MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

# Desenvolvimento de nanossistemas para a promoção da penetração cutânea da cafeína

Marta Lopes Gomes

[up202008959]



**M**.FFUP **2022**

Marta Lopes Gomes

# Desenvolvimento de nanossistemas para a promoção da penetração cutânea da cafeína

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob orientação da

Profª. Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues Amaral

Setembro 2022

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

## Agradecimentos

Os meus sinceros agradecimentos a todos que participaram ao longo desta caminhada de dois anos, que de muitas formas contribuíram para a realização desta dissertação e me proporcionaram uma experiência enriquecedora, tanto a nível académico como a nível pessoal. Com o apoio dos que nos rodeiam tudo se torna mais fácil, não podendo, por isso, deixar de agradecer com muito carinho a todos os que tornaram isto possível.

À Professora Doutora Maria Helena Amaral, minha professora e orientadora, manifesto a minha sincera gratidão pela infindável disponibilidade, paciência e dedicação, pelo infinito apoio e carinho que sempre demonstrou e também pela preciosa orientação na elaboração deste trabalho.

Ao professor Doutor Paulo Costa, agradeço a simpatia e a disponibilidade para resolver os problemas que foram surgindo ao realizar os ensaios e para esclarecer dúvidas na elaboração deste trabalho.

Aos restantes Professores do Mestrado em Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, agradeço por me proporcionarem uma excelente formação e me ajudarem a desenvolver as minhas competências ao longo deste ciclo de estudos.

Aos colegas de Mestrado, em especial à Filipa Silva, que comigo partilhou este percurso, agradeço todo o apoio, toda a ajuda e todos os momentos de convívio proporcionados.

Aos elementos do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, mais especificamente ao Joel, agradeço toda a ajuda e disponibilidade prestadas no decorrer do trabalho no laboratório.

Aos meus amigos, em especial à Inês Mota, agradeço todo o apoio e a confiança que me deu sempre que precisei e pela ajuda prestada na adaptação de imagens.

Aos meus pais, manifesto a minha sincera gratidão pelo encorajamento, dedicação, carinho, paciência e pelo apoio prestado ao longo do meu percurso académico.

Ao meu namorado, Marcos Sousa, pelo apoio, carinho, afeto, compreensão, paciência e pela ajuda nos problemas informáticos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, tornaram possível a execução deste projeto, o meu profundo reconhecimento e um bem-haja!

## Resumo

A celulite ou hidrolipodistrofia ginóide é uma disfunção cutânea que se manifesta sob a forma de irregularidades da superfície da pele e que afeta 80%-90% das mulheres pós-púberes de todas as raças e os homens numa menor percentagem. A utilização de agentes tópicos é uma das várias opções disponíveis para tratar esta condição, sendo a cafeína uma molécula muito utilizada neste tipo de produtos cosméticos, uma vez que tem a capacidade de evitar a acumulação excessiva de gorduras nas células. O principal obstáculo à penetração cutânea de ingredientes ativos é o estrato córneo e, por isso, pode recorrer-se ao uso de diferentes tipos de promotores de penetração cutânea como, por exemplo, nanossistemas que permitem promover uma permeação mais eficaz desses ingredientes ativos. As microemulsões e as nanodispersões são exemplos de nanossistemas que podem ser utilizados como promotores de penetração cutânea.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver nanossistemas destinados à promoção da penetração cutânea da cafeína. Para isso, foram preparadas microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A com e sem cafeína que foram caracterizadas quanto ao tamanho das gotículas da fase oleosa, pH, estabilidade acelerada por centrifugação e libertação *in vitro* da cafeína. Posteriormente, estas microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A foram gelificadas e caracterizadas quanto ao pH, estabilidade acelerada por centrifugação, comportamento reológico, textura, teor de cafeína e libertação *in vitro* da cafeína.

Os resultados deste trabalho permitiram concluir que, de uma forma geral, ambas as formulações desenvolvidas demonstraram ser estáveis, com pH compatível com a pele, bem como comportamento reológico e textura adequadas. Apesar de a nanodispersão S/O/A gelificada ter apresentado maior estabilidade química, a microemulsão A/O/A apresentou uma libertação mais rápida da cafeína. No entanto, ambas apresentaram potencial para poderem vir a ser utilizados em formulações para a redução da celulite.



**Palavras-chave:** Microemulsões, nanodispersões, cafeína, celulite, aplicação cutânea

## Abstract

Cellulite or gynoid hydrolipodystrophy is a skin disorder that manifests itself in the form of irregularities on the surface of the skin and affects 80%-90% of postpubertal female patients of all races and men in a lower percentage. The use of topical agents is one of several options available to treat this condition, being caffeine a molecule widely used in this type of cosmetic products, since it has the ability to prevent excessive accumulation of fats in cells. The main problem with the skin penetration of active ingredients is the stratum corneum, therefore, different types of penetration enhancers can be used, including nanosystems, which allow for a more effective permeation of these active ingredients. Microemulsions and nanodispersions are examples of nanosystems that can be used as skin penetration enhancers.

The objective of this work was to develop nanosystems intended to be used as skin permeation enhancers of caffeine. Thus, W/O/W microemulsions and S/O/W nanodispersions with and without caffeine were developed, being characterized in terms of droplet size, pH, stability accelerated by centrifugation and *in vitro* release of caffeine. Subsequently, W/O/W microemulsions and S/O/W nanodispersions were gelled and characterized regarding pH, stability accelerated by centrifugation, rheological behavior, texture, caffeine content, and *in vitro* caffeine release.

The results of this work allowed to conclude that, in general, both formulations developed proved to be stable, with pH compatible with the skin, and suitable rheological behavior and texture. Although the gelled S/O/W nanodispersion showed greater chemical stability, the W/O/W microemulsion showed a faster caffeine release. However, both showed potential to be used in cellulite reduction formulations.

**Keywords :** Microemulsions, nanodispersions, caffeine, cellulite, skin application

# Índice

**1.Introdução ..... 1**

1.1. Pele humana ..... 1

1.2. Permeação cutânea ..... 5

1.3. Promotores de Penetração Cutânea ..... 7

1.3.1. Nanossistemas ..... 8

1.3.1.1. Microemulsões ..... 9

1.3.1.2.Nanodispersão S/O ..... 12

1.4. Celulite ..... 13

1.5. Cafeína ..... 15

1.6. Objetivos do trabalho ..... 17

**2. Parte Experimental ..... 18**

2.1. Matérias-primas e equipamento ..... 18

2.1.1. Matérias-primas ..... 18

2.1.2. Equipamento ..... 19

2.2. Métodos ..... 20

2.2.1. Preparação da microemulsão A/O/A ..... 20

2.2.2. Preparação da nanodispersão S/O/A ..... 22

2.2.3. Caracterização das formulações ..... 26

2.2.3.1. Tamanho das gotículas ..... 26

2.2.3.2. Determinação do pH ..... 28

2.2.3.3. Estabilidade acelerada por centrifugação ..... 29

2.2.3.4. Libertação in vitro de cafeína a partir da microemulsão e da nanodispersão ..... 31

2.2.4. Gelificação das formulações ..... 32

2.2.5. Caracterização das formulações gelificadas ..... 32

2.2.5.1. Determinação do pH ..... 32

2.2.5.2. Avaliação da viscosidade ..... 33

2.2.5.3. Avaliação da textura ..... 36

2.2.5.4. Estabilidade acelerada por centrifugação ..... 38

2.2.5.5. Teor de cafeína ..... 39

2.2.5.6. Libertação in vitro da cafeína a partir da microemulsão e nanodispersão gelificadas ..... 40

2.2.6. Análise estatística ..... 41

**3.Resultados e discussão ..... 42**

3.1. Caracterização das formulações ..... 42

3.1.1. Tamanho das gotículas ..... 42

3.1.2. Determinação do pH ..... 44

3.1.3. Estabilidade acelerada por centrifugação ..... 45

3.1.4. Libertação *in vitro* da cafeína a partir da microemulsão e da nanodispersão ..... 46

3.2. Caracterização das formulações gelificadas ..... 48

3.2.1. Determinação do pH ..... 48

3.2.2. Avaliação da viscosidade ..... 49

3.2.3. Avaliação da textura ..... 54

3.2.4. Estabilidade acelerada por centrifugação ..... 60

3.2.5. Teor de cafeína ..... 61

3.2.6. Libertação in vitro de cafeína a partir da microemulsão gelificada e da nanodispersão gelificada ..... 62

**4.Conclusões ..... 65**

**5.Referências Bibliográficas ..... 68**

**Índice de Figuras**

**Figura 1**: As três camadas da pele. Adaptado de (5). ..... 1
**Figura 2:** Representação esquemática das diversas camadas da epiderme. Adaptado de (7). ..... 3
**Figura 3:** Vias de permeação de fármacos/ingredientes ativos através da pele: via transepidérmica e via anexial. Adaptado de (6). ..... 5
**Figura 4:** Classificação das microemulsões quanto às fases dispersas e dispersantes. Adaptado de (20). ..... 10
**Figura 5:** Molécula de cafeína. Adaptado de (36). ..... 15
**Figura 6:** Esquema da preparação da microemulsão simples A/O. ..... 21
**Figura 7:** Esquema da preparação da microemulsão A/O/A. ..... 22
**Figura 8:** Esquema da formação do complexo Cafeína-Éster de sacarose. ..... 24
**Figura 9:** Esquema da dispersão do complexo cafeína-éster da sacarose em miristato de isopropilo. ..... 25
**Figura 10:** Esquema da dispersão do éster da sacarose em miristato de isopropilo. .. 25
**Figura 11:** Mastersizer 3000, Malvern (Reino Unido). ..... 26
**Figura 12:** Dispersão da luz em função do tamanho das gotículas. Adaptado de (41). ..... 27
**Figura 13:** Potenciómetro Basic 20, Crison Instruments (Espanha). ..... 29
**Figura 14:** Centrífuga, Eppendorf AG 5804 (Alemanha). ..... 30
**Figura 15:** Aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça) com pá agitadora. ..... 32
**Figura 16:** Representação gráfica de tensão de corte *vs* velocidade de corte de diferentes tipos de comportamentos reológicos. Adaptado de (44). ..... 34
**Figura 17:** Viscosímetro Thermo Haake Viscotester VT-550 (Alemanha). ..... 36
**Figura 18:** Texturómetro TA-XT2i, Stable Micro Systems (Reino Unido) ..... 38
**Figura 19:** Espectrofotómetro UV/Vis, Jasco V650 (Japão). ..... 39
**Figura 20**:Aspeto das microemulsões A/O/A com (ME) e sem (ME_B) cafeína, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. ..... 45
**Figura 21:** Aspeto das nanodispersões S/O/A com (ND) e sem (ND_B) cafeína, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. ..... 45
**Figura 22:** Gráfico da reta de calibração da cafeína em solução tampão de fosfatos pH 7,4. ..... 46
**Figura 23:** Perfil de libertação da cafeína em formulações não gelificadas ..... 47
**Figura 24:** Valores de pH da ME_B, ME, ND_B e ND ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente. ..... 48

**Figura 25:** Reogramas a 20°C: A- microemulsão A/O/A gelificada sem cafeína (ME_B) e B- microemulsão A/O/A gelificada com cafeína (ME), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 50
**Figura 26:** Reogramas a 20°C: A- nanodispersão S/O/A gelificada sem cafeína (ND_B) e B- nanodispersão S/O/A gelificada com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 51
**Figura 27:** Reogramas a 32°C: A- microemulsão A/O/A gelificada sem cafeína (ME_B) e B- microemulsão A/O/A gelificada com cafeína (ME), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento..... 52
**Figura 28**: Reogramas a 32°C: A- nanodispersão S/O/A gelificada sem cafeína (ND_B) e B- nanodispersão S/O/A gelificada com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 53
**Figura 29:** Resultados da firmeza a 20°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 54
**Figura 30**: Resultados da firmeza a 32°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 55
**Figura 31:** Resultados da adesividade a 20°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 57
**Figura 32:** Resultados da adesividade a 32°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento. ..... 58
**Figura 33**:Aspeto das microemulsões A/O/A gelificadas, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. ..... 60
**Figura 34**:Aspeto das nanodispersões S/O/A gelificadas, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação. ..... 60
**Figura 35:** Curva de calibração dos padrões de cafeína em solução de NaCl 1%. ..... 61
**Figura 36:** Perfis de libertação da cafeína a partir das formulações gelificadas. ..... 63
**Figura 37**: Comparação dos perfis de libertação da cafeína em formulações não gelificadas com as formulações gelificadas. ..... 64

