; HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, 2012.
- KOPACZ, M. Quercetin- and Morinsulfonates as Analytical Reagents. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 225–229, 2003.
- KOROLEVA, M. Y.; YURTOV, E. V. Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications. **Russian Chemical Reviews**, v. 81, n. 1, p. 21–43, 2012.
- KORTE, M.; AKARI, S.; KÜHN, H.; BAGHDADLI, N.; MÖHWALD, H.; LUENGO, G. Distribution and Localization of Hydrophobic and Ionic Chemical Groups at the Surface of Bleached Human Hair Fibers. **Langmuir**, v. 30, n. 41, p. 12124–12129, 2014.

7. REFERÊNCIAS

KREPLAK, L.; DOUCET, J.; DUMAS, P.; BRIKI, F. New Aspects of the α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched Hard α -Keratin Fibers. **Biophysical Journal**, v. 87, n. 1, p. 640–647, 2004.

KUNTIC, V.; PEJIC, N.; MICIC, S.; MALESEV, D.; VUJIC, Z. Determination of dissociation constants of quercetin. **Pharmazie**, v. 58, n. 6, p. 439–440, 2003.

KURIYAN, J.; KONFORTI, B.; WEMMER, D. **The molecules of life: physical and chemical principles**. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, 2013. 1032p.

LATORRE, C.; BHUSHAN, B. Investigation of scale effects and directionality dependence on friction and adhesion of human hair using AFM and macroscale friction test apparatus. **Ultramicroscopy**, v. 106, n. 8–9, p. 720–734, 2006.

LAWRENCE, M. J.; REES, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 45, n. 1, p. 89–121, 2000.

LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFERS, A.; RIETJENS, I. The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 7, p. 869–881, 2001.

LEWIS, D.; RIPPON, J. **The coloration of wool and other keratin fibers**. West Yorkshire: John Wiley & Sons, 2013. 464p.

LIU, D.; HU, H.; LIN, Z.; CHEN, D.; ZHU, Y.; HOU, S.; SHI, X. Quercetin deformable liposome: Preparation and efficacy against ultraviolet B induced skin damages in vitro and in vivo. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 127, p. 8–17, 2013.

LOCKE, B.; JACHOWICZ, J. Fading of artificial hair color and its prevention by photofilters. **Journal of Cosmetic Science**, v. 56, n. 6, p. 407–425, 2005.

LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.; RANDALL, R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCARINI, M.; PEDULLI, G. Free radical intermediates in the inhibition of the autoxidation reaction. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 6, p. 2106–2119, 2010.

LUO, Z.; MURRAY, B. S.; YUSOFF, A.; MORGAN, M. R. A.; POVEY, M. J. W.; DAY, A. J. Particle-stabilizing effects of flavonoids at the oil-water interface. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2636–2645, 2011.

MAALI, A.; MOSAVIAN, M. Preparation and Application of Nanoemulsions in the Last Decade (2000–2010). **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 34, n. 1, p. 92–105, 2013.

MARSHALL, R.; ORWIN, D.; GILLESPIE, J. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. **Electron Microscopy Reviews**, v. 4, n. 1, p. 47–83, 1991.

7. REFERÊNCIAS

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. O/W nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 17–22, 2009.

MCCLEMENTS, D. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 2012.

MEI, Z.; LIU, S.; WANG, L.; JIANG, J.; XU, J.; SUN, D. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 565–572, 2011.

MEINERT, K.; SPRIGOB, C.; SCHIMIDT, C. U.; KRIPP, T. C. Influence of antioxidants on the sun protection properties of hair care products. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, p. 105–112, 2004.

MEZZETTI, A.; PROTTI, S.; LAPOUGE, C.; CORNARD, J. Protic equilibria as the key factor of quercetin emission in solution. Relevance to biochemical and analytical studies. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 13, n. 15, p. 6858–6864, 2011.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E. I. **Nanotecnologia terá mais investimentos e novo curso**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2013/11/nanotecnologia-tera-mais-investimentos-e-novo-curso>>. Acesso em: 13 jun. 2014.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVEZ, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 109–115, 2006.

MORALES, D.; GUTIÉRREZ, J. M.; GARCÍA-CELMA, M. J.; SOLANS, Y. C. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir**, v. 19, n. 18, p. 7196–7200, 2003.

MOREL, O.; CHRISTIE, R. Current Trends in the Chemistry of Permanent Hair Dyeing. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 4, p. 2537–2561, 2011.

MU, L.; SPRANDO, R. Application of Nanotechnology in Cosmetics. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 8, p. 1746–1749, 2010.

NANOTECH. **Consumer Products Top the 1,000 Mark**. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org>>. Acesso em: 7 jul. 2016.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Review: Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–986, 2010.

NASIR, A. “Nano Present” and “Nano Future”: The growing role of shrinking technology in dermatology, Part 1. **Cosmetic Dermatology**, v. 22, n. 3, p. 139–145, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS). **ICCVAM TEST METHOD EVALUATION REPORT: In vitro Ocular Toxicity**

7. REFERÊNCIAS

Test Methods for Identifying Severe Irritants and Corrosives. NIH Publication No: 07-4517. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/oteval/otevalrpt.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2015.

NEMEN, D.; LEMOS-SENNA, E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 408–413, 2011.

NOGUEIRA, A. C.; NAKANO, A. K.; JOEKES, I. Impairment of hair mechanical properties by sun exposure and bleaching treatments. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, n. 6, p. 533–537, 2004.

NOGUEIRA, A. C. S.; JOEKES, I. Hair color changes and protein damage caused by ultraviolet radiation. **Journal of Photochemistry & Photobiology B: Biology**, v. 74, n. 2–3, p. 109–117, 2004.

NOGUEIRA, A. C. S.; RICHENA, M.; DICELIO, L. E.; JOEKES, I. Photo yellowing of human hair. **Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology**, v. 88, n. 2–3, p. 119–125, 2007.

NOHYNEK, G.; LADERMANN, J.; RIBAUD, C.; ROBERTS, M. Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, Cosmetic and Sunscreen Safety. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 37, n. 3, p. 251–277, 2007.

OLIVEIRA, A.; SCARPA, M.; CORREA, M.; CERA, L.; FORMARIZ, T. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131–138, 2004.

OLIVEIRA, C. A.; PERES, D. Da.; RUGNO, C. M.; KOJIMA, M.; DE OLIVEIRA PINTO, C. A. S.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; ROSADO, C.; MOTA, J.; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Functional photostability and cutaneous compatibility of bioactive UVA sun care products. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 148, p. 154–159, 2015.

OLIVEIRA, C.; PERES, D.; GRAZIOLA, F.; BOU-CHACRA, N.; ARAÚJO, G.; FLÓRIDO, A.; MOTA, J.; ROSADO, C.; VELASCO, M.; RODRIGUES, L.; FERNANDES, A.; BABY, A. Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 81, p. 1–9, 2016.

PANDE, C. M.; ALBRECHT, L.; YANG, B. Hair photoprotection by dyes. **Journal of Cosmetic Science**, v. 52, n. 6, p. 377–389, 2001.

PANDE, C. M.; JACHOWICZ, J. Hair photodamage - Measurement and prevention. **Journal of Society Cosmetic Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 109–122, 1993.

PARREIRA, H. On the isoelectric point of human hair. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 1, p. 212–217, 1980.

PEŁKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776–1782, 2014.

7. REFERÊNCIAS

- PENCER, J.; HALLETT, F. R. Effects of vesicle size and shape on static and dynamic light scattering measurements. **Langmuir**, v. 19, n. 18, p. 7488–7497, 2003.
- PETERSON, G. A Simplification of the protein assay method of Lowry et al. wich is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346–356, 1977.
- PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 035–1042, 2000.
- PINHEIRO, A.; TERCI, D.; GONÇALVES, D.; PEREIRA, M.; OLIVEIRA, P.; ALENCASTRE, J.; MAIA, A.; MONTEIRO, V.; LONGO, E. Mecanismos de degradação de cor de cabelos tingidos: um novo modelo de proteção. **Cosmetic & Toiletries (Edição em Português)**, v. 14, n. 3, p. 68–77, 2002.
- POLETTI, G.; ORSINI, F.; LENARDI, C.; BARBORINI, E. A comparative study between AFM and SEM imaging on human scalp hair. **Journal of Microscopy**, v. 211, n. 3, p. 249–255, 2003.
- POPESCU, C.; HOCKER, H. Hair - the most sophisticated biological composite material. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 8, p. 1282–1291, 2007.
- PORRAS, M.; SOLANS, C.; GONZÁLEZ, C.; MATÍNEZ, A.; GUINART, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Studies of formation of W/O nano-emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 249, n. 1–3, p. 115–118, 2004.
- PRNEWswire. **Global Nanotechnology Market Outlook 2015-2020 - Industry Will Grow to Reach US\$ 75.8 Billion**. Disponível em: <<http://www.prnewswire.com>>. Acesso em: 27 abr 2016.
- QU, X.; KIRSCHENBAUM, L. J.; BORISH, E. T. Hydroxyterephthalate as a fluorescent probe for hydroxyl radicals: application to hair melanin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, n. 3, p. 307–313, 2000.
- RICHENA, M.; SILVEIRA, M.; REZENDE, C. A.; JOEKES, I. Yellowing and bleaching of grey hair caused by photo and thermaldegradation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 138, p. 172–181, 2014.
- ROBBINS, C. R. **Chemical and physical behavior of human hair**. New York: Springer, 2012. 724p.
- ROBBINS, C.; REICH, C. Prediction of hair assembly characteristics from single-fiber properties. Part II. The relationship of fiber curvature, friction, stiffness, and diameter to combing behavior. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 37, n. 3, p. 141–158, 1986.
- ROGER, K.; CABANE, B.; OLSSON, U. Formation of 10-100nm size-controlled emulsions through a sub-PIT cycle. **Langmuir**, v. 26, n. 6, p. 3860–3867, 2010.
- ROGER, K.; CABANE, B.; OLSSON, U. Emulsification through Surfactant Hydration: The PIC Process Revisited. **Langmuir**, v. 27, n. 2, p. 604–611, 2011.