# Índice de Tabelas

**Tabela 1:** Alguns exemplos de promotores/sistemas de penetração cutânea químicos e físicos. Adaptado de (9). ..... 7

**Tabela 2:** Classificação dos ingredientes ativos de acordo com o seu local de ação (27)..... 14

**Tabela 3:** Lista de matérias-primas utilizadas neste trabalho..... 18

**Tabela 4:** Lista de equipamento utilizado neste trabalho. ..... 19

**Tabela 5:** Composição da microemulsão A/O/A contendo cafeína. ..... 20

**Tabela 6:** Composição da nanodispersão S/O/A contendo cafeína. ..... 23

**Tabela 7:** Parâmetros utilizados no Mastersizer 3000. ..... 28

**Tabela 8:** Tamanho das gotículas da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A (apresentados sob a forma de percentis médios e dos respetivos coeficientes de variação) e valor de Span. ..... 42

**Tabela 9:** Valores médios de pH e respetivos desvios padrão das várias formulações. ..... 44

## Lista de abreviaturas e símbolos

A/O - Água/Óleo

A/O/A - Água/Óleo/Água

APC – Células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells*)

EGFP – Proteína verde fluorescente melhorada (*Enhanced Green Fluorescent Protein*)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

HRP – Peroxidase de rábano (*Horseradish peroxidase)*

ME - Microemulsão A/O/A com cafeína

ME_B - Microemulsão A/O/A sem cafeína

MI - Miristato de Isopropilo

NaCl – Cloreto de sódio

ND - Nanodispersão S/O/A com cafeína

ND_B - Nanodispersão S/O/A sem cafeína

O/A - Óleo/Água

pH - Potencial Hidrogeniónico

q.b.p - Quanto baste para

rpm – Rotações por minuto

S/O - Sólido/Óleo

S/O/A - Sólido/Óleo/Água

UV – Ultravioleta

Vis - Visível

# 1.Introdução

## 1.1. Pele humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, com uma área compreendida entre 1,5 e 2,0 $m^2$, correspondendo a mais de 10% da massa corporal (1, 2). Este órgão cobre toda a superfície externa do corpo, desempenhando diversas funções vitais, tais como (3):

- **Proteção:** A pele serve de barreira contra agentes patogénicos, radiação UV, agentes químicos e lesões mecânicas.
- **Termorregulação:** O pelo e as glândulas sudoríparas ajudam na regulação da temperatura corporal e a manter a homeostasia.
- **Sensação:** A pele apresenta diversos tipos de recetores da dor, da temperatura, da pressão e do toque.
- **Metabolismo:** O tecido adiposo que se encontra na hipoderme é responsável pela produção de vitamina D e pelo armazenamento de lípidos. A pele também é responsável pela excreção de água, ureia, amónia e ácido úrico.

A pele apresenta diferentes espessuras consoante a região do corpo. Por exemplo, a pele das palmas das mãos e das plantas dos pés é mais grossa (cerca de 4 mm de espessura), enquanto a pele das pálpebras e da região retroauricular é mais fina (cerca de 0,05 mm de espessura) (4).

Este órgão está organizado em 3 camadas: a epiderme (camada mais superficial), a derme (camada intermédia) e a hipoderme (camada mais profunda), como se pode ver na Figura 1.

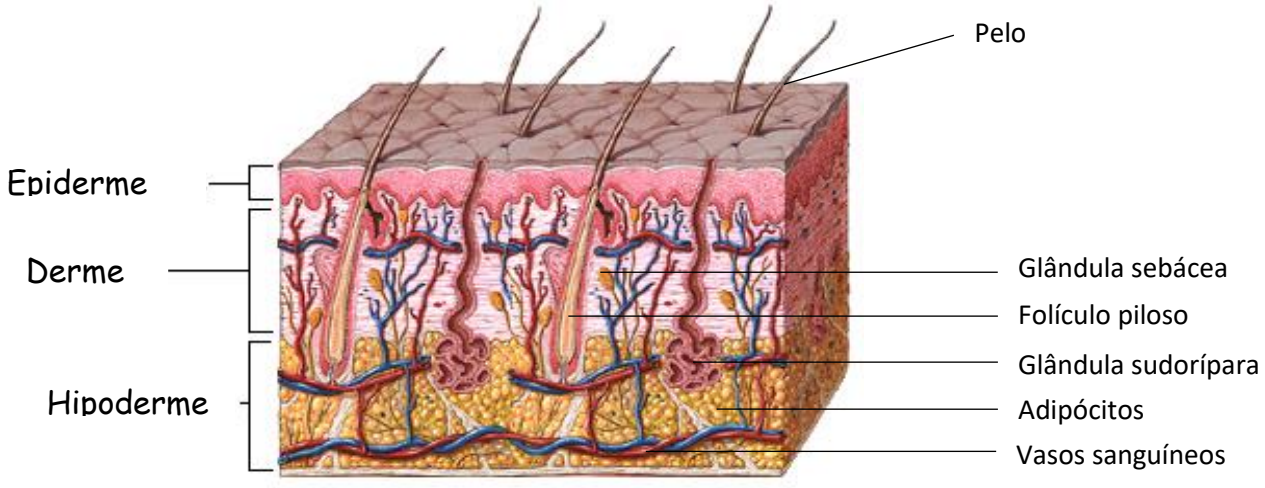



**Figura 1**: As três camadas da pele. Adaptado de (5).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, sendo composta por um epitélio queratinizado estratificado que contém cinco camadas: estrato córneo, estrato lúcido, estrato granuloso, estrato espinhoso e estrato basal (4, 6) (Figura 2).

- **Estrato córneo**: Corresponde à camada mais externa da epiderme. Esta camada queratinizada permite regular a perda de água, uma vez que a queratinização e o conteúdo lipídico evitam a evaporação dos fluidos internos.
- **Estrato lúcido**: Esta camada consiste principalmente em células mortas e só existe na pele grossa das plantas dos pés e das palmas das mãos.
- **Estrato granuloso:** Esta camada é constituída por várias camadas de células que contêm grânulos ricos em lípidos (camada de células granulares). Neste estrato, à medida que as células se afastam das camadas profundas ricas em nutrientes, começam a perder os seus núcleos.
- **Estrato espinhoso** (camada de células espinhosas): Nesta camada pode-se observar diversas camadas de células conectadas por desmossomas e a presença de células de Langerhans. Estas células podem ser encontradas em todas as camadas da pele, contudo, a sua presença predomina neste estrato.
- **Estrato basal** (camada de células basais): Esta camada está mais próxima da derme e é caracterizada por ser mitoticamente ativa. O estrato basal contém melanócitos, células de Merkel, células estaminais, que são células com alto poder de proliferação e diferenciação, e uma única fileira de queratinócitos que evoluem e amadurecem à medida que se movem para cima para criar as restantes camadas.

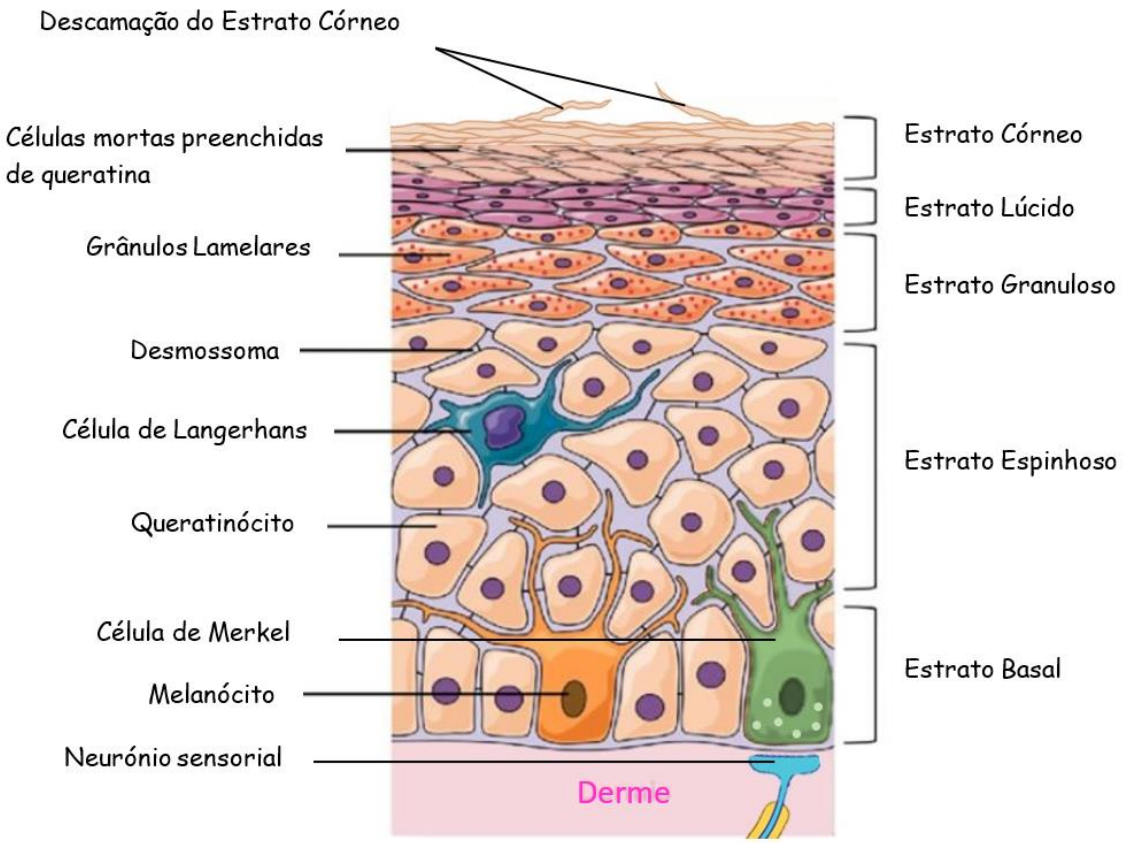



**Figura 2:** Representação esquemática das diversas camadas da epiderme. Adaptado de (7).

A epiderme é caracterizada por ser um tecido que se auto-renova, uma vez que o crescimento das células das camadas inferiores da epiderme é equilibrado com a descamação do estrato córneo. Na camada basal, os queratinócitos multiplicam-se e, ao sair desta camada, começam a diferenciar-se e a migrar para a superfície da pele. A transformação dos queratinócitos viáveis em corneócitos (células mortas, achatadas, anucleadas, preenchidas com água e filamentos de queratina) ocorre na interface do estrato córneo-estrato granuloso (3, 8). Os queratinócitos são responsáveis pela produção de queratina e encontram-se ligados uns aos outros por desmossomas (4).

Para além dos queratinócitos, a epiderme também possui melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel. Os melanócitos estão localizados no estrato basal e têm a função de produzir melanina que é responsável pela pigmentação da pele. A luz UVB estimula a secreção de melanina que protege o nosso DNA contra a radiação UV, atuando como protetor solar. As células de Langerhans são células dendríticas presentes nas camadas mais intermédias da epiderme que apresentam funções imunitárias e, por isso, desempenha um papel importante nas reações imunológicas da pele. As células de Merkel

tal como os melanócitos também se encontram localizadas no estrato basal, estando ligadas a terminais nervosos e, portanto, apresentam uma função sensorial (4, 6).

A derme é uma espessa camada de tecido conjuntivo, sendo constituída por colagénio que contribui para a resistência da pele, elastina que é responsável pela flexibilidade da pele e proteoglicanos que conferem viscosidade e hidratação à derme. Esta camada também é composta por terminações nervosas, vasos sanguíneos e anexos cutâneos como os folículos pilosos, as glândulas sebáceas e as glândulas sudoríparas.

A derme é constituída por duas camadas. A camada próxima à epiderme é chamada de camada apical. Essa camada dobra-se para formar papilas dérmicas que se estendem até a epiderme, sendo conhecida como derme papilar. A camada inferior da derme é a derme reticular, sendo esta camada mais espessa, com menor densidade celular, menor conteúdo de proteoglicanos e maior organização de fibras de colagénio e de elastina relativamente à derme papilar.

Por fim, a hipoderme é a terceira e mais profunda camada, consistindo principalmente em tecido adiposo apresentando também anexos cutâneos, neurónios sensoriais e vasos sanguíneos. Esta camada desempenha um papel importante na termorregulação, isolamento, proteção contra lesões mecânicas e fornecimento de energia (reserva nutricional) (3, 4).

O principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos e ingredientes ativos é o estrato córneo. Esta camada é uma barreira muito eficaz contra a penetração destas substâncias devido à combinação de lípidos intercelulares juntamente com o ambiente altamente queratinizado. Por isso, as suas propriedades devem ser modificadas para permitir uma administração mais eficaz das substâncias pretendidas ao tecido alvo (2).

## 1.2. Permeação cutânea

Os fármacos e os ingredientes ativos (no caso dos cosméticos) podem penetrar na pele por duas vias principais (2) (Figura 3):

- Via transepidérmica:
  - Via transcelular,
  - Via intercelular (via polar através de bicamada lipídica).
- Via anexial:
  - A unidade pilossebácea (folículos pilosos e glândulas sebáceas),
  - As glândulas sudoríparas.

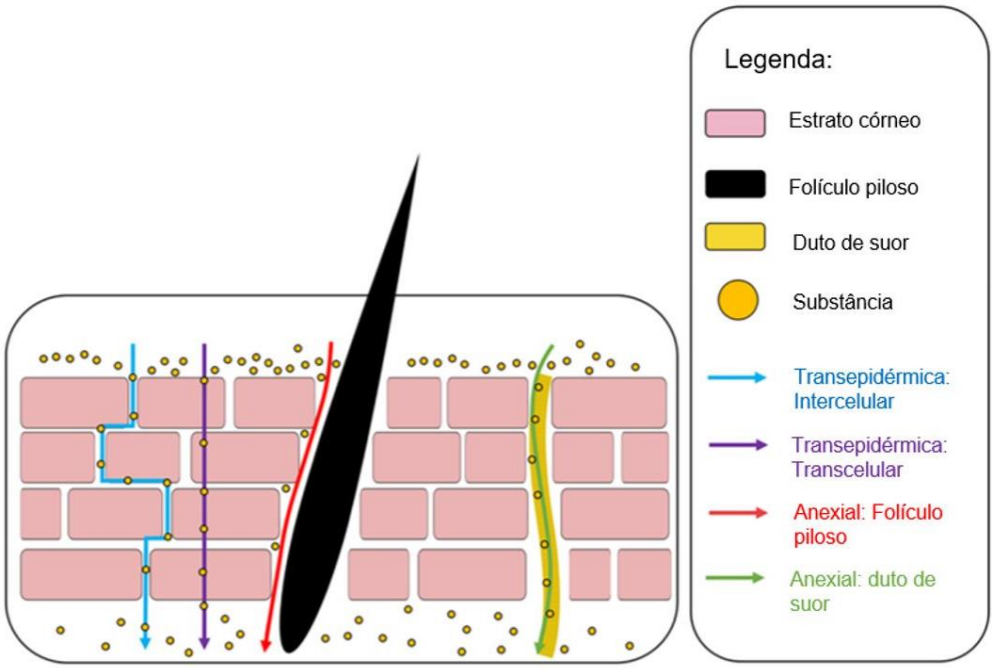



**Figura 3:** Vias de permeação de fármacos/ingredientes ativos através da pele: via transepidérmica e via anexial. Adaptado de (6).

A via transepidérmica é a principal via responsável pela difusão de substâncias através da pele. A maioria das substâncias difundem através do estrato córneo pela via intercelular, sendo esta mais predominante do que a transcelular, embora muitas moléculas consigam atravessar a camada córnea por ambas as vias. Na via intercelular, as substâncias têm de possuir a capacidade de difundir através da matriz lipídica do espaço intercelular dos queratinócitos presentes no estrato córneo para alcançar a derme, sendo compostos hidrofílicos ou pequenas moléculas as substâncias transportadas nesta via. Na via

transcelular, as substâncias difundem-se através das células do estrato córneo durante o processo de absorção. Para isso, essas substâncias têm de ter propriedades hidrofóbicas para permitir a sua passagem pelas bicamadas lipídicas (7, 9).

A via anexial permite a permeação de substâncias através dos anexos cutâneos, não sendo considerada uma via importante uma vez que os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas ocupam apenas 0,1% da área total da superfície da pele humana. No entanto, para a permeação de substâncias de difusão lenta e compostos como os nanossistemas, essa via pode ser importante (10).

## 1.3. Promotores de Penetração Cutânea

A utilização de promotores de penetração cutânea é uma ferramenta essencial na alteração da estrutura do estrato córneo permitindo assim, uma permeação mais eficaz das substâncias/ingredientes ativos pretendidos. Esses promotores são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação em promotores químicos ou físicos como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1:** Alguns exemplos de promotores/sistemas de penetração cutânea químicos e físicos. Adaptado de (9).

| Tipo de promotor | Exemplos |
|---|---|
| Promotores Químicos | **Álcoois**<br>Etanol, Hexanol, Octanol |
| | **Ésteres**<br>Acetato de etilo, salicilato de octilo |
| | **Ácidos gordos**<br>Palmitato de isopropilo, oleato de etilo, monoleato de glicerilo |
| | **Glicóis**<br>Propilenoglicol, 1,2- butilenoglicol |
| | **Terpenos**<br>Eugenol, Mentol, Neridol |
| | **Amidas**<br>Azona |
| | **Sulfóxidos**<br>Decilmetilsulfóxido, Dimetilsulfóxido |
| Promotores Físicos | **Iontoforese** |
| | **Sonoforese** |
| | **Eletroporação** |
| | **Microagulhas** |
| | **Nanossistemas**<br>Microemulsões, Nanopartículas poliméricas; nanopartículas lipídicas, lipossomas, Nanodispersões |

A utilização de promotores químicos para promover a absorção cutânea de substâncias apresenta limitações, principalmente no que diz respeito ao transporte de moléculas com alto peso molecular, com pouca potência e no estado ionizado (11). Além disso,

promotores altamente potentes podem ser irritantes, são difíceis de prever os seus efeitos e alguns mecanismos de ação não são totalmente compreendidos. Essas limitações podem ser superadas recorrendo-se a métodos físicos que promovam a permeação cutânea por meio da aplicação de técnicas como a iontoforese, a sonoforese, as microagulhas ou os nanossistemas que modificam as propriedades de barreira da pele e têm a vantagem de reduzir irritações cutâneas e reações alérgicas (12).

### 1.3.1. Nanossistemas

A nanotecnologia tem sido amplamente utilizada na área da cosmética para melhorar a estabilidade e a funcionalidade das formulações, bem como, para garantir uma maior estabilidade química e física dos ingredientes ativos (13). Como exemplo disso, uma grande diversidade de nanossistemas têm sido utilizados como promotores físicos de penetração cutânea.

Os nanossistemas consistem em sistemas que apresentam uma dimensão nanométrica (< 1μm) (4, 14). Segundo a Recomendação da Comissão Europeia de 2011 um nanomaterial é definido por "um material natural, incidental ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50 % ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 nm e 100 nm. Em casos específicos e sempre que tal se justifique devido a preocupações ambientais e ligadas à saúde, segurança e competitividade, o limiar da distribuição número-tamanho de 50 % pode ser substituído por um limiar compreendido entre 1 e 50 %. […] (15). Porém, não há um consenso sobre o tamanho que os nanossistemas devem ter, sendo na prática frequentemente utilizado dimensões compreendidas entre 300 e 500 nm (4, 14).

Estes promotores de penetração constituem uma alternativa promissora para melhorar a penetração cutânea de agentes ativos através da pele, permitindo, idealmente, o transporte de substâncias (que são sensíveis á degradação, difíceis de penetrar devido ao seu tamanho ou hidrofilia) para o interior da pele sem a necessidade de alterar previamente a sua função de barreira. Estes sistemas facilitam a difusão de fármacos e ingredientes ativos através das estruturas da pele (como os folículos pilosos) e interagem com os lípidos cutâneos que permitem mediar o transporte e/ou criar depósitos na pele para uma libertação sustentada ou induzida por estímulos (14).

Nanossistemas como microemulsões, nanopartículas lipídicas, lipossomas (lipossomas convencionais, transfersomes, etossomas, niossomas), nanodispersões sólido em óleo (S/O) e nanopartículas poliméricas são alguns exemplos de nanossistemas utilizados para encapsular fármacos ou ingredientes ativos, direcioná-los para o local alvo de forma mais eficiente e exercer o seu efeito pretendido. Para além disso, os nanossistemas devem ser capazes de controlar a taxa de libertação dos fármacos/ingredientes ativos sem alterar a sua estrutura química e devem proporcionar um efeito de longo prazo (13, 14).

#### 1.3.1.1. Microemulsões

As microemulsões são sistemas transparentes ou translúcidos termodinamicamente estáveis. Estes sistemas são compostos por gotículas nanométricas de um líquido imiscível disperso noutro líquido, sendo estabilizadas pela presença de tensioativos e co-tensioativos (16, 17). O tamanho das gotículas, geralmente, deve ser inferior a 500 nm, contudo não há um consenso quanto à definição do tamanho das gotículas destes sistemas (18).

Os tensioativos e co-tensioativos diminuem a tensão interfacial entre a fase dispersa e a fase dispersante, o que permite estabilizar a microemulsão. Contudo, por vezes as microemulsões podem necessitar de grandes quantidades de tensioativos, o que pode provocar o potencial aumento da irritação cutânea (19). Apesar de haver uma grande variedade de tensioativos disponíveis para serem utilizados na formulação de microemulsões, o seu uso é restrito devido à sua potencial capacidade de irritação. Portanto, estes componentes devem ser biocompatíveis, não tóxicos, clinicamente aceitáveis e a sua utilização deve ser feita numa concentração apropriada (19).

Em teoria, como as microemulsões são sistemas estáveis, podem ser formadas espontaneamente misturando água, óleo e tensioativo a uma determinada temperatura sem fornecer qualquer tipo de energia externa. Contudo, na prática, o fornecimento de energia (agitação ou aquecimento) facilita a formação destes sistemas (20).

Estes sistemas podem ser classificados em diferentes tipos: A/O, O/A ou sistemas bicontínuos (Figura 4). Esta classificação depende da sua composição, razão entre compostos e arranjos das moléculas dos componentes que estão presentes (19). Podem ainda considerar-se as microemulsões múltiplas A/O/A e O/A/O.

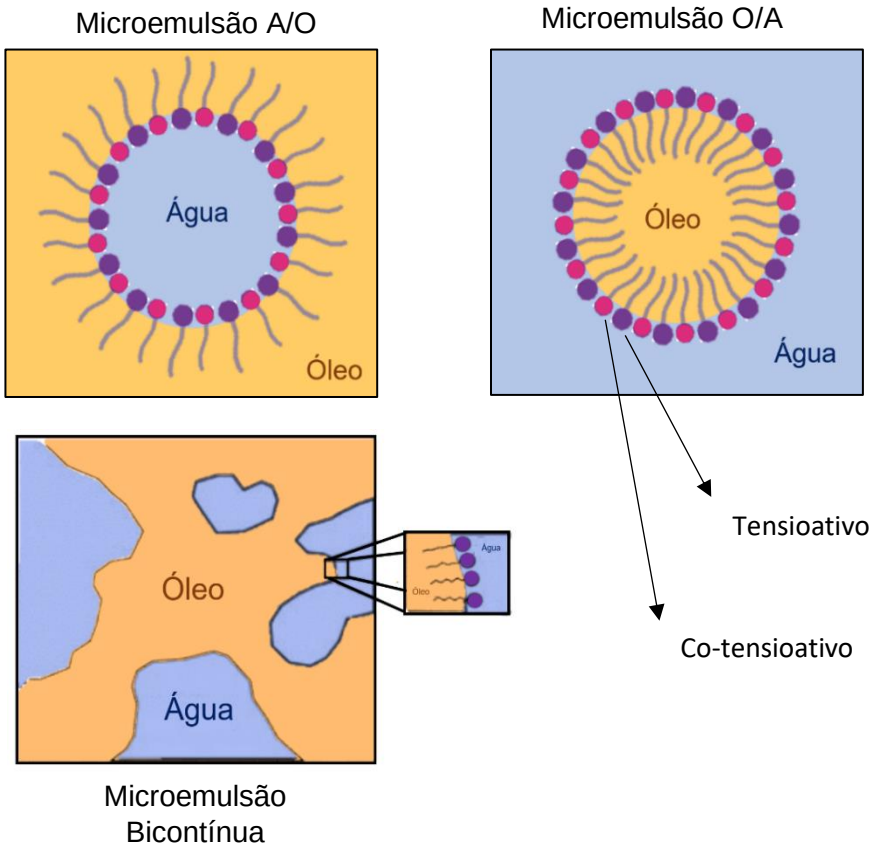



**Figura 4:** Classificação das microemulsões quanto às fases dispersas e dispersantes. Adaptado de (21).

As principais diferenças das microemulsões comparativamente às emulsões consistem no facto de as primeiras apresentarem baixa viscosidade e tamanho reduzido de gotículas da fase interna. As microemulsões são termodinamicamente estáveis como resultado de uma diminuição do tamanho das gotículas e da diminuição da tensão superficial entre a fase oleosa e a fase aquosa (13, 18). As emulsões são termodinamicamente instáveis dado que as gotículas da fase interna destes sistemas podem sofrer coalescência ao longo do tempo e, consequentemente, levar à separação de fases (17, 19).