7. REFERÊNCIAS

- ROUSE, J.; DYKE, M. A Review of Keratin-Based Biomaterials for Biomedical Applications. **Materials**, v. 3, n. 2, p. 999–1014, 2010.
- RUETSCH, S. B.; KAMATH, Y.; WEIGMANN, H. D. Photodegradation of human hair: An SEM study. **Journal of Cosmetic Science**, v. 51, p. 103–125, 2000.
- SANDHU, S.; RAMACHANDRAN, R.; ROBBINS, C. A Simple and Sensitive Method Using Protein Loss Measurements to Evaluate Damage to Human Hair During Combing. **Journal of Society Cosmetic Chemistry**, v. 46, n. 1, p. 39–52, 1995.
- SAUNDERS, M. Thermal Analysis of Pharmaceuticals. In: GABBOTT, P. (Ed.). **Principles and Applications of Thermal Analysis**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008.
- SCANAVEZ, C.; SILVEIRA, M.; JOEKES, I. Human hair: color changes caused by daily care damages on ultra-structure. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 28, n. 1, p. 39–52, 2003.
- SCANAVEZ, C.; ZOEGA, M.; BARBOSA, A.; JOEKES, I. Measurement of hair luster by diffuse reflectance spectrophotometry. **Journal of Cosmetic Science**, v. 51, p. 289–302, 2000.
- SCHLOSSER, A. Silicones used in permanent and semi-permanent hair dyes to reduce the fading and color change process of dyed hair occurred by wash-out or UV radiation. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, p. 23–31, 2004.
- SCHUCH, A. P.; GARCIA, C. C. M.; MAKITA, K.; MENCK, C. F. M. DNA damage as a biological sensor for environmental sunlight. **Photochemistry and Photobiology Science**, v. 12, n. 8, p. 1259–1272, 2013.
- SEBETIĆ, K.; SJEROBABSKI, M.; CAVKA, V.; BILJAN, D.; KROLO, I. UV Damage of the Hair. **Collegium Antropologicum**, v. 32, n. 2, p. 163–165, 2008.
- SESHADRI, I.; BHUSHAN, B. In situ tensile deformation characterization of human hair with atomic force microscopy. **Acta Materialia**, v. 56, n. 4, p. 774–781, 2008.
- SHAATH, N. A. Global developments in sun care ingredients. **Cosmetic & Toiletries**, v. 121, p. 57–66, 2006.
- SHARMA, O.; BHAT, T. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, n. 15, p. 1202–1205, 2009.
- SHARMA, S.; GOYAL, N. In vitro antioxidant activity of root extracts of *Heliotropium eichwaldi* Stued. ex DC. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 3, n. 1, p. 444–449, 2012.
- SHINODA, K.; SAITO, H. The Effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersions of the ternary system composed of water, cyclohexane, and nonionic surfactant. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 26, n. 1, p. 70–74, 1968.
- SIGNORI, V. Review of the current understanding of the effect of ultraviolet and

7. REFERÊNCIAS

visible radiation on hair structure and options for photoprotection. **Journal of Cosmetic Science**, v. 55, n. 4, p. 95–113, 2004.

SILVA, A.; NUNES, A.; GESZTESI, J. Protein Loss Quantification of Abraded Virgin and Abraded Bleached Hair According to Bradford Assay. **Journal of Society Cosmetic Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 175–179, 2004.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

STAHL, E.; SCHILD, W. **Pharmazeutische biologie, 4. drogenanalyse ii. inhaltsstoffe und isolierungen**. New York: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1981.

STATISTA. **Size of the global hair care market from 2012 to 2021 (in billion U.S. dollars)**. Disponível em: <<http://www.statista.com/statistics/254608/global-hair-care-market-size/>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

SWIFT, J.; SMITH, J. Atomic force microscopy of human hair. **Scanning**, v. 22, n. 5, p. 310–318, 2000.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 75, n. 2, p. 107–163, 1998.

TAYLOR, P. Ostwald ripening in emulsions: estimation of solution thermodynamics of the disperse phase. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 106, p. 261–285, 2003.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOPA, U.; CROSBY, K.; ZEVALLOSC, L.; BYRNEC, D. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6–7, p. 669–675, 2006.

THIBAUT, S.; BARBARAT, P.; LEROY, F.; BERNARD, B. Human hair keratin network and curvature. **International Journal of Dermatology**, v. 46, n. 1, p. 7–10, 2007.

TIMBOLA, A.; SOUZA, C.; GIACOMELLI, C.; SPINELLI, A. Electrochemical Oxidation of Quercetin in Hydro-Alcoholic Solution. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 1, p. 139–148, 2006.

TOBIN, D. **Hair in toxicology: an important bio-monitor**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005. 355p.

TOBIN, D. Biochemistry of human skin – our brain on the outside. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 1, p. 52–67, 2006.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. **Nanotechnology Drug Delivery Market to reach US\$ 11.9 Bn in 2023**. Disponível em:

7. REFERÊNCIAS

<<http://www.transparencymarketresearch.com>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

TYUKAVKINA, N.; POGODAEVA, N. Ultraviolet absorption of flavonoids VIII. ionization constants of kaempferol and quercetin. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 11, n. 6, p. 741–743, 1975.

UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. **The United States Pharmacopeia (USP). USP 37 - NF 32**. 37. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

VELASCO, M.; BALOGH, T.; PEDRIALI, C.; SARRUF, F.; PINTO, C.; KANEKO, T.; BABY, A. Associação da Rutina com p-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação In Vitro da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 1, p. 23–27, 2008.

VELASCO, M.; DIAS, T.; FREITAS, A.; VIEIRA-JUNIOR, N.; PINTO, C.; KANEKO, T.; BABY, A. Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 153–162, 2009.

VELASCO, M.; SARRUF, F.; OLIVEIRA, C.; SILVA, A.; CONSIGLIERI, V.; KANEKO, T.; BABY, A. Influences of bioactive substances on the physicochemical and functional stability of sunscreen emulsions. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 119–130, 2012.

VOLPO. **Fatty alcohol ethoxylates**. Disponível em:
<http://www.chservice.ru/download/DC_Volpo.pdf>. Acesso em: 16 maio. 2013.

WAKAMATSU, K.; NAKANISHI, Y.; MIYAZAKI, N.; KOLBE, L.; ITO, S. UVA-induced oxidative degradation of melanins: fission of indole moiety in eumelanin and conversion to benzothiazole moiety in pheomelanin. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 4, p. 434–445, 2012.

WEIGMANN, H.; KAMATH, Y. Evaluation methods for conditioned hair. In: GODDARD, E.; GRUBER, J. (Ed.). **Principles of polymer science and technology in cosmetics and personal care**. vol. 22 ed. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 668.

WEISS, J.; CANCELIERI, C.; MCCLEMENTS, D. Mass Transport phenomena in oil-in-water emulsions containing surfactant micelles: Ostwald ripening. **Langmuir**, v. 16, n. 17, p. 6833–6838, 2000.

WEISS, J.; COUPLAND, J.; BRATHWAITE, D.; MCCLEMENTS, D. Influence of molecular structure of hydrocarbon emulsion droplets on their solubilization in nonionic surfactant micelles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 121, n. 1, p. 53–60, 1997.

WILKINSON, J.; MOORE, R. **Cosmetología de harry**. Madrid: Diaz de Santos, 1990. 1062p.

WOLFRAM, L. Human hair: a unique physicochemical composite. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. S106-14, 2003.

7. REFERÊNCIAS

WOOSTER, T. J.; GOLDING, M.; SANDUANSRI, P. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p. 12758–12765, 2008.

WU, T.; YEN, F.; LIN, L.; TSAI, T.; LIN, C.; CHAM, T. Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1–2, p. 160–168, 2008.

ZENKEVICH, I.; ESHCHENKO, A.; MAKAROVA, S.; VITENBERG, A.; DOBRYAKOV, Y.; UTSAL, V. Identification of the Products of Oxidation of Quercetin by Air Oxygen at Ambient Temperature. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 654–672, 2007.

ZHOU, Y.; FOLTIS, L.; MOORE, D.; RIGOLETTO, R. Protection of oxidative hair color fading from shampoo washing by hydrophobically modified cationic polymers. **Journal of Cosmetic Science**, v. 60, n. 2, p. 217–238, 2009.

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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



**PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA DA ESCOLA de CIÊNCIAS
e TECNOLOGIAS DA SAÚDE DA ULHT**

A Comissão de Ética da ULHT emite o seguinte parecer sobre o protocolo de investigação datado de 19 de Fevereiro de 2015 e registado com o nº1/2015 pela investigadora administradora do projecto Senhora Professora Doutora Catarina Rosado:

1. O protocolo agora presente à CE intitulado "Estudo da compatibilidade cutânea de nanoemulsão contendo quercetina".
2. Confirma-se o protocolo submetido a parecer como respeitador das regras de ética exigidas para a sua execução pelo que se aprova desde que executado no estrito respeito das condições apresentadas.

Lisboa, 01 de Março de 2015

O Presidente da Comissão de Ética

(Amílcar Elizeu Rato da Silva Roberto)

ANEXO C - Currículo Lattes

raís Formação Atuação Projetos Produções Eventos Orientações +

**Michelli Ferrera Dario**

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3443343520041941>

Última atualização do currículo em 10/08/2016

Possui graduação em Farmácia-Bioquímica pela Universidade de São Paulo (2012). Atualmente é doutoranda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, tendo realizado estágio de pesquisa na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) em 2014. Atua na área de desenvolvimento e avaliação de eficácia de produtos cosméticos, com ênfase em nanocosméticos. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome

Michelli Ferrera Dario

Nome em citações bibliográficas

DÁRIO, M. F.; DÁRIO, MICHELLI F.; DÁRIO, MICHELLI FERRERA


Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
Av. Professor Lineu Prestes 580, bl. 13, Laboratório de Farmacotecnica
Butanta
05508-000 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (011) 30913623

Formação acadêmica/titulação

2012

Doutorado em andamento em Fármaco e Medicamentos.
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF-USP, Brasil.
Título: Desenvolvimento e avaliação da eficácia de nanoemulsão catiônica bioativa na proteção capilar aos danos foto-oxidativos.
Orientador:  Maria Valéria Robles Velasco.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

2008 - 2012

Graduação em Farmácia-Bioquímica.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Avaliação da eficácia foto-oxidativa de condicionador leave-in aditivado de extrato de *Punica granatum* L. (romã) e/ou silicone.
Orientador: Maria Valéria Robles Velasco.

Formação Complementar

2015 - 2015

Bons Práticas de Pipetagem. (Carga horária: 4h).
Mettler Toledo, METTLER TOLEDO, Brasil.

2015 - 2015

CGEN: O passo a passo para a aprovação. (Carga horária: 3h).
Associação Brasileira de Cosmetologia, ABC, Brasil.

2015 - 2015

Como obter medições de pH confiáveis e robustas. (Carga horária: 3h).
Mettler Toledo, METTLER TOLEDO, Brasil.

2013 - 2013

ANEXO C - Currículo Lattes

Metodol., técnicas e aplic p/ caracteriz. partículas. (Carga horária: 8h).
Malvern Instruments, MALVERN INSTRUMENTS, Brasil.

2012 - 2012

Nanotecnologia. (Carga horária: 8h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF-USP, Brasil.