Como as microemulsões apresentam domínios lipofílicos e hidrofílicos, estes sistemas possuem elevado potencial para incorporar uma ampla gama de moléculas de fármacos/ingredientes ativos hidrófilos e hidrófobos (17, 19). Por exemplo, no caso de incorporar um ingrediente ativo insolúvel em água numa microemulsão O/A, esta seria dispersa na fase oleosa e/ou na região hidrofóbica da cauda da molécula do tensioativo. Enquanto se o ingrediente ativo for hidrossolúvel, este seria incorporado na fase aquosa da microemulsão. Em certos casos, pode haver necessidade de adaptar a viscosidade da microemulsão à via de administração, e para isso, pode-se alterar a formulação ou incorporar agentes gelificantes específicos, como por exemplo, o Carbopol ou os derivados da celulose (21).

Além destes sistemas terem a vantagem de permitirem a entrega de substâncias hidrofílicas e lipofílicas, estes sistemas são fáceis de preparar e administrar, protegem as substâncias de interesse contra a oxidação e hidrólise enzimática, apresentam estabilidade a longo prazo e melhoram a solubilização das moléculas de fármaco/ ingrediente ativo, permitindo aumentar a sua biodisponibilidade (17, 19).

No estudo realizado por Zhu *et al.* (22) foi avaliada a eficácia da utilização de uma microemulsão ou de um hidrogel baseado numa microemulsão como sistema de administração do penciclovir em comparação com um creme comercial. Os testes de permeação *in vivo* revelaram que tanto a microemulsão como o hidrogel baseado na microemulsão aumentavam significativamente a penetração do fármaco na epiderme e na derme, em comparação com o creme comercial. Os testes de estabilidade demostraram que o hidrogel armazenado a 4°C durante 3 meses não apresentou alteração nas propriedades físico-químicas. O teste de irritabilidade em coelhos mostrou que o hidrogel obtido a partir da microemulsão não causou nenhum edema ou eritema após uma única aplicação ou múltiplas aplicações. Assim, foi demonstrado que o hidrogel baseado na microemulsão poderá ser um sistema promissor para a administração tópica do penciclovir (22).

Butani *et al.* (23) avaliaram a eficácia de permeação tópica da anfotericina B utilizando microemulsões. A anfotericina B é um antibiótico de amplo espetro usado para tratar infeções fúngicas invasivas. Este fármaco apresenta baixa solubilidade em água e baixa disponibilidade quando administrado por via oral, bem como diversos efeitos colaterais. Portanto, com o objetivo de melhorar estes parâmetros, a anfotericina B foi incorporada em microemulsões. Foram preparadas sete microemulsões que diferiram na proporção tensioativo: co-tensioativo e na quantidade de água. Os autores deste estudo indicaram que o principal mecanismo de transporte da anfotericina B era dependente da concentração de tensioativos. As melhores propriedades foram demonstradas pela microemulsão que continha 0,1% de Anfotericina B, 5% de miristato de isopropilo (MI) e 35% de tensioativos (3:1, Tween® 80 e propilenoglicol). Este sistema exibiu uma permeação de fármaco 2 vezes maior comparativamente com as outras microemulsões testadas e a solução de fármaco de controlo. Este sistema também revelou ser o que apresentava menor viscosidade em relação aos outros, o que proporciona melhor mobilidade das moléculas do fármaco e, consequentemente, uma libertação mais rápida e controlada por difusão. Por último, a atividade antifúngica *in vitro* em espécies de fungos *Trichophyton rubrum* mostrou que este sistema tem maior zona de inibição e a formulação é estável a 2–8°C e à temperatura ambiente (25 ± 2°C) pelo período de três meses (23).

#### 1.3.1.2.Nanodispersão S/O

As nanodispersões são dispersões em escala nanométrica que podem ser usadas como sistema de administração transdérmica ou oral de uma grande variedade de substâncias. Este sistema é muito utilizado para a administração transdérmica de proteínas, sendo a nanodispersão S/O um sistema seguro e eficaz para esse efeito (24).

As nanodispersões S/O são dispersões de pós de moléculas hidrofílicas em óleos e, tal como as microemulsões, também apresentam um tamanho inferior a 500 nm. O facto destes sistemas apresentarem um tamanho reduzido permite uma melhor capacidade de absorção das substâncias pela pele (13, 18). As nanodispersões S/O são compostas por partículas de fármaco ou ingrediente ativo que estão dispersas num veículo oleoso pela ajuda de agentes tensioativos hidrófobos. A eficácia de entrega da substância de interesse através da pele é influenciada pela sua formulação, isto é, pela concentração, tipo de tensioativos, veículos oleosos e proporções tensioativo-fármaco/ tensioativo-ingrediente ativo. Na preparação destes sistemas, o miristato de isopropilo é muito usado como fase oleosa uma vez que tem capacidade de interagir com os lípidos do estrato córneo, permitindo aumentar a permeação da substância de interesse através do mesmo. Para além disso, o MI é um óleo seguro e amplamente utilizado em produtos farmacêuticos e cosméticos (18, 25).

As nanodispersões S/O quando usadas para administração transdérmica de proteínas, estas são revestidas com um tensoativo, formando um complexo proteína-tensoativo que é facilmente disperso num solvente não aquoso como o MI. Estes sistemas permitem manter a composição proteica e a integridade estrutural (24).

As nanodispersões S/O têm várias vantagens relativamente às microemulsões A/O, como o facto de terem maior capacidade de carga e estabilidade da substância de interesse. Além disso, as partículas S/O são preenchidas com as moléculas de fármaco/ ingrediente ativo, enquanto as gotículas da microemulsão A/O apresentam grandes quantidades de água, o que leva a uma redução da concentração do fármaco/ ingrediente ativo nos produtos finais (18).

Tahara *et al.* (26) demonstraram no seu estudo, que o uso da nanodispersão S/O melhorou efetivamente a permeação de proteínas na pele. Estes autores utilizaram como proteínas modelo, a insulina marcada com FITC, proteína verde fluorescente aprimorada (EGFP) e peroxidase de rábano (HRP) para permear o estrato córneo da pele de porco *in vitro*, utilizando uma nanodispersão S/O.

No estudo realizado por Wakabayashi *et al.* (27) foi demonstrado que a nanodispersão S/O poderia ser usada como solução transcutânea para vacinas contra o cancro. As vacinas representam uma ação profilática ou método terapêutico para suprimir o cancro, através da ativação do sistema imunológico adaptativo. A resposta imune é iniciada pela entrega de antigénios tumorais a células apresentadoras de antigénios (APC). Estes autores desenvolveram uma nanodispersão S/O que possui características promissoras como nanossistema peptídico para vacinas contra o cancro (27).

## 1.4. Celulite

A celulite ou hidrolipodistrofia ginóide é uma disfunção cutânea que se manifesta sob a forma de irregularidades na superfície da pele, sendo muitas vezes identificada por uma aparência de covinhas ou casca de laranja (28). É mais comumente encontrada nas coxas póstero-laterais, nádegas e abdómen da maioria das mulheres pós-púberes (29, 30), embora possa também surgir nos homens. Foi descrita pela primeira vez no início do século XX, tendo sido referida por vários sinónimos, como lipoesclerose nodular, paniculopatia fibroesclerótica edematosa, paniculose, adipose edematosa, entre outras (29). Embora ainda não existam dados epidemiológicos exatos, a maioria dos estudos afirma que a celulite é uma condição da pele que afeta 80%-90% das mulheres pós-púberes (30).

Nürnberger e Muller descreveram pela primeira vez em 1978, a celulite como resultado de diferenças na estrutura da pele e no tecido subcutâneo que estão relacionadas com o sexo (31). Os septos fibrosos podem ser encontrados paralelos à superfície da pele, inclinados a 45° ou perpendiculares à superfície da pele. No caso das mulheres com celulite verifica-se uma maior percentagem de septos perpendiculares em comparação com os homens ou mulheres sem celulite, permitindo que a gordura subjacente se projete, criando assim, uma aparência ondulada. Estudos mais recentes confirmam essas desigualdades estruturais relacionadas com o sexo e explicam ainda, que o aparecimento da celulite resulta de várias alterações fisiológicas sobrepostas, como septos fibroescleróticos localmente aumentados que prendem a pele em áreas de celulite e/ou uma interface dermo-hipodérmica desigual (29, 30). Para além disso, alterações na microcirculação vascular e linfática do tecido adiposo subcutâneo também parecem desempenhar um papel subjacente na formação da celulite. Esta condição pode ser agravada durante períodos em que se verifica a presença de altos níveis de estrogénio, tal como a gravidez, a amamentação e o uso crónico de anticoncecionais orais (29).

É importante compreender a etiologia da celulite para desenvolver abordagens direcionadas e disponibilizar uma infinidade de opções para tratar pacientes com celulite. Atualmente, existe uma grande diversidade de tratamentos disponíveis como o uso de agentes tópicos, dispositivos baseados em energia (lasers, ondas acústicas, radiofrequência), subcisão, medicamentos biológicos injetáveis (Colagenase *Clostridium histolyticum*) e, mais recentemente, preenchimentos dérmicos (injeções de hidroxiapatite de cálcio e microesferas de ácido poli-l-láctico) que têm sido utilizados e estudados devido à sua segurança e eficácia. Embora estes tratamentos possam melhorar a aparência da pele, nunca poderão erradicar a celulite porque isso envolveria uma extensa remodelação tecidual (32).

No caso dos agentes tópicos, existe uma enorme diversidade de formulações anticelulíticas no mercado, podendo os ingredientes ativos presentes nesses cosméticos, ser divididos quanto ao seu local de ação, como descrito na Tabela 2 (28):

**Tabela 2:** Classificação dos ingredientes ativos de acordo com o seu local de ação (27).

| Local de ação | Função | Exemplo de ingredientes ativos |
|---|---|---|
| **Tecido adiposo** | Estimular a degradação dos lípidos (ação lipolítica) | Cafeína, aminofilina, teobromina, teofilina e mateína, entre outros. |
| | Impedir a síntese de lípidos, mais concretamente de triglicerídeos (ação antilipogénica) | Genisteína, glaucina, xantoxilina e folhas de Lótus, entre outros. |
| **Tecido conjuntivo** | Contribuir para o restabelecimento da estrutura da derme | Retinol, silício e extratos de centelha asiática e árvore-das-salsichas, entre outros. |
| **Sistema circulatório** | Estimular o fluxo sanguíneo | Silício, pentoxifilina e extratos de hera trepadeira, centelha asiática, castanheiro da índia, gilbardeira, alcachofra, ananás, papaia, videira e ginkgo, entre outros. |
| | Combater o edema (Antiedematosos) | Inibidores da hialuronidase e da elastase. |
| | Provocar hiperemia no local de aplicação (Rubefacientes) | Nicotinato de metilo e salicilato de metilo. |

Estes ingredientes cosméticos podem ser utilizados de forma isolada ou em conjunto. No entanto, Turati *et al. (33)* analisaram a eficácia de produtos cosméticos na redução da celulite e verificaram que estando os ingredientes ativos presentes de forma isolada em determinadas formulações e noutras em combinação, torna-se difícil avaliar a eficácia de um ingrediente específico e determinar qual o mais eficaz.

Num estudo realizado por Roure *et al*.(34) em que foi avaliada a eficácia de um produto cosmético tópico combinando tetrahidroxipropil etilenodiamina, cafeína, carnitina, forscolina e retinol, estes autores demonstraram que estes ingredientes ativos eram eficazes na diminuição da celulite, apresentando melhorias significativas logo após 4 semanas de tratamento.

## 1.5. Cafeína

A cafeína é um alcaloide designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina (Figura 5), solúvel em água, estável, pode ser encontrada no café, no chá e em alguns refrigerantes, e é conhecida como estimulante do sistema nervoso central. Este alcaloide é metabolizado no fígado pelo sistema citocromo P450 oxidase em 3 derivados de dimetilxantinas: paraxantina (acelera a lipólise), teobromina (expande os vasos sanguíneos) e teofilina (relaxa a musculatura lisa dos brônquios) (35-37).

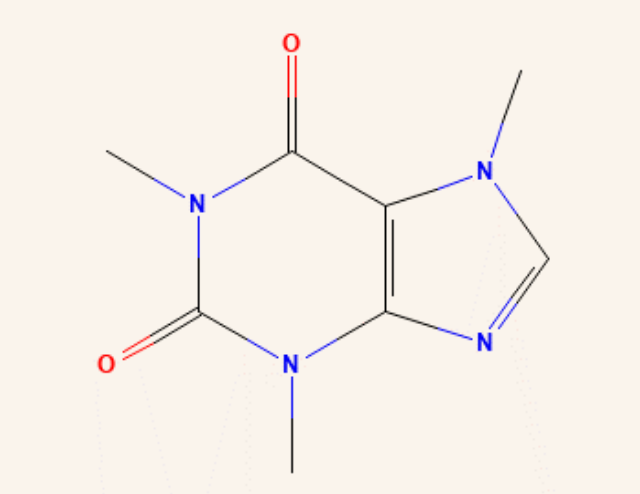



**Figura 5:** Molécula de cafeína. Adaptado de (37).

Esta molécula é cada vez mais utilizada em produtos cosméticos devido à sua alta atividade biológica e capacidade de penetrar a barreia cutânea associada a nanossistemas.

Um produto cosmético, segundo o Infarmed, é “qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais” (38).

A cafeína é frequentemente usada como substância hidrófila modelo na penetração da pele humana e animal, bem como nas diferentes membranas sintéticas usando as células de difusão de Franz. As formulações tópicas comerciais que estão disponíveis normalmente contém 3% de cafeína. Este alcaloide é muito utilizado em cosméticos como ingrediente ativo em produtos anticelulíticos, pois evita a acumulação excessiva de gordura nas células, uma vez que estimula a degradação das gorduras durante a lipólise, através da inibição da atividade da fosfodiesterase. Para além das propriedades anticelulíticas, a cafeína permite aumentar a microcirculação do sangue na pele e possui propriedades antioxidantes que permite proteger as células contra a radiação UV e retardar o processo de fotoenvelhecimento da pele (35).

Mustapha, *et al.* (39) analisaram a influência da concentração da cafeína na penetração cutânea de geles, como resultado de aplicações de diferentes dosagens. Neste estudo foram preparados três geles com concentrações diferentes de cafeína (1%,3% e 5%) com a seguinte constituição: Água (59,5%), Carbopol® 934 (0,5%), Trietanolamina (1,2%), Glicerina (34,2%), Propilenoglicol (2%) e Dimetilenocopoliol (2,3%). O pH dos três geles variou entre 6,5 e 7. Os autores deste estudo demostraram que quanto maior a concentração de cafeína presente no gel, maior a difusão e maior a taxa de libertação deste composto. Concluíram também que o gel com 1% de cafeína é mais eficiente em termos de fluxo e taxa de absorção quando aplicado em maior quantidade, em comparação com geles concentrados aplicados com uma concentração equivalente.

## 1.6. Objetivos do trabalho

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver nanossistemas destinados a serem utilizados como promotores de penetração cutânea da cafeína com a finalidade de exercerem um efeito anticelulítico. Neste sentido, pretendeu-se:

• Preparar microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A com e sem cafeína;

• Caracterizar e avaliar a estabilidade das microemulsões A/O/A e das nanodispersões S/O/A com e sem cafeína (avaliação do tamanho das gotículas, pH, estabilidade acelerada por centrifugação e libertação *in vitro* da cafeína);

• Preparar microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A gelificadas com e sem cafeína;

• Caracterizar e avaliar a estabilidade das microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A gelificadas com e sem cafeína (avaliação do pH, estabilidade acelerada por centrifugação, reologia, textura, teor de cafeína e libertação *in vitro* da cafeína).

# 2. Parte Experimental

## 2.1. Matérias-primas e equipamento

### 2.1.1. Matérias-primas

No desenvolvimento do trabalho experimental foram utilizadas as seguintes matérias-primas (Tabela 3).

**Tabela 3:** Lista de matérias-primas utilizadas neste trabalho.

| Matéria-prima | Origem | País | Lote |
|---|---|---|---|
| Miristato de Isopropilo | Fagron® | Espanha | 12C27-B40-277450 |
| Miristato de Isopropilo | Guinama® | Espanha | 0089400 |
| Tween® 80 | Acofarma® | Portugal | 180974-P-2 |
| Glicerina | Acofarma® | Espanha | 200391-P-1 |
| Clorofórmio | VWR Prolabo Chemicals® | França | 14I010504 |
| Éster da sacarose SP30-C (E473) HLB 6 | Sisterna® | Holanda | 748Y19 |
| Trietanolamina | Fagron® | Espanha | L20060137-OF-241716 |
| Cafeína Anidra | Acofarma® | Espanha | 210743-P-3 |
| Água ultrapura | Laboratório de tecnologia farmacêutica da FFUP | Portugal | - |
| Carbopol® 980 NF polymer | Lubrizol® | Bélgica | 0101234920 |
| Kathon® CG | Guinama® | Espanha | 0065778 |
| Fosfato de sódio dibásico | Acofarma® | Espanha | 171485-P-1 |
| Fosfato de potássio monobásico | Acofarma® | Espanha | 180526-P-1 |
| Cloreto de Sódio | Acofarma® | Espanha | 180651-P-1 |

### 2.1.2. Equipamento

Para a realização deste trabalho foi utilizado o seguinte equipamento (Tabela 4):

**Tabela 4:** Lista de equipamento utilizado neste trabalho.

| Equipamento | Fabricante | Modelo | País |
|---|---|---|---|
| Balança analítica | Mettler-Toledo GmbH | ME104 | Suíça |
| Balança semi-analítica | Adventurer™ OHAUS | ARC120 | China |
| Placa de agitação | IKA® | C-MAG HS 7 | Alemanha |
| Sonicador | Sonics Vibra-cell ™ | VCX 130 | EUA |
| Centrífuga | Eppendorf AG | 5804 | Alemanha |
| Potenciómetro | Crison® | Basic 20 | Espanha |
| Viscosímetro | Themo Haake | Viscotester 550 | Alemanha |
| Texturómetro | Stable Micro Systems | TA-XT2i | Reino Unido |
| Estufa | Memmert | - | Alemanha |
| Espetrofotómetro UV-Vis | Jasco | V-650 | Japão |
| Sistema de purificação de água de laboratório | MERCK | Direct-Q® 3UV-R | Alemanha |
| Difratómetro Laser | Malvern Instruments | Mastersizer 3000 | Reino Unido |
| Rotavapor | Buchi | RE 111-461 | Suíça |
| Aparelho de dissolução | Sotax AG | AT7 | Suíça |

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Preparação da microemulsão A/O/A

A microemulsão A/O/A contendo cafeína foi preparada em duas fases: a formação do microemulsão simples A/O seguida da formação da microemulsão múltipla A/O/A. A microemulsão A/O/A sem cafeína, foi preparada de igual modo, mas sem a adição deste composto. Cada etapa é descrita com mais detalhe a seguir. A fórmula geral da microemulsão A/O/A contendo cafeína está representada na Tabela 5.

**Tabela 5:** Composição da microemulsão A/O/A contendo cafeína.

| | **Matéria-prima** | **Massa (g)** | **Função** |
|---|---|---|---|
| **Fase aquosa (Fase I)** | Cafeína | 2,50 | Ingrediente ativo |
| | Água ultrapura | 70,00 | Fase interna |
| **Fase oleosa (Fase II)** | Éster da sacarose (SP30-C) | 2,50 | Agente tensoativo A/O |
| | Miristato de isopropilo | 25,00 | Excipiente hidrófobo |
| **Fase III (Fase I + Fase II )** | Microemulsão A/O | 40,00 | - |
| **Fase aquosa externa (Fase IV)** | Tween® 80 | 2,50 | Agente tensoativo O/A |
| | Kathon® CG | 0,05 | Conservante |
| | Água ultrapura | q.b.p. 100,00 | Fase externa |

A microemulsão simples A/O com cafeína foi preparada do seguinte modo (Figura 6):

- Pesagem das matérias-primas que constituem a fase aquosa (fase I) e mistura por agitação mecânica utilizando a placa de agitação a 2000 rpm, a uma temperatura de 45°C (para facilitar a dissolução da cafeína).
- Pesagem das matérias-primas que constituem a fase oleosa (fase II) e mistura por agitação mecânica utilizando a placa de agitação a 2000 rpm, a uma temperatura de 45°C.
- Adição da fase aquosa à fase oleosa lentamente com agitação magnética a 2000 rpm, deixando a homogeneizar durante 5 minutos.
- Sonicação utilizando uma sonda de 6 mm de diâmetro e 70% de amplitude durante 15 minutos (para reduzir tamanho das gotículas).

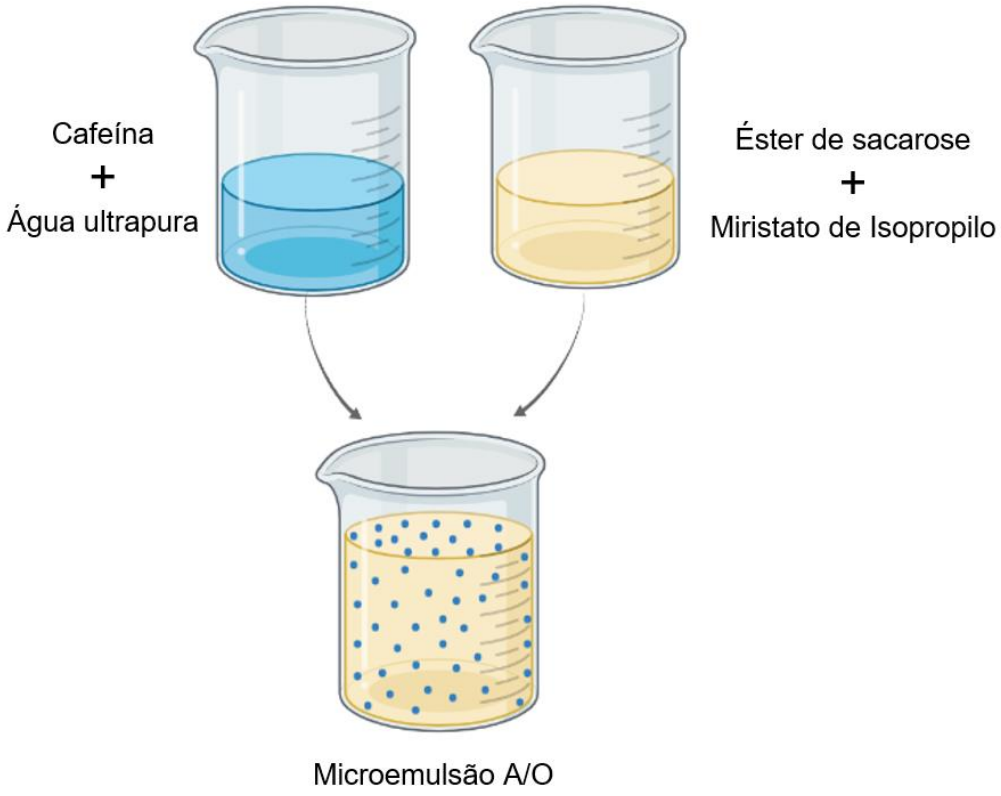



**Figura 6:** Esquema da preparação da microemulsão simples A/O.

A microemulsão sem cafeína foi preparada da mesma maneira, apenas não continha a cafeína na fase aquosa (fase I). As etapas que se seguem são iguais para ambas as microemulsões (com ou sem cafeína).

A microemulsão A/O/A foi preparada da seguinte maneira (Figura 7):

- Pesagem das matérias-primas que constituem a fase aquosa externa (fase IV) e mistura por agitação mecânica utilizando a placa de agitação a 2000 rpm, a uma temperatura de 50°C.
- Pesagem de 40,0g da microemulsão A/O (fase III)
- Adição da fase aquosa à fase oleosa lentamente com agitação a 4000 rpm, para uma melhor homogeneização, durante 5 minutos.
- Sonicação utilizando uma sonda com 6 mm de diâmetro e 70% de amplitude durante 15 minutos.