2011 - 2011

Oficina - Desenvolvimento de perfumes. (Carga horária: 4h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF-USP, Brasil.

Atuação Profissional

Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, FCUL, Portugal.

Vínculo institucional

2014 - 2015

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Bolsista - Doutorado Sanduíche no Exterior, Carga horária: 40

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, FCF-USP, Brasil.

Vínculo institucional

2012 - Atual

Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Pós-graduanda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2011 - 2011

Vínculo: bolsista Fapesp, Enquadramento Funcional: Estagiária de Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Vínculo institucional

2008 - 2009

Vínculo: bolsista CNPq, Enquadramento Funcional: Estagiária de iniciação científica, Carga horária: 20, Regime: Dedicção exclusiva.

Atividades

01/2011 - 12/2011

Pesquisa e desenvolvimento, Departamento de Cosmetologia, .

Linhas de pesquisa

Avaliação foto-oxidativa da fibra capilar tratada com condicionador bioativo ou aditivado de silicone após processo de coloração

09/2008 - 08/2009

Pesquisa e desenvolvimento, Departamento de Cosmetologia, .

Linhas de pesquisa

Desenvolvimento planejado de fotoprotetores associados à substância bioativa: caracterização física, físico-química e funcional.

Linhas de pesquisa

1. Avaliação foto-oxidativa da fibra capilar tratada com condicionador bioativo ou aditivo de silicone após processo de coloração
2. Desenvolvimento planejado de fotoprotetores associados à substância bioativa: caracterização física, físico-química e funcional.

Projetos de pesquisa

2014 - 2015 Análise térmica aplicada à caracterização de material nanoestruturado

Descrição: A radiação ultravioleta solar é uma das responsáveis por acelerar os processos oxidativos, tanto na pele quanto nos cabelos, por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO). Este processo pode ser impedido ou reduzido utilizando-se substâncias antioxidantes, como os flavonoides. A sua incorporação em formulações cosméticas em concentrações próximas das recomendadas é limitada pela sua baixa solubilidade. Porém a incorporação dos flavonoides em nanoestruturas pode tornar possível sua utilização em formulações cosméticas, uma vez que a dispersão do princípio ativo em pequenas partículas eleva a concentração possível de ser incorporada. Além disso, os flavonoides também podem apresentar a função de estabilizar tais nanoestruturas, incorporando-se na interface água/óleo de nanoemulsões, originando a denominada emulsão de pickering. As nanoemulsões podem ser caracterizadas por várias técnicas, dentre as quais se destaca a análise térmica, que compreende a Termogravimetria (TG) e a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). A TG fornece informação sobre a decomposição térmica dos compostos orgânicos ou processos de hidratação/desidratação. A técnica de DSC permite determinar a temperatura e a variação de entalpia/entropia associadas a fenômenos químicos, como interação entre substâncias, sendo um método muito utilizado para determinação de incompatibilidade entre fármacos e excipientes. A caracterização de nanoemulsões por análise térmica é pouco explorada, apesar de apresentar elevado potencial de utilização como forma de estudar as possíveis interações (negativas ou positivas) entre os componentes. Assim, o objetivo deste trabalho é caracterizar o perfil térmico de nanoemulsões contendo o flavonoide quercetina, avaliando possíveis interações entre o flavonoide e os tensoativos, determinado-se se a formulação desenvolvida trata-se de uma emulsão de pickering..

Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Doutorado: (1) .

Integrantes: Michelli Ferrera Dario - Coordenador / Manuel Eduardo Minas da Piedade - Integrante.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Bolsa.

2012 - Atual Condicionador nanotecnológico bioativo na proteção capilar à radiação ultravioleta

Descrição: Os cabelos tratados com tintura oxidativa podem, por diversos mecanismos, incluindo exposição à radiação solar, apresentar alterações em suas características de cor, brilho e conteúdo proteico. Visando contornar este problema, tem sido proposta a incorporação de substâncias antioxidantes em produtos de tratamento capilar, com a finalidade de minimizar os efeitos oxidativos e promover a melhora das características da fibra capilar. A nanotecnologia tem sido cada vez mais empregada no desenvolvimento de produtos cosméticos, devido às excelentes características sensoriais que pode promover no produto e elevação de eficácia com reduzidas concentrações dos componentes ativos. Outra tendência mundial envolve o uso de substâncias de origem vegetal utilizadas em formulações cosméticas. Aliando os dois conceitos, torna-se interessante a incorporação de flavonoides oriundos de plantas, de reconhecida atividade antioxidante, em nanoemulsões catiônicas visando à aplicação capilar, visto a característica de carga negativa que a fibra capilar possui em decorrência do ponto isolétrico da queratina (em torno de 3,8), e visando condicionamento elevado na fibra, proteção da cor e manutenção de suas propriedades física, físico-química e química. Neste projeto, o polifenol quercetina (0,1% p/p) será incorporado em nanoemulsões catiônicas desenvolvidas pelo método sub-PIT, que serão avaliadas, por meio da Avaliação de Estabilidade Normal quanto aos parâmetros: características organolépticas, pH, tamanho de gotícula, potencial zeta, atividade antioxidante e conteúdo de flavonoides. O formato das micelas contidas nas nanoemulsões aprovadas na Avaliação de Estabilidade Normal será avaliado por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As formulações (nano e macroemulsões de mesma composição) serão aplicadas a mechas de cabelo caucasiano castanho-escuro tratadas com tinturas oxidativas nas tonalidades loiro ou ruivo, que serão expostas à radiação ultravioleta artificial A ou B. Todas as mechas serão avaliadas quanto aos parâmetros cor, brilho, tração à ruptura, perda proteica e perfil térmico de degradação. Espera-se, com este projeto, demonstrar que nanoemulsões possuem maior poder de condicionamento da fibra capilar, em comparação à macroemulsões de mesma composição, e ainda que o flavonoide quercetina seria capaz de evitar a oxidação tanto dos pigmentos artificiais presentes nas tinturas capilares, reduzindo as alterações de cor provocadas pela radiação UV, quanto dos componentes da fibra capilar, como proteínas, evitando perda proteica e redução de suas propriedades mecânicas..

Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.
Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) .

Integrantes: Michelli Ferrera Dario - Integrante / Maria Valeria Robles Velasco - Coordenador.
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Auxílio financeiro.

Revisor de periódico

2015 - Atual Periódico: International Journal of Cosmetic Science (Print)

Prêmios e títulos

- 2016 2º lugar na Categoria de Trabalho Científico Oral no 29º Congresso Brasileiro de Cosmetologia com o trabalho "Fotoproteção em cabelos tingidos: nanoemulsão catiônica bioativa de ação eficaz", Associação Brasileira de Cosmetologia.
- 2016 2º lugar na Categoria de Trabalho Científico Pôster no 29º Congresso Brasileiro de Cosmetologia com o trabalho "Dano proteico em fibra capilar submetida a diversos tratamentos químicos e físicos", Associação Brasileira de Cosmetologia.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Impacto JCR

8. [doi](#) OLIVEIRA, CAMILA AREIAS DE ; **DARIO, MICHELLI FERRERA** ; SARRUF, FERNANDA DAUD ; MARIZ, INÊS FÁTIMA AFONSO ; VELASCO, MARIA VALÉRIA ROBLES ; ROSADO, CATARINA ; BABY, ANDRÉ ROLIM . Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces (Print)* **JCR**, v. 140, p. 531-537, 2015.
1. [★ doi](#) **DARIO, MICHELLI FERRERA**; OLIVEIRA, CAMILA AREIAS DE ; CORDEIRO, L. R. G. ; ROSADO, CATARINA ; MARIZ, I. F. A. ; MACOAS, E. ; SANTOS, M. S. C. C. S. ; Piedade, M.E.M. ; BABY, ANDRÉ R. ; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion: In vitro and in vivo assessments. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)* **JCR**, v. 506, p. 591-599, 2016.
6. [doi](#) **DARIO, M. F.**; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Effects of solar radiation on hair and photoprotection. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **JCR**, v. 153, p. 240-246, 2015.
Citações: **SCOPUS** 1
7. [★ doi](#) **DARIO, MICHELLI F.**; SANTOS, M.SOLEDADE C.S. ; VIANA, ANA S. ; ARÉAS, ELIZABETH P.G. ; BOU-CHACRA, NÁDIA A. ; OLIVEIRA, M.CONCEIÇÃO ; PIEDADE, MANUEL E.MINAS DA ; BABY, ANDRÉ R. ; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . A high loaded cationic nanoemulsion for quercetin delivery obtained by sub-PIT method. *Colloids and Surfaces. A, Physicochemical and Engineering Aspects (Print)* **JCR**, p. 256-264, 2015.
12. [doi](#) **DARIO, M. F.**; PAHL, R. ; CASTRO, J. R. ; LIMA, F. S. ; KANEKO, T. M. ; PINTO, C.A.S.O. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Efficacy of Punica granatum L. hydroalcoholic extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* **JCR**, v. 120, p. 142, 2013.
Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 5 | **SCOPUS** 8
9. [doi](#) VELASCO, M. V. R. ; VIEIRA, R. P. ; FERNANDES, A. R. ; **DARIO, M. F.** ; PINTO, C. A. S. O. ; PEDRIALI, C. A. ; KANEKO, T. M. ; BABY, A. R. . Short-term clinical of peel-off facial mask moisturizers. *International Journal of Cosmetic Science (Print)* **JCR**, v. 36, p. 355-360, 2014.
3. [doi](#) FRANCA, S. ; **DARIO, M. F.** ; ESTEVES, V. B. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Types of Hair Dye and Their Mechanisms of Action. *Cosmetics*, v. 2, p. 110-126, 2015.
Citações: **SCOPUS** 2
2. VELASCO, M. V. R. ; BALOGH, T.S. ; KAGIYAMA, E. J. W. ; **DARIO, M. F.** ; GAMA, R. M. ; BEDIN, V. ; BABY, A. R. . Influence of Brazilian vegetable oils on mechanical resistance of hair fiber. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, v. 12, p. 99-106, 2015.
5. [doi](#) FRANCA, S. ; **DARIO, M. F.** ; SÁ DIAS, T. C. ; BEDIN, V. ; ALMEIDA, A. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Protein loss in human hair from combination straightening and coloring treatments. *Journal of Cosmetic Dermatology (Print)* **JCR**, v. 14, p. 204-208, 2015.
10. VELASCO, MARIA VALÉRIA R. ; BABY, ANDRÉ R. ; INOUE, S. N. ; AKTAGAWA, D. ; **DARIO, MICHELLI FERRERA** . Formulações de Fixadores/estilizantes capilares. *Cosmetics & Toiletries (Ed. portugues)*, v. 40, p. 38-43, 2014.
11. [doi](#) FERNANDES, A. R. ; **DARIO, M. F.** ; PINTO, C.A.S.O. ; KANEKO, T.M. ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Stability evaluation of organic Lip Balm. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (Impresso)* **JCR**, v. 49, p. 293-299, 2013.
Citações: **WEB OF SCIENCE**™ 1 | **SCOPUS** 3
4. MARTINS, T. E. A. ; COSTA, G. M. D. ; PINTO, C. A. S. O. ; **DARIO, M. F.** ; BABY, A. R. ; VELASCO, M. V. R. . Review of Children's Products for Topical Use. *Household and Personal Care Today (Testo Stampato)*, v. 10, p. 75-77, 2015.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. BALOGH, T.S. ; PEDRIALI, C.A. ; **DARIO, M. F.** ; RAIA, K.S.S. ; PRESTES, P.S. ; GAMA, R.M. ; PINTO, C.A.S.O. ; KANEKO, T.M. ; VELASCO, M. V. R. . Estudo comparativo da eficácia fotoprotetora in vitro dos extratos glicólico e hidroalcoólico de romã (Punica granatum L.). In: XX COLAMIQ, 2011. CD-ROM of XX COLAMIQ, 2011.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. VELASCO, M. V. R. ; **DARIO, M. F.** ; PAHL, R. ; CASTRO, J. R. ; LIMA, F. S. . Evaluation of photo-oxidative effectiveness of bioactive conditioner applied to hair fiber exposed to solar and artificial ultraviolet radiation. In: 27th Congress IFSCC, 2013, South Africa. CD-ROM of 27th Congress IFSCC, 2013.
2. **DARIO, M. F.**; PAHL, R. ; CASTRO, J. R. ; LIMA, F. S. ; VELASCO, M. V. R. . Effectiveness of Punica granatum L. extract in maintaining color of hair fibers exposed to UVA radiation. In: I Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêutica, 2013, Porto de Galinhas. Anais do I Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêutica, 2013.

3. **DARIO, M. F.**; KATO, E. T. M.; FREITAS, P. C. D.; BABY, A. R.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. . Influence of ethanol on antioxidant activity and tannin content of pomegranate extract. In: XXVth International Conference on Polyphenols, 2012, Florença, Polyphenols Communications 2012, 2012, v. II.

Resumos publicados em anais de congressos

1. **DARIO, MICHELLI FERRERA**; FORSTER, C.; FUJII, L.; SU, C. Y.; PINTO, C. A. S. O.; VIANA, ANA S.; LINARES, E.; AUGUSTO, O.; MARIZ, I. F. A.; MACOAS, E.; BEDIN, V.; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . Fotoproteção em cabelos tingidos: nanoemulsão catiônica bioativa de ação eficaz. In: 29º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2016, São Paulo. Cosmetic & Toiletries, 2016, v. 26, p. 81-82.
2. **DARIO, M. F.**; SANTOS, M. S. C.; PIEDADE, M. E. M.; BOU-CHACRA, N. A.; PINTO, C. A. S. O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Formulation optimization and stability evaluation of a bioactive cationic nanoemulsion containing quercetin. In: 5th International Colloids Conference 2015, 2015, Amsterdam. Abstracts of 5th International Colloids Conference, 2015, p. 270.
3. **DARIO, M. F.**; BELINI, N. C.; CORDEIRO, L. R. G.; PINTO, C.A.S.O.; BEDIN, V.; BOU-CHACRA, N. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Nanoemulsão capilar bioativa contendo quercetina: caracterização e avaliação de segurança por método alternativo in vitro. In: 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014. Anais do 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 2014.
4. PINTO, C. A. S. O.; COSTA, G. M. D.; MARTINS, T. E. A.; ISSA, M. G.; **DARIO, M. F.**; PERES, D. A.; CONSIGLIERI, V.O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Interaction between butyl methoxydibenzoylmethane, ethylhexyl methoxycinnamate and rutin: MNR, fluorescence and thermal analysis. In: 28th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) 2014, 2014, Paris. Anais of Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2014, p. 3254-3255.
5. SÁ DIAS, T. C.; LIMA, C. C.; MATOS, J.; GAMA, R. M.; **DARIO, M. F.**; FRANCA, S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Evaluation of actives to straight the hair by thermal analysis. In: 28th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) 2014, 2014, Paris. Anais of Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2014, p. 1946-1949.
6. **DARIO, M. F.**; BOU-CHACRA, N. A.; BABY, A. R.; CONSIGLIERI, V. O.; BEDIN, V.; VELASCO, M. V. R. . Bioactive cationic nanoemulsion: development and characterization. In: 28th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) 2014, 2014, Paris. Anais of Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC), 2014, p. 2336-2340.
7. VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R.; PEDRIALI, C.A.; **DARIO, M. F.**; VILLA, R. T.; KANEKO, T. M.; BEDIN, V. . Antioxidant activity and photoprotection of rutin succinate bioflavonoid. In: 71th Annual Meeting - American Academy of Dermatology, 2013, Miami. Journal of the American Academy of Dermatology, 2013, v. 68, p. AB188-AB188.
8. COSTA, G. M. D.; PINTO, C.A.S.O.; GONCALVES, M. I. A.; KANEKO, T.M.; **DARIO, M. F.**; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada à quantificação simultânea de filtros solares em fotoprotetores. In: XXI Colamiq, 2013. Cosmetic & Toiletries, v. 25, p. 128.
9. **DARIO, M. F.**; KATO, E.T.M.; FREITAS, P.C.D.; BABY, A. R.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M. V. R. . Stability evaluation of hair leave-in conditioners incorporated with pomegranate. In: XVI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2011, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011, v. 47, p. 22-22.
10. **DARIO, M. F.**; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Caracterização de fotoprotetores sob influência de flavonóide. In: 17 Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP, 2009, Ribeirão Preto. CD-ROM do 17 Simpósio de Iniciação Científica da USP, 2009.
11. **DARIO, M. F.**; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Characterization of sunscreens with or without a bioactive substance. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, v. 45, p. 16-16.

Apresentações de Trabalho

1. **DARIO, MICHELLI FERRERA**; FORSTER, C.; FUJII, L.; SU, C. Y.; VIANA, ANA S.; LINARES, E.; AUGUSTO, O.; MARIZ, INÊS FÁTIMA AFONSO; MACOAS, E.; BEDIN, V.; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . Fotoproteção em cabelos tingidos: nanoemulsão catiônica bioativa de ação eficaz. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. SÁ DIAS, T. C.; **DARIO, MICHELLI FERRERA**; ALMEIDA, A.; GAMA, R.M.; MATOS, J.; LIMA, C. C.; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . Caracterização do dano capilar por alisamento: metodologias in vitro físicas, químicas e de imagem. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. ESCUDEIRO, C. C.; SARRUF, FERNANDA DAUD; **DARIO, MICHELLI FERRERA**; BAZAN, M.; ESTEVAO, A.; BLOCH, L. D.; PINTO, C. A. S. O.; VELASCO, MARIA VALÉRIA R. . Dano proteico em fibra capilar submetida a diversos tratamentos químicos e físicos. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
4. **DARIO, M. F.**; SANTOS, M. S. C. S.; BOU-CHACRA, N. A.; PINTO, C. A. S. O.; PIEDADE, M. E. M.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Formulation optimization and stability evaluation of a bioactive cationic nanoemulsion containing quercetin. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
5. **DARIO, M. F.**; BELINI, N. C.; CORDEIRO, L. R. G.; PINTO, C.A.S.O.; BEDIN, V.; BOU-CHACRA, N. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Nanoemulsão capilar bioativa contendo quercetina: caracterização e avaliação de segurança por método alternativo in vitro. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
6. **DARIO, M. F.**; BOU-CHACRA, N. A.; BABY, A. R.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; BEDIN, V.; VELASCO, M. V. R. . Bioactive cationic nanoemulsion: development and characterization. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
7. SÁ DIAS, T. C.; LIMA, C. C.; MATOS, J.; GAMA, R. M.; **DARIO, M. F.**; FRANCA, S.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Evaluation of actives to straight the hair by thermal analysis. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
8. **DARIO, M. F.**. Estado da arte em fotoproteção dos cabelos. 2014. (Apresentação de Trabalho/Conferência ou palestra).
9. **DARIO, M. F.**; MORAES, B. M. A.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Nanoemulsões bioativas para aplicação cosmética. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

ANEXO C - Currículo Lattes

10. MORAES, B. M. A.; MATSUMARA, V.; SÁ DIAS, T. C.; **DARIO, M. F.**; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Perda proteica de cabelos tratados com alisantes químicos. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. **DARIO, M. F.**. Ressonância magnética nuclear (RMN) aplicada à quantificação simultânea de filtros solares em fotoprotetores. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
12. **DARIO, M. F.**; PAHL, R.; CASTRO, J. R.; LIMA, F. S.; KANEKO, T.M.; PINTO, C.A.S.O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Evaluation of photo-oxidative effectiveness of bioactive conditioner applied to hair fiber exposed to solar and artificial ultraviolet radiation. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
13. **DARIO, M. F.**; PAHL, R.; CASTRO, J. R.; LIMA, F. S.; VELASCO, M. V. R. . Effectiveness of Punica granatum L. extract in maintaining color of hair fibers exposed to UVA radiation. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
14. RUGNO, C. M.; **DARIO, M. F.**; VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. . Fotoprotetores bioativos anti-UVA: Desenvolvimento e avaliação da eficácia in vitro por espectrofotometria de reflectância com esfera de integração. 2012. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
15. **DARIO, M. F.**; KATO, E. T. M.; FREITAS, P. C. D.; BABY, A. R.; CONSIGLIERI, V. O.; VELASCO, M. V. R. . Influence of ethanol on antioxidant activity and tannin content of pomegranate extract. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
16. BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; **DARIO, M. F.**; RAI, K.S.S.; PRESTES, P.S.; GAMA, R.M.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Estudo comparativo da eficácia fotoprotetora in vitro das extratos glicólico e hidroalcoólico de romã (Punica granatum). 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
17. **DARIO, M. F.**; KATO, E.T.M.; FREITAS, P.C.D.; BABY, A. R.; KANEKO, T.M.; VELASCO, M. V. R. . Stability evaluation of hair leave-in conditioners incorporated with pomegranate (Punica granatum L.) tincture. 2011. (Apresentação de Trabalho/Outra).
18. **DARIO, M. F.**; KATO, E.T.M.; FREITAS, P.C.D. . Guaraná seeds (Paullinia cupana - Sapindaceae): Control tests of the tincture. 2010. (Apresentação de Trabalho/Seminário).
19. **DARIO, M. F.**; VELASCO, M. V. R. . Caracterização de fotoprotetores sob influência de flavonoide. 2009. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
20. **DARIO, M. F.**; BALOGH, T.S.; PEDRIALI, C.A.; PINTO, C.A.S.O.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R. . Characterization of sunscreens with or without a bioactive substance. 2009. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