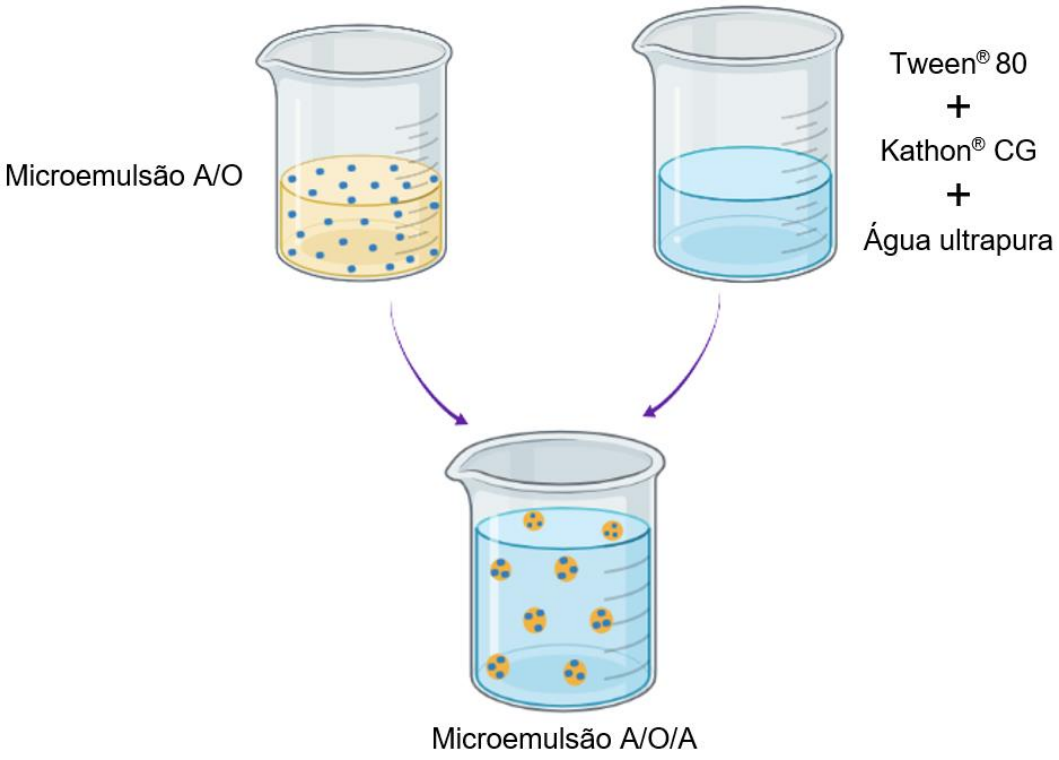



**Figura 7:** Esquema da preparação da microemulsão A/O/A.

No final, obteve-se uma microemulsão A/O/A com uma concentração de 1% (m/m) de cafeína.

### 2.2.2. Preparação da nanodispersão S/O/A

A nanodispersão S/O/A com cafeína foi preparada em três fases: a formação do complexo cafeína-éster da sacarose através da evaporação do solvente, a nanodispersão deste complexo no miristato de isopropilo e, por fim, a dispersão da nanodispersão S/O numa solução aquosa contendo um agente tensioativo. A nanodispersão S/O/A sem

cafeína foi preparada de forma ligeiramente diferente. Como esta não tinha a cafeína não se realizou a etapa de formação do complexo. Neste caso, o éster de sacarose foi dissolvido diretamente no miristato de isopropilo, não sendo necessário o uso de clorofórmio. A formulação da nanodispersão é muito semelhante à formulação da microemulsão, apenas difere na presença da glicerina que tem a função de atuar como co-tensioativo. Cada etapa é descrita com mais detalhe a seguir.

A fórmula geral da nanodispersão S/O/A contendo cafeína está representada na Tabela 6.

**Tabela 6:** Composição da nanodispersão S/O/A contendo cafeína.

| | **Matéria-prima** | **quantidade** | **Função** |
|---|---|---|---|
| **Fase I *** | Cafeína | 1,00 g | Ingrediente ativo |
| | Éster da sacarose (SP30-C) | 2,50 g | Agente tensoativo A/O |
| | Clorofórmio | 50,00 ml | Solvente |
| **Fase II *** | Complexo Cafeina-Éster da sacarose | 3,50 g | - |
| **Fase III** | Miristato de isopropilo | 25,00 g | Fase interna |
| **Fase IV** | Tween® 80 | 5,00 g | Agente tensoativo O/A |
| | Glicerina | 5,00 g | Agente co-tensoativo O/A |
| | Kathon® CG | 0,05 | Conservante |
| | Água ultrapura | q.b.p. 100,00 | Fase externa |

**Nota:** A fórmula da nanodispersão S/O/A sem cafeína não continha a fase I, e a fase II era constituída por 2,50 g de éster da sacarose.

A cafeína é uma molécula frequentemente utilizada em formulações cosméticas para a celulite, sendo estável, solúvel em água, económica e de fácil acesso.

A formação do complexo cafeína-éster da sacarose foi preparada utilizando o seguinte procedimento (Figura 8):

- Pesagem das matérias-primas que constituem a fase I e mistura por agitação mecânica utilizando uma placa de agitação a 2000 rpm durante 5 minutos.
- Evaporação do solvente utilizando um rotavapor, com o banho a 65°C, com 200 mbar de pressão, durante 1h (40) .

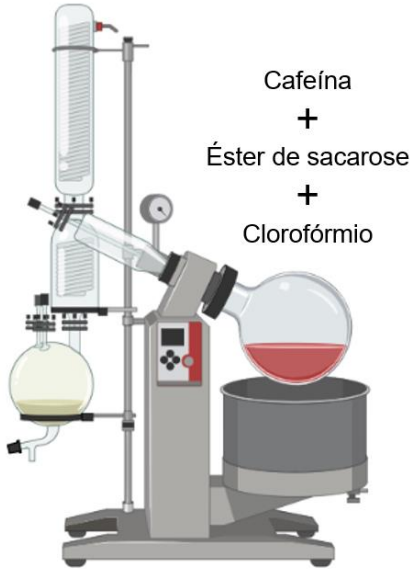



**Figura 8:** Esquema da formação do complexo Cafeína-Éster de sacarose.

Como a cafeína é bastante solúvel em clorofórmio, esta molécula foi dissolvida diretamente no clorofórmio juntamente com o éster da sacarose. O rotavapor foi utilizado para evaporar o clorofórmio em apenas 1h.

A nanodispersão S/O foi obtida da seguinte forma (Figura 9):

- O complexo cafeína-éster da sacarose (Fase II) foi disperso no miristato de isopropilo por agitação mecânica utilizando uma placa de agitação a 2000 rpm durante 5 minutos.
- A dispersão resultante (fase III) foi submetida a sonicação utilizando uma sonda de 6 mm de diâmetro e uma amplitude de 70% durante 15 minutos.

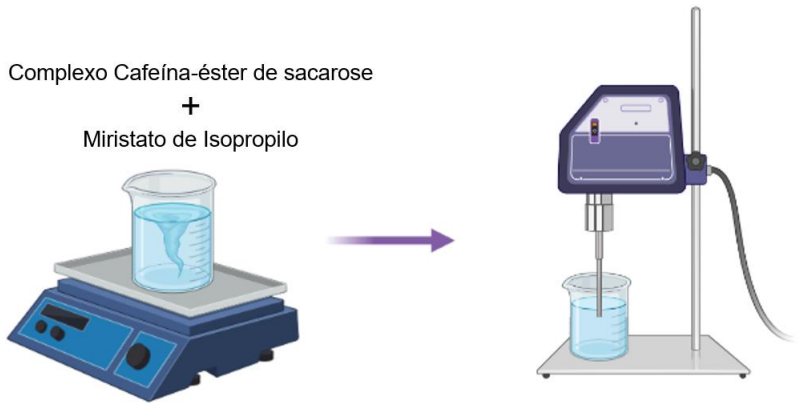



**Figura 9:** Esquema da dispersão do complexo cafeína-éster da sacarose em miristato de isopropilo.

No caso da nanodispersão S/O/A sem cafeína, como não se forma nenhum complexo, não houve necessidade de usar clorofórmio e, consequentemente, o rotavapor. Assim sendo, não se efetuou a fase I, e a fase II era apenas constituída por 2,50 g de éster da sacarose, tendo sido preparada da seguinte maneira (Figura 10):

- Dispersão de 2,50 g do éster da sacarose em 25,00 ml de miristato de isopropilo e homogeneização por agitação mecânica utilizando uma placa de agitação a 2000 rpm durante 5 minutos.
- Sonicação da preparação resultante (fase III) utilizando a sonda de 6 mm de diâmetro e uma amplitude de 70% durante 15 minutos.

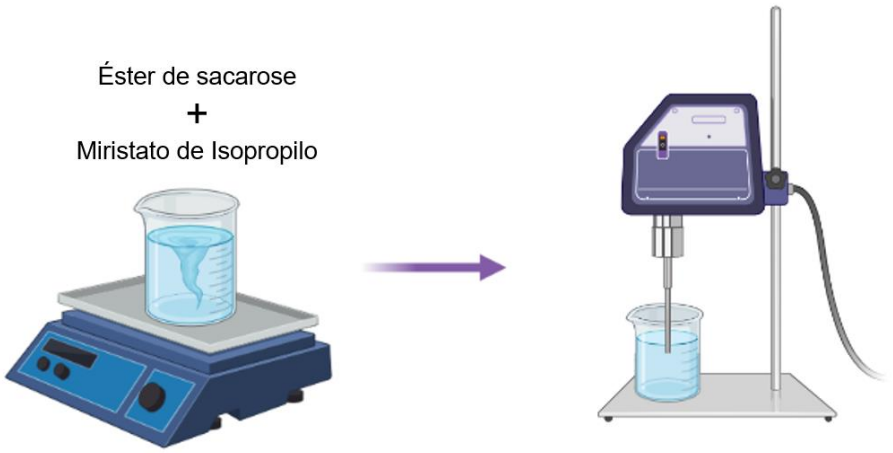



**Figura 10:** Esquema da dispersão do éster da sacarose em miristato de isopropilo.

A última etapa foi realizada de igual forma para ambas as nanodispersões S/O/A (com e sem cafeína) e consistiu em dispersar a nanodispersão S/O obtida, na fase aquosa. Esta etapa foi realizada da seguinte forma:

- Pesagem das matérias-primas que constituem a fase IV e mistura por agitação mecânica utilizando uma placa de agitação a 2000 rpm, a uma temperatura de 50°C.
- Adição da fase aquosa (fase IV) à fase oleosa (fase III) lentamente com agitação em placa de agitação a 4000 rpm, deixando a homogeneizar durante 5 minutos.
- Sonicação utilizando uma sonda de 6 mm de diâmetro e uma amplitude de 70%, durante 15 minutos.

A nanodispersão S/O/A obtida apresenta uma concentração de 1% (m/m) de cafeína.

### 2.2.3. Caracterização das formulações

#### 2.2.3.1. Tamanho das gotículas

Os tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões A/O/A e das nanodispersões S/O/A foram avaliados utilizando o Mastersizer 3000 (Figura 11) que utiliza a técnica de difração a laser para medir gotículas com dimensões compreendidas entre 10 nm e 3,5 mm.




**Figura 11:** Mastersizer 3000, Malvern (Reino Unido).

A difração laser consiste em medir a intensidade da variação angular da luz espalhada após a passagem de um feixe de laser pela amostra de gotículas dispersas (Figura 12) (41). Trata-se de uma técnica rápida, fácil de utilizar, flexível e que pode ser adaptada para a medição de amostras em diferentes formas físicas.

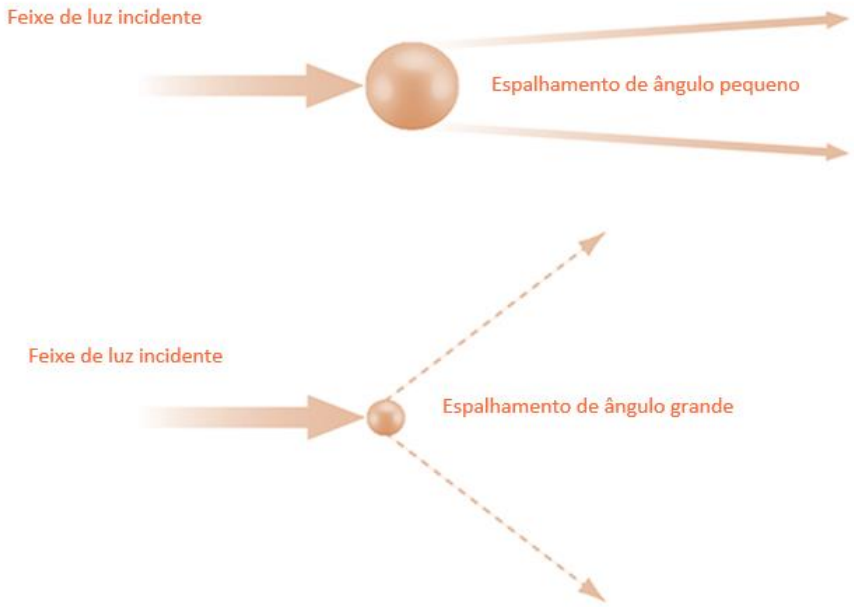



**Figura 12:** Dispersão da luz em função do tamanho das gotículas. Adaptado de (42).

Em primeiro lugar, o feixe de radiação laser atravessa a amostra dispersa e ilumina as gotículas. Posteriormente, a intensidade de luz dispersa pelas gotículas existentes na amostra, numa enorme gama de ângulos, é medida com exatidão por uma série de detetores. Em função do tamanho das gotículas, os ângulos que são formados pela luz dispersa são, consequentemente, diferentes. Os resultados são submetidos a uma análise matemática, obtendo-se uma distribuição precisa e reprodutível do tamanho das gotículas presentes na amostra (43).