Demais tipos de produção técnica

1. **DARIO, M. F.**. Fixadores capilares. 2013. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).
2. **DARIO, M. F.**. Metodologia de Avaliação de Perda Protéica da Fibra Capilar. 2012. (Curso de curta duração ministrado/Especialização).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 29º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Fotoproteção em cabelos tingidos: nanoemulsão catiônica bioativa de ação eficaz. 2016. (Congresso).
2. 29º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Caracterização do dano capilar por alisamento: metodologias in vitro físicas, químicas e de imagem: Dano proteico em fibra capilar submetida a diversos tratamentos químicos e físicos. 2016. (Congresso).
3. 28º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Estudo de estabilidade de emulsões fotoprotetoras contendo rutina como fotoestabilizador. 2015. (Congresso).
4. 5th International Colloids Conference 2015. Formulation optimization and stability evaluation of a bioactive cationic nanoemulsion containing quercetin. 2015. (Congresso).
5. FCE Cosmetique 2015. 2015. (Feira).
6. I Congresso de Graduação da USP. 2015. (Congresso).
7. 27º Congresso Brasileiro de Cosmetologia. Nanoemulsão capilar bioativa contendo quercetina: caracterização e avaliação de segurança por método alternativo in vitro. 2014. (Congresso).
8. 28th Congress of the International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (IFSCC) 2014. Bioactive cationic nanoemulsion: development and characterization. 2014. (Congresso).
9. Cuidados e Saúde do Cabelo - II Simpósio Luso-Brasileiro. Estado da arte em fotoproteção dos cabelos. 2014. (Simpósio).
10. 20 Congresso brasileiro de medicina estética, 9 Cong Inter para Estudos do envelhecimento, 5 Cong Inter Dermatologia, 5 Congresso Inter Tricologia. 2013. (Congresso).
11. XXI Jornadas de Jóvenes Investigadores del Grupo Montevideo. Nanoemulsões bioativas para aplicação cosmética. 2013. (Congresso).
12. 1o. Congresso da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Effectiveness of Punica granatum L. extract in maintaining color of hair fibers exposed to UVA radiation. 2012. (Congresso).

ANEXO C - Currículo Lattes

13. XX Jornadas de Jovens Pesquisadores da AUGM. Fotoprotetores bioativos anti-UVA: Desenvolvimento e avaliação da eficácia in vitro por espectrofotometria de reflectância com esfera de integração. 2012. (Simpósio).
14. Analytical tools for degradation-pathways elucidation and formulation development in pharmaceuticals; Raios UV e fotoproteção; Nanotecnologia em Cosmetologia. 2011. (Seminário).
15. Desenvolvimento de Perfumes. 2011. (Oficina).
16. XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica. Stability evaluation of hair leave-in conditioners incorporated with pomegranate tincture. 2011. (Outra).
17. Fotoproteção. 2010. (Seminário).
18. Semana de Cosmetologia. 2010. (Seminário).
19. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2010. (Seminário).
20. Sustainable Beauty Movement. 2010. (Seminário).
21. XV Semana Farmacêutica de Ciência e tecnologia. Guaraná seeds (Paulinia cupana - Sapindaceae): control tests of the tincture. 2010. (Simpósio).
22. 17 Simpósio Internacional de Iniciação Científica. Caracterização de fotoprotetores sob influência de flavonoide. 2009. (Simpósio).
23. 19 Expo Farmácia. 2009. (Outra).
24. Seminário de Atualização em Cosmetologia. 2009. (Seminário).
25. XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia FCF-USP. Characterization of sunscreens with or without a bioactive substance. 2009. (Simpósio).
26. 11 Campanha Nacional Gratuita em Diabetes, de Detecção, Orientação, Educação e Prevenção das Complicações. 2008. (Outra).

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. **DARIO, M. F.**. Escola de inverno: Pesquisa e inovação em fármacos e medicamentos/EPIFAR. 2015. (Outro).
2. **DARIO, M. F.**. VIII Campanha de Diabetes da FCF-USP. 2008. (Outro).

Orientações

Orientações e supervisões concluídas

Iniciação científica

1. Camila Forster. AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES MECÂNICAS E PENTEABILIDADE DE FIBRAS CAPILARES SUBMETIDAS À DESCOLORAÇÃO E TINTURA. 2015. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia-Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Orientador: Michelli Ferrera Dario.
2. Luciana Santos Fujii. EFICÁCIA DE NANOEMULSÃO BIOATIVA NA REDUÇÃO DA PERDA PROTEICA DE CABELOS EXPOSTOS À RADIAÇÃO UV. 2015. Iniciação Científica. (Graduando em Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Orientador: Michelli Ferrera Dario.

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO



9139 - 5155600/1 - Michelli Ferrera Dario

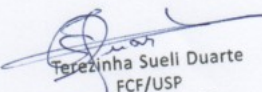
Email: michelli.dario@usp.br
Data de Nascimento: 30/10/1985
Cédula de Identidade: RG - 26.601.415-X - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica-Bioquímica - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2012

Curso: Doutorado Direto
Programa: Fármaco e Medicamentos
Área: Produção e Controle Farmacêuticos
Data de Matrícula: 17/07/2012
Início da Contagem de Prazo: 17/07/2012
Data Limite para o Depósito: 16/11/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria Valeria Robles Velasco - 17/07/2012 até o presente.
Email: mvrobles@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/07/2012
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 17/07/2016 até 14/11/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/09/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 04/04/2016

Impresso em: 18/05/2016 15:46:28


Terezinha Suelli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



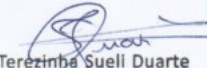
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO



9139 - 5155600/1 - Michelli Ferrera Dario

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/9	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	30/11/2012	120	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5777-2/7	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos I	16/08/2012	28/11/2012	45	3	86	A	N	Concluída
FBA5728-3/6	Aprimoramento Didático	16/10/2012	12/11/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBF5784-2/1	Eletroforese Capilar: Princípios e Aplicações na Área Farmacêutica	17/10/2012	18/12/2012	90	6	89	A	N	Concluída
6025830-3/1	Métodos "In Vitro" Alternativos para a Avaliação da Segurança de Cosméticos (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	06/11/2012	26/11/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBF5704-6/1	Análise Espectrométrica de Fármacos	04/03/2013	16/06/2013	150	10	90	A	N	Concluída
Atividade do Programa	Publicação do trabalho "Efficacy of Punica granatum L. hydroalcoholic extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation", no Journal of Photochemistry Photobiology B: Biology, v. 120, p. 142-147, Canada, 2013. (1)	05/03/2013	05/03/2013	-	2	-	-	-	-
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBF5780-2/1	Estratégias Farmacêuticas de Prevenção do Dano Cutâneo Induzido por Radiação Solar: Antioxidantes Naturais	03/06/2013	30/06/2013	60	0	-	-	N	Turma cancelada
FBF5751-7/2	Introdução aos Métodos Termoanalíticos	27/08/2013	04/11/2013	150	10	100	A	N	Concluída
FBF5794-2/4	Tópicos Gerais de Fármaco e Medicamentos II	11/09/2013	19/11/2013	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5811-1/1	Utilização de Sistemas Biológicos In Vitro, Ex Vivo e In Vivo na Avaliação de Eficácia e Segurança de Fármacos, Medicamentos e Cosméticos	17/02/2014	30/03/2014	30	2	100	A	N	Concluída
FBF5805-2/1	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	05/08/2015	13/10/2015	90	6	100	A	N	Concluída


Terezinha Suelli Duarte
Eef/USP
Nº USP 8830369

ANEXO D – Ficha do Aluno

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBF5779-2/3	Preparo de Artigos Científicos na Área de Farmácia	04/09/2015	05/11/2015	90	0	-	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	25	45
Estágios:			
Total:	0	25	45

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Créditos atribuídos de acordo com o disposto no Artigo 65 do Regimento de Pós-Graduação e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 15/04/2013.

Conceito a partir de 02/01/1997:

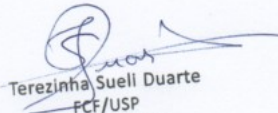
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

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

Última ocorrência: Prorrogação em 04/04/2016

Impresso em: 18/05/2016 15:46:29




Terezinha Sueli Duarte
FCF/USP
Nº USP 8830369



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

Stability and safety of quercetin-loaded cationic nanoemulsion: In vitro and in vivo assessments



Michelli F. Dario^{a,*}, Camila A. Oliveira^a, Lorena R.G. Cordeiro^b, Catarina Rosado^c,
Inês de Fátima A. Mariz^d, Ermelinda Maçôas^d, M. Soledade C.S. Santos^e,
Manuel E. Minas da Piedade^e, André R. Baby^a, M. Valéria R. Velasco^a

^a Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^b Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^c CBios – Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Lisboa, Portugal

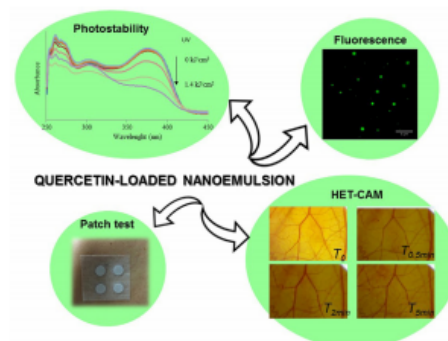
^d Centro de Química-Física Molecular and IN-Institute of Nanoscience and Nanotechnology, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

^e Centro de Química e Bioquímica e Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1649-016 Lisboa, Portugal

HIGHLIGHTS

- Quercetin-loaded nanoemulsion is highly stable and safe for cosmetic applications.
- Quercetin in the nanoemulsion presented high photostability to UV radiation.
- Quercetin, predominantly in the neutral form, is within the oily nanodroplets.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 April 2016

Received in revised form 27 June 2016

Accepted 6 July 2016

Available online 7 July 2016

Keywords:

Nanoemulsion

Photostability

Skin compatibility

HET-CAM

Antioxidant activity

Physicochemical stability

ABSTRACT

Quercetin is a flavonoid with high antioxidant activity, conceivably useful for pharmaceutical and cosmetic applications. Additionally, its molecular structure is potentially suited to stabilize emulsions. In this work the interaction of quercetin with cationic and nonionic surfactants in a mixed-surfactant bioactive nanoemulsion was investigated. The high-loaded quercetin nanoemulsion (prepared with 0.5% w/w and entrapment efficiency of 99.8%), prepared by the sub-PIT method, was assessed in terms of thermal/photostability and safety for cosmetic applications. It proved to be highly stable to chemical degradation under ambient or sub-ambient storage conditions and very photostable to UV artificial radiation. Results of UV absorption/emission spectroscopy, differential scanning calorimetry and confocal fluorescence microscopy studies showed that in the nanoemulsion: (i) quercetin appears, mainly in the form of a neutral non-emissive 5OH hydrogen bonded tautomer with a minor population of both the emissive 3OH hydrogen bonded tautomer and the mono-anionic form; (ii) quercetin is very stable under UV radiation, (iii) quercetin interacts with the surfactants and is predominantly located at the oil/water

* Corresponding author at: 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, BI-13/15, 05508-900, São Paulo, SP, Brazil.
E-mail address: michelli.dario@usp.br (M.F. Dario).



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfa

A high loaded cationic nanoemulsion for quercetin delivery obtained by sub-PIT method



Michelli F. Dario^{a,*}, M. Soledade C.S. Santos^b, Ana S. Viana^b, Elizabeth P.G. Arêas^c,
Nádia A. Bou-Chacra^a, M. Conceição Oliveira^d, Manuel E. Minas da Piedade^b,
André R. Baby^a, Maria Valéria R. Velasco^a

^a Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil

^b Centro de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, 1749-016 Lisboa, Portugal

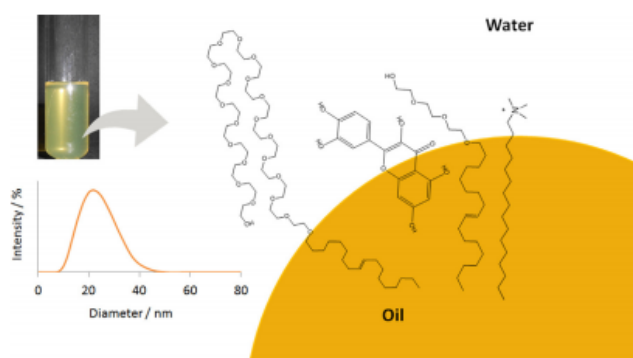
^c Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil

^d Centro de Química Estrutural, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, 1049-001 Lisboa, Portugal

HIGHLIGHTS

- Reduced droplet (~20 nm) bioactive cationic nanoemulsion by low energy process.
- High quercetin loaded (0.5% w/w) cationic nanoemulsion for cosmetic/pharmaceutical applications.
- Room and low temperature nanoemulsion stability.
- Adsorption of nanodroplets on surface with wettability similar to hair external surface.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2015

Received in revised form 7 October 2015

Accepted 20 October 2015

Available online 26 October 2015

Keywords:

Flavonoid

Low energy method

Morphology

ABSTRACT

The incorporation of low solubility natural substances into cosmetic formulations is an industrial trend posing new challenges and opportunities for fundamental research and cost effective product development. The sub-PIT method, an easily scaled-up low energy process, was used to yield a stable reduced droplet diameter (~20 nm) cationic nanoemulsion, containing a natural quercetin extract (95.5% w/w), appropriate for cosmetic application. The formulation presented optical transparency and high quercetin concentration (0.5% w/w). The preparation method was optimized in terms of mixture HLB and temperature. The best polydispersity index was achieved at 80 °C. Droplet diameter (DLS), zeta potential, rheological properties and nanodroplet morphology (cryo-TEM and AFM) were evaluated. This nanoemulsion contains spheric droplets with the lowest diameter ever described (to the best of our knowledge) for a cationic nanoemulsion prepared by the sub-PIT method.

Abbreviations: AFM, atomic force microscopy; Cryo-TEM, cryogenic transmission electron microscopy; CTAC, cetyltrimethylammonium chloride; DLS, dynamic light scattering; HLB, hydrophilic-lipophilic balance; HOPG, highly oriented pyrolytic graphite; LSW, Lifshitz, Slesov and Wagner; PDI, polydispersity index; PIC, phase inversion composition; PIT, phase inversion temperature; T_{cb}, clearing boundary temperature; τ , shear rate; $\dot{\gamma}$, shear rate; η , viscosity.

* Corresponding author at: 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, Bl-13/15, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil, Fax: +55 1138154418.

E-mail address: michelli.dario@usp.br (M.F. Dario).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.10.031>
0927-7757/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jpb

Short Review

Effects of solar radiation on hair and photoprotection



Michelli F. Dario *, André R. Baby, Maria Valéria R. Velasco

Department of Pharmacy, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, BI-13/15, 05508-000 São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2015

Received in revised form 15 September 2015

Accepted 21 September 2015

Available online 8 October 2015

Keywords:

Hair
Photodamage
UV radiation
Keratin
Melanin
Oxidation

ABSTRACT

In this paper the negative effects of solar radiation (ultraviolet, visible and infrared wavelengths) on hair properties like color, mechanical properties, luster, protein content, surface roughness, among others, will be discussed. Despite knowing that radiation damages hair, there are no consensus about the particular effect of each segment of solar radiation on the hair shaft. The hair photoprotection products are primarily targeted to dyed hair, speciality auburn pigments, and gray shades. They are usually based on silicones, antioxidants and quaternary chemical UV filters that have more affinity for negatively charged hair surface and present higher efficacy. Unfortunately, there are no regulated parameters, like for skin photoprotection, for efficacy evaluation of hair care products, which makes impossible to compare the results published in the literature. Thus, it is important that researchers make an effort to apply experimental conditions similar to a real level of sun exposure, like dose, irradiance, time, temperature and relative humidity.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Contents

1. Introduction	240
2. Hair Photodamage	242
3. Hair Photoprotection	243
3.1. Chemical Filters	243
3.2. Silicones	243
3.3. Antioxidants	243
4. Efficacy Evaluation of Hair Photoprotective Products	243
4.1. Color Measurement	244
5. Conclusions	244
Acknowledgments	245
References	245

1. Introduction

Hair fiber may be divided in three main layers: cuticles, cortex and medulla [1,2]. The medulla is the innermost portion of hair shaft. The cortex represents as much as 90% of the total weight of hair. This layer gives the hair strength, flexibility, elasticity and color (due to natural melanin and artificial pigments from hair dyes). The cortex is surrounded by a single layer of overlapping transparent, scalelike cells of cuticle (the outermost layer of hair fiber) [3,4].

The hair is composed mainly of proteinaceous material (specially keratin), lipids and other molecules like melanin that may be degraded

by exposure to sun radiation. The impact of solar radiation on the hair fibers are very discussed, but there is no consensus in the literature regarding the specific effects of different ranges of radiation (ultraviolet, visible and infrared) on the characteristics of hair fiber, like color, mechanical properties, luster, protein content, surface roughness and others. This difficulty is related to the lack of radiation exposure parameters harmonization such as dose, irradiance, temperature and relative humidity, as will be discussed in the text.

Solar radiation comprises the ultraviolet (UV) radiation (280–400 nm), visible (VIS) light (400–700 nm) and infrared (IR) (750–2800 nm). The UV radiation can be divided into three groups, according to the wavelength: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) and UVC (100–280 nm). The ozone layer blocks the entry of UVC, allowing the pass of 1–10% UVB and 90–99% UVA [5,6].

* Corresponding author.

E-mail address: michelli.dario@usp.br (M.F. Dario).



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jphotobiol

Efficacy of *Punica granatum* L. hydroalcoholic extract on properties of dyed hair exposed to UVA radiation

Michelli Ferrera Dario^a, Richard Pahl^b, Jordana Rodrigues de Castro^b, Fernando Soares de Lima^b, Telma Mary Kaneko^a, Claudinéia A.S.O. Pinto^a, André Rolim Baby^a, Maria Valéria Robles Velasco^{a,*}

^a School of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, BI-13/15, São Paulo, SP, Brazil

^b Technological Research Institute (IPT), 532 Prof. Almeida Prado Avenue, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 July 2012

Received in revised form 16 December 2012

Accepted 17 December 2012

Available online 5 January 2013

Keywords:

Punica granatum L.

Photo-oxidation

UVA radiation

Hair

Color fading

Mechanical properties

ABSTRACT

The solar radiation promotes color fading of natural and dyed hair by free radical generation, which oxidize the pigments, and it has been proposed the incorporation of antioxidants in order to reduce the alterations of hair color. Due to its high content of polyphenols and tannins, which are potent antioxidants, the hydroalcoholic extract of *Punica granatum* L. (pomegranate) was used in this research. Hair care formulations containing pomegranate extract were applied to red dyed hair tresses, and these were exposed to UVA radiation. Non-ionic silicone emulsion presenting color protection properties were also used for comparison purpose between the results obtained with different treatments, including silicone in combination with the pomegranate extract. The pomegranate extract at 5.0% and 10.0% w/w was effective in preventing the hair color fading in 37.6% and 60.8%, respectively, but the association of hydroalcoholic extract and non-ionic silicone emulsion is not encouraged. Mechanical properties were not affected by UVA radiation, since significant differences in breaking strength were not observed. Considering the conditions which the tresses have been exposed, it was concluded that the pomegranate extract at 10.0% w/w in hair care formulations are effective in reducing color fading of red dyed hair.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Human hair is composed mainly of keratin, a group of proteins which account for 65–95% of hair weight. The cuticle is the outer layer, its role is to protect the hair shaft against environmental and chemical damages. The keratinized scales present in this layer are responsible for brightness and tactile properties. Cortex is the layer located below the cuticle and confers resistance to the hair fiber due to its crystallized α -keratin fibrils organization. In this layer, the melanin (natural pigment) and the artificial hair dyes are located. The medulla, another component of hair fiber, may or may not be present, and its role is not clearly defined [1], although it is known that it shows air cavities in its constitution which can distribute the strength of the fiber in a less uniform way, without affecting its mechanical properties [2].

There are several factors that affect hair properties, like chemical and physical treatments such as bleaching, coloring or brush-

ing, or even prolonged exposition to sun radiation. Hair fibers exposed to sunlight may present physical and chemical changes. As physical changes, dryness, reduced strength, rough surface texture, color fading, decreased luster, stiffness, and brittleness can be mentioned. As chemical changes, shifts in hair proteins, lipids and pigments may occur [3].

Hair photodamage may be caused by UVA, UVB and visible radiations, and the effects of different wavelength ranges vary. The UVB and UVA radiations interact negatively with hair proteins, while the visible light promotes melanin granules degradation (photo-bleaching) [4]. According to Nogueira and Joekes [5], UVB radiation is the main responsible for hair protein loss and UVA promotes color changes. The UVB is largely absorbed by the cuticle, while UVA reaches through the cuticle layers and promotes oximelanin production, which is related to the bleaching of the natural hair. It also promotes the generation of oxyradicals, such as superoxide and hydroxyl, which oxidize hair dyes molecules and modifies its color characteristics [1]. Artificial hair color fades at a much faster rate. Therefore, the exposure time required to cause natural hair fibers photodamage is longer than the required to have the same effect on dyed fibers [6].