Os resultados da avaliação do tamanho das gotículas são, geralmente, apresentados na forma de uma distribuição estatística. Esses tamanhos são apresentados em percentis, obtendo-se o volume de distribuição de 10%, 50% e 90% ($D_{10}$, $D_{50}$ e $D_{90}$ respetivamente), que se refere às gotículas com diâmetros iguais ou inferiores aos valores obtidos. Para cada amostra, o aparelho faz várias leituras do tamanho e apresenta a média, o coeficiente de variação e o *Span* (43).

Os parâmetros do equipamento que foram utilizados neste trabalho foram os seguintes (Tabela 7):

**Tabela 7:** Parâmetros utilizados no Mastersizer 3000.

| | |
|---|---|
| Tipo de gotícula | Esférica |
| Nome do material | Lípido |
| Índice de refração do lípido | 1,6 |
| Índice de absorção | 0,01 |
| Densidade (g/cm$^3$) | 1 |
| Dispersante | Água |
| Índice de Refração do dispersante | 1,33 |

### 2.2.3.2. Determinação do pH

Primeiramente, a determinação do pH é uma propriedade importante para a caracterização de preparações de aplicação cutânea, dado que estas devem possuir um pH que seja compatível com a região corporal onde será aplicado. Em segundo lugar, a avaliação do pH ao longo do tempo de armazenamento é um dos parâmetros que permite avaliar a estabilidade do produto.

Neste trabalho, a comparação dos resultados da avaliação do pH das microemulsões A/O/A relativamente à nanodispersões S/O/A armazenadas a 20°C, permitiu também avaliar as diferenças entre estes dois tipos de formulações. A medição do pH foi realizada a 20°C em triplicado após a preparação das formulações, utilizando o Potenciómetro Basic 20, Crison Instruments (Figura 13). Os resultados apresentados são valores médios das 3 medições ± o desvio padrão.

Tanto o pH das microemulsões A/O/A como das nanodispersões S/O/A não é representativo do pH da preparação final correspondente, porém, esta avaliação é revelante para efeito de comparação entre os dois tipos de formulações em estudo.

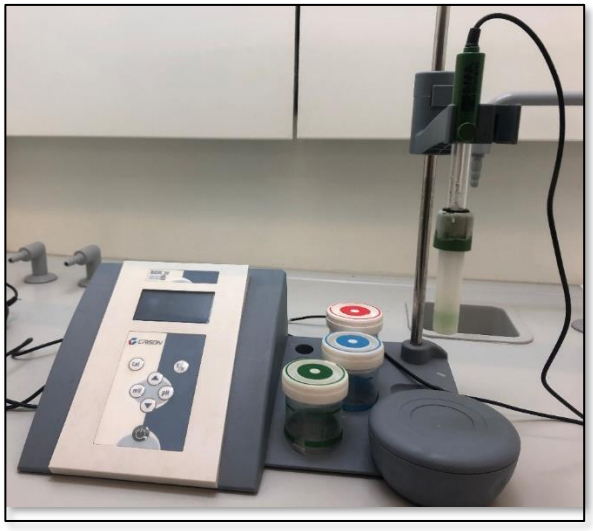


**Figura 13:** Potenciómetro Basic 20, Crison Instruments (Espanha).

### 2.2.3.3. Estabilidade acelerada por centrifugação

A estabilidade de uma preparação farmacêutica ou cosmética pode definir-se como a capacidade que a mesma apresenta para manter as suas propriedades físicas e químicas, bem como a sua eficácia, dentro dos limites legais até à data de expiração do prazo de validade.

Para avaliar a estabilidade dos produtos de aplicação cutânea utilizam-se técnicas que têm de ser, na maior parte das vezes, adaptadas ao tipo de amostra, para permitir a deteção de alterações nas características da preparação. A realização de ensaios de estabilidade num curto espaço de tempo (ensaios de estabilidade acelerada) é importante para antecipar eventuais alterações que possam ocorrer na preparação durante o seu armazenamento. Estes ensaios aceleram a velocidade das alterações físicas e/ou químicas que podem ocorrer numa preparação, podendo ser realizados por diferentes técnicas, tais como os testes mecânicos ou os que utilizam condições de temperatura e humidade exageradas (44, 45).

Assim, é importante realizar este tipo de ensaio tanto nas microemulsões A/O/A e como nas nanodispersões S/O/A, de maneira a antecipar eventuais problemas de estabilidade. Se algum destes sistemas mostrar alterações após o ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação, indica que dificilmente será estável durante o período de armazenamento, pelo que deve ser excluída a sua utilização (44).

No método de centrifugação as amostras são submetidas a uma condição extrema de força gravítica, produzindo stresse nas mesmas. Esta condição simula um aumento na força da gravidade dentro dos tubos de centrífuga, aumentando a mobilidade das gotículas. Isto permite visualizar possíveis alterações, ajudando a prever a estabilidade de uma preparação ao longo do tempo. Estas alterações podem ser observadas na forma de precipitação, coalescência, formação de sedimentos compactos (caking), ocorrência de separação de fases, entre outros (44, 45).

Para este ensaio foi utilizada a Centrífuga Eppendorf 5804 (Figura 14), tendo a microemulsão A/O/A e a nanodispersão S/O/A sido colocadas em tubos graduados numa quantidade de aproximadamente 5 ml. As amostras foram submetidas a centrifugação à temperatura ambiente, a 3000 rpm, durante 30 minutos. No fim do ensaio, as preparações foram analisadas visualmente, de modo a verificar se existia separação de fases.




**Figura 14:** Centrífuga, Eppendorf AG 5804 (Alemanha).

Ainda que as microemulsões A/O/A e as nanodispersões S/O/A preparadas neste trabalho não correspondam à formulação definitiva, foram submetidas a ensaios de estabilidade acelerada de forma a prever possíveis problemas de instabilidade antes de se proceder à respetiva gelificação.

#### 2.2.3.4. Libertação *in vitro* de cafeína a partir da microemulsão e da nanodispersão

A libertação da cafeína a partir da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A foi avaliada através da realização de ensaios *in vitro*.

No ensaio de libertação da cafeína, utilizou-se o aparelho de dissolução, SOTAX AT7 com pá agitadora (Figura 15). Para realizar este ensaio, pesaram-se 2,5 g de cada uma das amostras para uma membrana de diálise (previamente hidratada utilizando o líquido de dissolução). Em seguida, o sistema foi mergulhado num vaso de dissolução contendo 250 ml de solução tampão de fosfatos pH 7,4, a 37,0 ±0,5°C, e submeteu-se o sistema a uma agitação de 50 rpm. Posteriormente, recolheram-se alíquotas de 2,5 ml aos 30, 60, 120 e 180 min, sem reposição de volume. As alíquotas foram coletadas em balões de 25 ml e diluídas com solução tampão de fosfatos pH 7,4. Por fim, as amostras já diluídas foram lidas no espectrofotómetro UV/Vis Jasco V650, a 273 nm, de modo a determinar o teor de cafeína libertado a partir de cada formulação.

Para poder quantificar a cafeína libertada da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A foi necessário realizar uma curva de calibração, tendo sido preparadas soluções padrão de cafeína em tampão de fosfatos pH 7,4, nas concentrações correspondentes a 2 µg/ml, 4 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml e 12 µg/ml e lidas as respetivas absorvâncias. É de notar que os valores finais das absorvâncias da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A foram corrigidos de forma a eliminar a interferência dos componentes que pudessem absorver no mesmo comprimento de onda que a cafeína. Para isso, fez-se a diferença entre os valores das absorvâncias obtidos para as amostras correspondentes à microemulsão A/O/A e à nanodispersão S/O/A com cafeína e os valores das absorvâncias obtidos para as amostras sem cafeína.




**Figura 15:** Aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça) com pá agitadora.

### 2.2.4. Gelificação das formulações

Após a preparação da microemulsão múltipla A/O/A e de serem efetuados os respetivos ensaios de caracterização, procedeu-se à dispersão de 0,5% (m/m) de Carbopol® 980 NF em 99,5% (m/m) da microemulsão. Posteriormente, procedeu-se à neutralização por adição de trietanolamina, levando à formação de uma microemulsão gelificada. O mesmo procedimento foi efetuado para a nanodispersão S/O/A, obtendo-se assim uma nanodispersão gelificada.

### 2.2.5. Caracterização das formulações gelificadas

#### 2.2.5.1. Determinação do pH

Como referido anteriormente neste trabalho, o pH de uma preparação de uso cutâneo é uma característica muito importante dado que deve ser compatível com a região corporal onde será aplicado. Para além disso, este parâmetro deve manter-se constante ao longo do tempo, para evitar o risco de atingir valores não compatíveis com a aplicação cutânea e ser indicativo de problemas de estabilidade (45).

O pH do estrato córneo é uma ferramenta importante da barreira epidérmica, sendo responsável pela proteção do organismo contra elementos nocivos. Tanto o gradiente de pH no estrato córneo como o valor de pH na superfície cutânea são importantes, uma vez

que são responsáveis pelo controlo da atividade de enzimas dependentes do pH, pela regulação da descamação, da queratinização, da coesão e da homeostasia da pele (46).

O pH cutâneo é assegurado por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos dicarboxílicos do suor, pelos ácidos gordos das glândulas sebáceas e pelos elementos ácidos da queratina (47). A pele apresenta um valor de pH geralmente ácido (valores de pH entre 4 e 6, podendo oscilar por vezes até 8), contudo este valor pode sofrer uma ligeira variação de acordo com a exposição a condições ambientais, sexo, idade e local anatómico, mas também devido ao uso de produtos cosméticos. Estes fatores são de extrema importância uma vez que alterações no pH do estrato córneo podem promover (ou atenuar) doenças da pele (45, 46).

Como referido anteriormente, a avaliação do pH também é um parâmetro que é utilizado para aferir a estabilidade das preparações. Assim, é importante determinar o pH após a preparação, assim como, ao longo de um período mais alargado de armazenamento, de maneira a poder antecipar possíveis alterações na estabilidade.

A análise do pH das formulações preparadas foi realizada utilizando o potenciômetro Basic 20, Crison Instruments. De maneira a avaliar possíveis alterações ao longo do tempo, o pH foi analisado 8, 15, 30, 60 e 90 dias após a preparação e foram feitas três leituras de cada análise. A média e o desvio padrão foram então calculados.

#### 2.2.5.2. Avaliação da viscosidade

A viscosidade de uma preparação consiste na sua resistência ao fluxo ou escoamento, sendo que quanto maior for a viscosidade, menor a velocidade com que a preparação se movimenta (44).

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \qquad \textbf{Equação 1}$$

Na equação 1, η corresponde à viscosidade, $\tau$ à tensão de corte ou de cisalhamento e $\gamma$ à velocidade de corte.

A avaliação da viscosidade é um parâmetro importante que está relacionado com a facilidade de enchimento das embalagens no processo de produção industrial e com a remoção do produto a partir do material de acondicionamento.

Dependendo das propriedades das preparações, o seu comportamento mecânico pode ser classificado como Newtoniano ou não-Newtoniano. O comportamento Newtoniano é caracterizado por uma viscosidade constante, independente da força exercida. Enquanto o comportamento não-Newtoniano traduz-se na alteração da viscosidade com o aumento da velocidade de corte aplicada.

Dentre as preparações com comportamento não-Newtoniano existem preparações plásticas, pseudoplásticas (ou reofluidificantes) e dilatantes (ou reoespessantes), sendo esta classificação feita de acordo com o seu comportamento reológico quando exercida uma determinada força externa, não considerando o fator tempo (Figura 16).