In order to reduce or delay the color change from the natural or dyed hair fibers, the use of silicones, UV filters (natural or synthetic) and antioxidant additives in cosmetic formulations have been

* Corresponding author. Address: Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, BI-13/15, Conjunto das Químicas, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 3091 3623; fax: +55 11 3815 4418.

E-mail address: mvrobes@usp.br (M.V.R. Velasco).

Influence of Brazilian vegetable oils on mechanical resistance of hair fiber

Influência de óleos vegetais brasileiros na resistência mecânica da fibra capilar

**Maria Valéria Velasco¹, Tatiana Santana Balogh¹, Erica Junko Waki Kagiyama¹, Michelli Ferrera Dario¹,
Robson Miranda Gama¹, Valcinir Bedin² and André Rolim Baby¹**

¹School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Department of Pharmacy, 580, Prof. Lineu Prestes Avenue,
BI - 13/15, São Paulo - SP, Brazil

²Hair and Skin Research and Treatment Institute, 69, São Domingos, São Paulo - SP, Brazil
Email: michelli.dario@usp.br

Abstract

Associating the global trend of incorporating active compounds and plants in cosmetic formulations and the vast Brazilian biodiversity, the present work aimed to study the incorporation of Brazilian vegetable oils in hair conditioner formulations, evaluating the mechanical resistance of hair fibers. The following oils were incorporated into base formulations at 5.0 % (w/w): babassu, buriti, andiroba and pequi. The formulations were applied to samples of Caucasian hair, followed by several washing steps, then the evaluation of mechanical strength. It was found that there was no statistically significant difference in mechanical resistance between samples treated with oils and the control between the first and seventh wash cycles. This fact can be explained by the possible low penetration of oils into the cortex, a region responsible for the mechanical properties of the hair fiber, since the grease composition disfavors its diffusion. The common effects of vegetable oils on the cuticle, such as filling in cracks or cavities, lubrication, and increased protein hydrophobicity cannot be excluded. The oils tested in this work were not able to raise or protect hair tresses. However, additional studies are required in order to establish the effects of oil treatments, particularly in damaged hair.

Keywords: hair, emulsion, vegetable oils, mechanical properties

Resumo

Associando a tendência global de incorporar ingredientes ativos derivados de plantas em formulações cosméticas e da enorme biodiversidade brasileira, o presente trabalho teve como objetivo estudar a incorporação de óleos vegetais brasileiros em condicionadores capilares, avaliando-se seu efeito na resistência mecânica da fibra do cabelo. Os seguintes óleos foram incorporados a uma formulação base a 5,0 % (p/p): babaçu, buriti, andiroba e pequi. As formulações foram aplicadas a mechas de cabelo Caucásiano, seguido de um procedimento de lavagem, sendo resistência mecânica posteriormente avaliada. Verificou-se que não havia nenhuma diferença estatisticamente significativa na resistência mecânica entre as mechas tratadas com os diferentes óleos e o controle entre o primeiro e o sétimo ciclos de lavagem. Este fato pode ser explicado pela baixa penetração dos óleos no córtex, uma região responsável pelas propriedades mecânicas da fibra capilar, uma vez que sua composição desfavorece a difusão. Os efeitos comuns de óleos vegetais na cutícula, como preencher fendas ou cavidades, lubrificação e aumentar a hidrofobicidade não pode ser excluída. Portanto, os óleos testados neste trabalho não foram capazes de aumentar ou proteger as mechas de cabelo nas condições experimentais utilizadas. No entanto, mais estudos são necessários para determinar seus efeitos, principalmente em cabelos danificados.

Palavras-chave: cabelo, emulsão, óleos vegetais, propriedades mecânicas

Received / Recebido: 12/02/2015

Accepted / Aceite: 27/02/2015

Electronic Edition: <http://www.biomedicalandbiopharmaceuticalresearch.com>

Cosmetics **2015**, 2, 110-126; doi:10.3390/cosmetics2020110

OPEN ACCESS

cosmetics

ISSN 2079-9284

www.mdpi.com/journal/cosmetics

Review

Types of Hair Dye and Their Mechanisms of Action

Simone Aparecida da França, Michelli Ferrera Dario *, Victoria Brigatto Esteves, André Rolim Baby and Maria Valéria Robles Velasco

School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 05508-000 São Paulo, Brazil;

E-Mails: simone1002af@uol.com.br (S.A.F.); victoria.brigatto@gmail.com (V.B.E.);

andrerb@usp.br (A.R.B.); mvrobles@usp.br (M.V.R.V.)

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: michelli.dario@usp.br;
Tel.: +55-11-3091-3623; Fax: +55-11-3815-4418.

Academic Editor: Enzo Berardesca

Received: 18 February 2015 / Accepted: 2 April 2015 / Published: 22 April 2015

Abstract: Hair color change by dye application is a common procedure among women. Hair dyes are classified, according to color resistance, into temporary, semipermanent, demipermanent and permanent. The first two are based on molecules which are already colored. Temporary dyes act through dye deposition on cuticles, but semipermanent may penetrate a little into the cortex and so the color resists up to six washes. Demipermanent and permanent dyes are based on color precursors, called oxidation dyes, and the final shade is developed by their interactions with an oxidizing agent, but they differ from the alkalizing agent used. In oxidation systems, there is an intense diffusion of the molecules into the cortex, what promotes a longer color resistance. Dyes and color precursors present differences related to chromophore groups, hair fiber affinity, water solubility, and photo stability. The aim of this review is to discuss the differences among hair dye products available in the market and their action mechanisms, molecular structures, application methods, and some aspects of formulations.

Keywords: hair; dye; temporary; semipermanent; permanent; action mechanism

Original Contribution

Journal of Cosmetic Dermatology, 14, 204–208

Protein loss in human hair from combination straightening and coloring treatments

Simone Aparecida França-Stefoni, MS,¹ Michelli Ferrera Dario, MS,¹ Tânia Cristina Sá-Dias, PhD,¹ Vakinir Bedin, PhD,² Adriano José de Almeida, MD,² André Rolim Baby, PhD,¹ & Maria Valéria R. Velasco, PhD¹

¹Faculty of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

²Healthy Skin Foundation and Hair and Skin Research and Treatment Institute, São Paulo, SP, Brazil

Summary

Background Hair chemical treatments, such as dyeing and straightening products, are known to cause damage that can be assessed by protein loss.

Objectives The aim of this study was to evaluate the hair protein loss caused by combined chemical treatments (dye and relaxer) using the validated bicinchoninic acid (BCA) method. Three kinds of straighteners, based on ammonium thioglycolate, guanidine hydroxide and sodium hydroxide, were evaluated and the least harmful combination indicated.

Methods Caucasian virgin dark brown hair tresses were treated with developed natural brown color oxidative hair dyeing and/or straightening commercial products based on ammonium thioglycolate, sodium hydroxide, or guanidine hydroxide. Protein loss quantification was assessed by the validated BCA method which has several advantages for quantifying protein loss in chemically treated hair.

Results When both treatments (straightening and dyeing) were combined, a higher negative effect was observed, particularly for dyed hair treated with sodium hydroxide. In this case, a 356% increase in protein loss relative to virgin hair was observed and 208% in relation to only dyed hair. The combination of dyeing and relaxers based on ammonium thioglycolate or guanidine hydroxide caused a small increase in protein loss, suggesting that these straightening products could be the best alternatives for individuals wishing to combine both treatments.

Conclusions These results indicated that when application of both types of products is desired, ammonium thioglycolate or guanidine hydroxide should be chosen for the straightening process.

Keywords: bicinchoninic acid, hair, protein loss, straightening, dyeing

Introduction

The reasons for women seeking hair chemical treatments, such as dyes and relaxers, include beauty, social

acceptability, convenience, and ease of management of the relaxed hair.¹ Hair coloring systems are divided into three categories according to the color durability time and coverage power after application onto hair strands: *temporary*, *semi-permanent*, and *permanent*.^{2,3}

Temporary dyes consist of acid water-soluble molecules of high molecular weight which do not penetrate the cuticle and are deposited onto the surface layers. These dyes remain on the hair for up to 1 week depend-

Correspondence: Michelli Ferrera Dario, Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, BI-13/15, Conjunto das Químicas, 05508-900 São Paulo, SP, Brazil. E-mail: michelli.dario@usp.br

Accepted for publication May 7, 2015



Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb

Safety and efficacy evaluation of gelatin-based nanoparticles associated with UV filters



Camila Areias de Oliveira^{a,*}, Michelli Ferrera Dario^a, Fernanda Daud Sarruf^b,
Inês Fátima Afonso Mariz^c, Maria Valéria Robles Velasco^a, Catarina Rosado^d,
André Rolim Baby^a

^a Laboratory of Cosmetology, Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b IPclin, Pesquisa Integrada, Clinical Research Company, São Paulo, SP, Brazil

^c Centro de Química-Física Molecular (CQFM) and Institute of Nanoscience and Nanotechnology (IN), Instituto Superior Técnico, University of Lisbon, Av. Rovisco Pais, 1, 1049-001 Lisboa, Portugal

^d CBIOS, Research Center for Biosciences and Health Technologies, Universidade Lusófona, Lisbon, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2015

Received in revised form 2 October 2015

Accepted 13 November 2015

Available online 18 November 2015

Keywords:

Gelatin nanoparticles

Sunscreens

Ethylhexyl dimethyl PABA

Ethylhexyl methoxycinnamate

Methoxydibenzoylmethane

ABSTRACT

The safety and efficacy assessment of nanomaterials is a major concern of industry and academia. These materials, due to their nanoscale size, can have chemical, physical, and biological properties that differ from those of their larger counterparts. The encapsulation of natural ingredients can provide marked improvements in sun protection efficacy. This strategy promotes solubility enhancement of flavonoids and yields an improved active ingredient with innovative physical, physicochemical and functional characteristics. Rutin, a flavonoid, has chemical and functional stability in topical vehicles exerting a synergistic effect in association with ultraviolet (UV) filters. However, the solubility of rutin is a limiting factor. Additionally, this bioactive compound does not have tendency to permeate across the *stratum corneum*. As an alternative to common synthetic based sunscreens, rutin-entrapped gelatin nanoparticles were designed. The present study investigated the pre-clinical safety of gelatin nanoparticles (GNPs) using an *in vitro* method and also assessed the clinical safety and efficacy of the association of GNPs with three commonly used chemical UV filters (ethylhexyl dimethyl PABA, ethylhexyl methoxycinnamate and methoxydibenzoylmethane). The non-irritant and adequate safety profile under sun-exposed skin conditions of the nanomaterials and the emulsions qualified the products for clinical efficacy assays. The *in vivo* results indicated that the GNPs increased the antioxidant protection of the emulsions developed. However, the presence of rutin in the nanosized material did not enhance performance on the SPF test. In conclusion, these findings characterized the nanomaterials as an innovative platform for multifunctional bioactive sunscreens.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanotechnology is a widely-used approach in the cosmetic industry. In Brazil, for example, 94% of nanotechnology-based products on the market are cosmetics [1]. A large number of particles, ranging from lipid nanostructures such as liposomes and solid lipid nanoparticles to metal, nanocrystals and polymer particles, have already been researched and applied in cosmetic products [2–6]. Moreover, topically applied nanoparticles can permeate across the

stratum corneum and interfere with biological processes. The safety assessment of nanomaterials is a major concern of industry and scientists in the field, because of their unique properties offering potential advantages in products for potential development [7].

Regarding sunscreens, the use of nanoparticles for metal oxides, such as TiO₂ and ZnO, is well established. Nanosized TiO₂ and ZnO are essential for achieving adequate sun protection without the whitening effect on the skin [8]. For chemical UV filters, different strategies are used to design nanoparticles. Nanoencapsulation of organic filters is performed to prevent photodegradation and skin accumulation, reducing side effects. The design of solid lipid nanoparticles (SLNs) of benzophenone-3 has provided sustained release. Thus, the chemical filter stays longer where it is intended, on the surface of the skin. Also, the use of polymeric and

* Corresponding author at: Laboratory of Cosmetology, Department of Pharmacy, School of Pharmaceutical Sciences of University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Av Bl. 15, 05508–900, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3815 4418.

E-mail address: milaareias@hotmail.com (C.A.d. Oliveira).

Stability evaluation of organic Lip Balm

Alessandra Ribeiro Fernandes, Michelli Ferrera Dario, Claudinéia Aparecida Sales de Oliveira Pinto, Telma Mary Kaneko, André Rolim Baby, Maria Valéria Robles Velasco*

Department of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo

Rising global demand for natural products whose production is harmless to the environment has stimulated the development of natural cosmetics and, within this category, organics (95% organic raw materials). The image of environmentally friendly production is one of the strongest attractions of organic products. Lip balm is a cosmetic product similar to lipstick whose purpose is to prevent lip dryness and protect against adverse environmental factors. The product's characteristics are: resistance to temperature variations, pleasant flavor, innocuousness, smoothness during application, adherence and easy intentional removal. This work involved the development of a lip balm formulated with certified organic raw materials and the execution of stability tests: fusion point determination, evaluation of organoleptic characteristics (color, odor and appearance) and functionality evaluation (spreadability test). The formulation selected after the Preliminary Stability Test was submitted to the Normal Stability Test under the following storage conditions (temperature): Room Temperature (22.0 ± 3.0 °C), Oven (40.0 ± 2.0 °C) and Refrigerator (5.0 ± 1.0 °C), for 90 days. Under the Refrigerator and Room Temperature conditions, spreadability proved adequate, but the surface presented white spots, characterizing the fat bloom, a phenomenon involving the recrystallization of cocoa butter. Storage at 40.0 ± 2.0 °C (Oven) caused loss of functionality according to the spreadability test, in addition to changes in color, although the aspect was uniform since the fat bloom was not observed (white spots on the surface). The odor remained stable under all conditions as did the melting point, which had a mean of 72.9 ± 1.7 °C throughout the course of stability testing (90 days).

Uniterms: Lip balm. Stability. Cocoa butter. Cosmetic. Organic.

O aumento da demanda global por produtos naturais, cuja produção não envolva nenhum dano ao meio ambiente, tem estimulado o desenvolvimento de cosméticos naturais e, dentro desta categoria, dos produtos orgânicos (que contêm 95% de matérias-primas orgânicas). O protetor labial é um produto cosmético semelhante ao batom que tem a finalidade de prevenir o ressecamento dos lábios, mantendo a hidratação, e protegê-los contra fatores ambientais adversos. Este trabalho envolveu o desenvolvimento de um protetor labial formulado com matérias-primas orgânicas e avaliação dos parâmetros de estabilidade, como ponto de fusão, características organolépticas e funcionalidade (teste de espalhabilidade). A formulação selecionada após o Estudo de Estabilidade Preliminar foi submetida à Avaliação Normal de Estabilidade, nas seguintes condições de armazenamento (temperatura): Ambiente ($22,0 \pm 3,0$ °C), Estufa ($40,0 \pm 2,0$ °C) e Geladeira ($5,0 \pm 1,0$ °C), por 90 dias. Nas condições de armazenamento em geladeira ou ambiente, a espalhabilidade foi adequada, mas a superfície apresentou pontos esbranquiçados, caracterizando o fenômeno chamado *fat bloom*, que está relacionado à recristalização da manteiga de cacau. O armazenamento à temperatura elevada ($40,0 \pm 2,0$ °C) provocou perda de funcionalidade, de acordo com o teste de espalhabilidade, e mudança de cor, apesar do aspecto permanecer uniforme, visto que não foi observado o fenômeno *fat bloom*. O odor manteve-se estável em todas as condições, assim como o ponto de fusão, com valor médio de $72,9 \pm 1,7$ °C durante todo o período de avaliação do teste de estabilidade (90 dias).

Unitermos: Protetor labial. Estabilidade. Manteiga de cacau. Cosmético. Orgânico.

*Correspondence: M.V.R. Velasco. Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, n.580, B1-13/15, 05508-000 - São Paulo - SP, Brasil. E-mail: mvrobles@usp.br



Short-term clinical of peel-off facial mask moisturizers

M. V. R. Velasco, R. P. Vieira, A. R. Fernandes, M. F. Dario, C. A. S. O. Pinto, C. A. Pedriali, T. M. Kaneko and A. R. Baby
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, B1-13/15, São Paulo, SP, Brazil

Received 13 February 2014, Accepted 29 March 2014

Keywords: clinical study, emulsions, moisturization, peel-off facial mask, polymers, skin barrier

Synopsis

OBJECTIVE: This study aimed to compare the efficacy of a peel-off facial mask based on polyvinyl alcohol (PVA) with an oil-in-water (o/w) emulsion and the effect of a soybean extract fermented by *Bifidobacterium animale* incorporated in those formulations (5% w/w).

METHODS: The formulations were submitted to randomized clinical studies in volunteers to evaluate the measurement effects as (a) tensor by Cutometer[®], (b) moisturizing by Corneometer[®] and transepidermal water loss (TEWL) by Tewameter[®]. These effects were determined in a short-term study (3 h) in a controlled-temperature room.

RESULTS: The tensor effect and TEWL values indicated no significant difference between the use of facial mask and emulsion. On the other hand, the moisturizing effect of the facial mask on the *stratum corneum* was more significant than that of the emulsion according to Corneometer[®] measurements. Biometric cutaneous evaluation of peel-off facial masks (short-term study) showed that the masks promoted moisturizing effect of the *stratum corneum* more effectively than the oil-in-water emulsions. Thus, the facial masks were more efficient than emulsions in relation to moisturizing effects, but this efficiency is not related to the presence of fermented soybean extract.

CONCLUSION: The results indicated that peel-off facial masks increase skin hydration in a process related to the occlusive effect.

Résumé

OBJECTIF: Cette étude avait pour but de comparer l'efficacité d'un masque facial détachable à base d'alcool polyvinylique (PVA) avec une émulsion huile-dans-eau (H/E) et d'observer l'effet d'un extrait de soja fermenté par *Bifidobacterium animale* incorporé dans ces formulations (5% p/p).

METHODES: Les formulations ont été soumises à des études cliniques randomisées chez des volontaires pour évaluer les effets tels que : (a) tenseur par Cutometer[®], (b) l'hydratation par Corneometer[®] et la perte insensible en eau (PIE) par Tewameter[®]. Ces effets ont été déterminés dans une étude à court terme (trois heures) dans une chambre à température contrôlée.

RESULTATS: L'effet tenseur et les valeurs de PIE n'ont révélé aucune différence significative entre l'utilisation d'un masque facial ou de l'émulsion. D'autre part, l'effet hydratant du masque facial sur le *stratum corneum* était plus important que celui de l'émulsion.

Correspondence: Michelli Ferrera Dario, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 580 Prof. Lineu Prestes Avenue, B1-13/15, São Paulo, SP, Brazil. Tel.: +55 11 30913623; fax: +55 11 38154418; e-mail: michelldario@usp.br

selon les mesures au Corneometer[®]. L'évaluation cutanée biométrique de masques de visage détachables (étude à court terme) a montré que les masques augmentent l'effet hydratant de la couche cornée de façon plus efficace que les émulsions huile-dans-eau. Ainsi, les masques faciaux étaient plus efficaces que les émulsions en ce qui concerne les effets hydratants mais cette efficacité n'est pas liée à la présence d'extrait de soja fermenté. Les résultats indiquent que les masques faciaux détachables augmentent l'hydratation de la peau dans un processus lié à l'effet occlusif.

Introduction

Facial masks have been used as cosmetic formulations since antiquity [1]. Currently, these types of formulations may be used to achieve various effects, such as moisturizing and tensor actions [2–4]. Peel-off facial masks may be formulated using polyvinyl alcohol (PVA) or polyvinyl acetate, which, after application and drying, form an occlusive film over the face [1, 5]. Many authors attribute to peel-off facial masks the ability to produce occlusion and tensor effects after drying. Active substances added to the formulation may intensify these effects [6–8]. These formulations often contain plasticizers, moisturizers, preservatives, surfactants, fragrances and active substances [8].

Soybean extracts, obtained from fermented extract by *Bifidobacterium animale*, are sometimes added to topical formulations [9, 10]. The fermented milk contains sugars, amino acids, peptides, proteins and high levels of free isoflavones when compared to non-fermented milk [10]. Higher concentration of free isoflavones is attributed to microbial β -glucosidase, an enzyme that hydrolyses the isoflavone glycosides, including genistein and daidzein [11–13]. The cosmetic industry attributes moisturizing properties to formulations associated with this extract, according to its chemical composition [14].

This study was aimed at comparing the moisturizing, tensor and transepidermal water loss effects of the peel-off facial mask, after its application and removal of the skin, with an oil-in-water (o/w) emulsion [15]. Both formulations were made with and without soybean extract fermented by *Bifidobacterium animale* (5% w/w), obtaining four formulations.

Materials and methods

Formulations

Four formulations were developed: peel-off facial masks prepared with fermented soybean extract (MS) and without soybean extract (M); and oil-in-water emulsions with fermented soybean extract