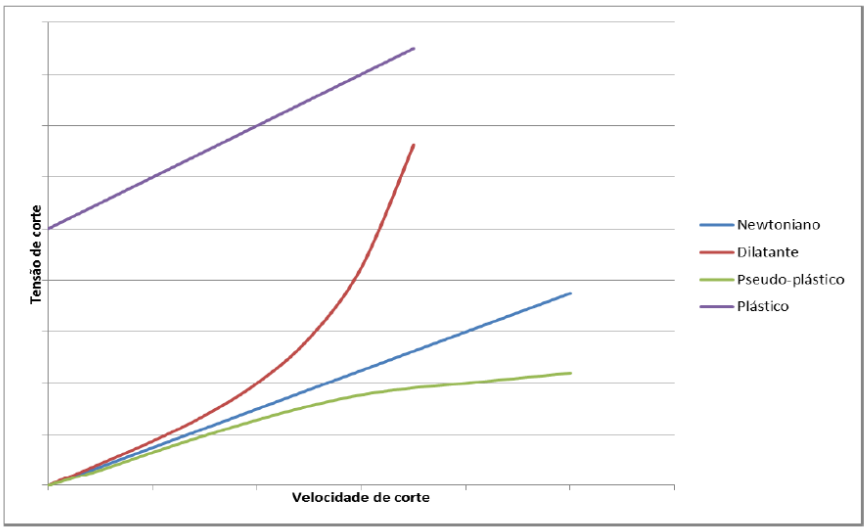



**Figura 16:** Representação gráfica de tensão de corte *vs* velocidade de corte de diferentes tipos de comportamentos reológicos. Adaptado de (45).

Um comportamento pseudoplástico (ou reofluidificante) traduz-se, para valores de temperatura constante, pela diminuição da viscosidade aparente quando se aumenta a velocidade de corte. Este comportamento geralmente é encontrado em emulsões, dispersões e suspensões. Uma preparação plástica é caracterizada por não fluir quando lhe é aplicada uma tensão de corte muito baixa, verificando-se que apenas começa a escoar quando esse valor é acima de um valor mínimo de tensão de corte (designado por valor de cedência). Este comportamento pode ser encontrado em determinados cremes. As preparações dilatantes (ou reoespessantes) traduzem-se num aumento da viscosidade aparente conforme a velocidade de corte aumenta, sem considerar o fator tempo. Estas preparações conseguem fluir a baixas tensões de corte contudo, tornam-se menos fluidas (ficam rígidas) quando sujeitas a elevadas tensões de corte. Este comportamento é característico de pastas ou composições com elevada concentração de pigmentos (45).

Por outro lado, as preparações podem ser classificadas como tixotrópicas ou anti-tixotrópicas (reopéticas) dependendo das suas alterações reológicas ao longo do tempo quando é aplicada uma velocidade de corte constante. Se a viscosidade aparente de uma preparação diminuir ao longo do tempo, para uma velocidade de corte constante, considera-se que a preparação apresenta um comportamento tixotrópico. Enquanto se a viscosidade de uma preparação aumentar ao longo do tempo, para a mesma velocidade de corte aplicada, verifica-se um comportamento anti-tixotrópico.

As preparações cutâneas com carácter tixotrópico apresentam a vantagem de se deformarem durante a aplicação, isto é, tornam-se mais fluidas, o que facilita a sua aplicação. Além disso, apresenta a capacidade de recuperar a viscosidade inicial no momento que termina a aplicação, evitando que a preparação escorra. Contudo, por outro lado, é interessante obter um valor de tixotropia não muito elevado para permitir que a preparação não escorra sobre a superfície da pele para outras zonas após a aplicação, devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura (44).

O estudo da viscosidade das preparações gelificadas foi realizado utilizando o viscosímetro Thermo Haake Viscotester VT-550 (Figura 17), por análises contínuas de cisalhamento, que foram realizadas com a finalidade de avaliar a tensão de corte (Pa) em função da razão de corte ($s^{-1}$). O ensaio foi realizado a duas temperaturas, 20°C e 32°C, utilizando um banho de água termostatizado. A análise iniciou-se com uma velocidade de corte de $1s^{-1}$ até um valor máximo de $100s^{-1}$ (curva ascendente), retornando posteriormente para $1s^{-1}$ (curva descendente), compreendendo 10 etapas ascendentes e outras 10 etapas descendentes, com um tempo de estabilização da temperatura de cerca de 900 segundos. As medições foram realizadas 8, 15, 30, 60 e 90 dias após a preparação, com o objetivo de avaliar o efeito do tempo de armazenamento na viscosidade das preparações gelificadas.

.

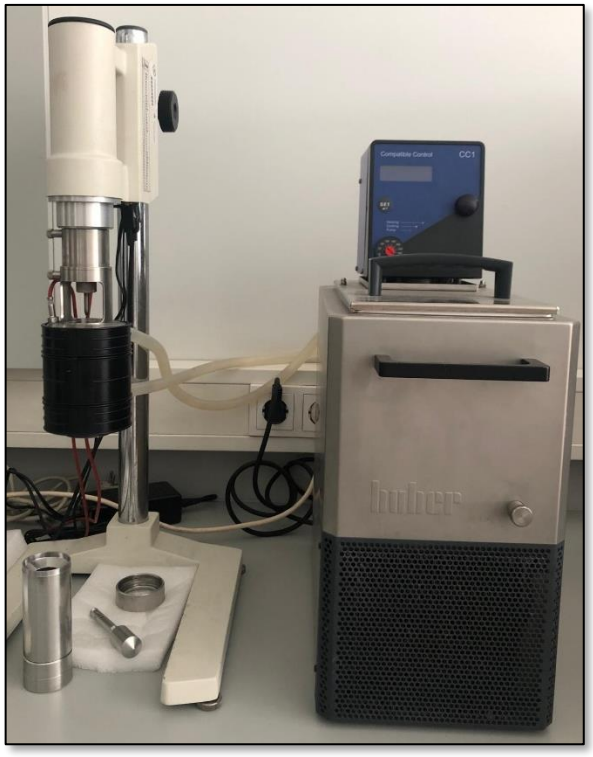



**Figura 17:** Viscosímetro Thermo Haake Viscotester VT-550 (Alemanha).

### 2.2.5.3. Avaliação da textura

A textura traduz-se nas características físicas de uma preparação percecionadas pelo sentido do tato, que são avaliadas pela deformação da mesma quando se lhe aplica uma determinada força. Estas características podem ser medidas em termos de força, distância e tempo, sendo estes parâmetros importantes para a aceitabilidade do produto final por parte do consumidor. A determinação da textura pode ser feita recorrendo a um texturómetro, permitindo a avaliação dos efeitos das matérias-primas, da formulação ou do processo de preparação, na aceitabilidade do produto final dado que as características de textura são atributos sensoriais fundamentais para a aceitabilidade do produto cosmético.

Esta avaliação compreende a realização de testes mecânicos para a determinação das características de adesividade e de firmeza de uma preparação, estando estas relacionadas com a deformação que se observa nas formulações quando lhes é aplicada uma força (48).

Neste ensaio é avaliada a adesividade e a firmeza em função da distância percorrida por uma sonda durante a deformação da amostra. A sonda penetra na amostra a uma

distância pré-definida e a uma determinada velocidade. No fim dessa distância de penetração, a sonda regressa à posição original, acima da superfície da amostra.

No gráfico força *vs* distância percorrida pela sonda, a adesividade, que é a medição da área negativa, corresponde à força necessária para superar as forças de atração entre as superfícies da amostra e da sonda, ou seja, traduz a energia que é necessária despender para a sonda ascender à posição original. As preparações mais adesivas precisam de mais energia para que a sonda consiga ascender à posição inicial, refletindo-se em valores (absolutos) de área negativa mais elevados.

A firmeza é determinada pela força máxima exercida pela sonda ao penetrar na amostra durante o primeiro ciclo de compressão, estando relacionada com a facilidade de aplicação do produto. Assim, as preparações que apresentam maior consistência precisam de forças mais elevadas para que a sonda consiga penetrar na amostra (45).

As preparações semissólidas devem apresentar características que permitam a sua remoção fácil da embalagem, espalhar facilmente na pele e apresentar propriedades adesivas de forma a prolongar o tempo de retenção no local onde são aplicadas (49).

Para efetuar a avaliação da textura utilizou-se o texturómetro TA-XT2i Stable Micro Systems (Figura 18). Foi utilizado o modo de compressão, usando uma célula de carga de 5kg, uma *trigger* force de 0,049 N, uma profundidade de penetração de 5 mm, uma velocidade de teste de 3 $mm.s^{-1}$ e uma sonda cilíndrica de 25 mm de diâmetro. A escolha da sonda ou acessório que se utiliza dependerá da amostra, ou da propriedade que se deseja medir. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, à temperatura ambiente (20 ±1°C) e a 32 ±1°C, ao fim de 30, 60 e 90 dias após a preparação, de modo a avaliar a influência do tempo de armazenamento na textura das formulações gelificadas e, também, inferir sobre a estabilidade a longo prazo das preparações gelificadas.

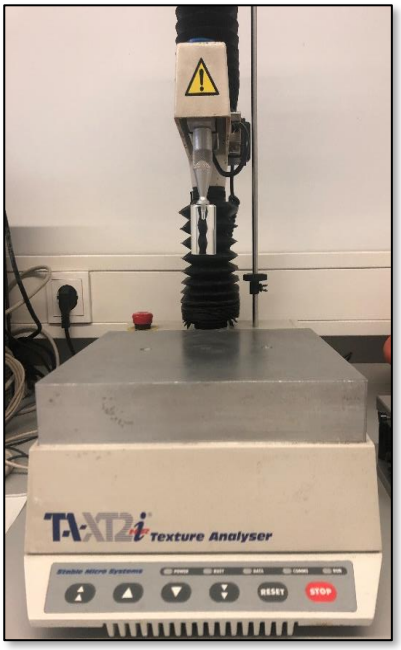



**Figura 18:** Texturómetro TA-XT2i, Stable Micro Systems (Reino Unido).

### 2.2.5.4. Estabilidade acelerada por centrifugação

Como referido anteriormente neste trabalho, a avaliação da estabilidade de uma preparação é importante para garantir que esta não sofre alterações físicas e químicas ao longo do tempo, que podem ser provocados por diversos fatores presentes nas formulações e no processo de obtenção das mesmas, como por exemplo, a composição da formulação, o tamanho das gotículas, a viscosidade, entre outros.

Essa avaliação pode ser realizada através do ensaio de estabilidade acelerada, que é um ensaio de estabilidade efetuado num curto espaço de tempo, que permite antecipar possíveis alterações que possam ocorrer na preparação durante o seu armazenamento.

Para este ensaio, as preparações gelificadas (microemulsão A/O/A gelificada e nanodispersão S/O/A gelificada) foram centrifugadas na Centrífuga Eppendorf 5804. Ambas as preparações gelificadas foram colocadas em tubos graduados, numa quantidade de aproximadamente 5 ml. As amostras foram centrifugadas à temperatura ambiente, a 3000 rpm, durante 30 minutos. No fim do ensaio, as preparações foram analisadas, de modo a verificar se existiam problemas de instabilidade.

### 2.2.5.5. Teor de cafeína

O doseamento da cafeína presente na microemulsão A/O/A e na nanodispersão S/O/A gelificada é importante para averiguar se esta está presente na quantidade adequada na formulação. O doseamento da cafeína presente nas preparações foi realizado por espectrofotometria, utilizando o espectrofotómetro UV/Vis, Jasco V650 (Figura 19), a 273 nm, dado que a cafeína apresenta um pico máximo de absorção neste comprimento de onda.




**Figura 19:** Espectrofotómetro UV/Vis, Jasco V650 (Japão).

Para o doseamento do teor de cafeína nas amostras dispersou-se1 g da amostra em 49 g de solução de NaCl 1% (para provocar a instabilização do sistema e a separação de fases), submetendo-se a agitação magnética a 3000 rpm, durante 1 hora. Posteriormente, filtrou-se a dispersão com um filtro de 0,45 µm e diluiu-se 1 ml do filtrado na solução de NaCl 1% utilizando um balão de 25 ml. A solução resultante foi lida no espectrofotómetro a 273 nm.

Para poder quantificar a cafeína presente na microemulsão A/O/A e na nanodispersão S/O/A gelificas foi necessário realizar uma curva de calibração, tendo sido preparadas soluções padrão de cafeína em solução de NaCl a 1% (m/v) nas concentrações correspondentes a 2 µg/ml, 2,5 µg/ml, 3,3 µg/ml, 5 µg/ml, 8 µg/ml, 10 µg/ml e 20 µg/ml, e lidas as respetivas absorvâncias.

A partir da equação da reta de calibração obtida foi possível calcular o teor de cafeína presente nas amostras. É de salientar que o valor final do doseamento da cafeína presente na microemulsão A/O/A e na nanodispersão S/O/A foi corrigido, de forma a eliminar a

interferência dos componentes que pudessem absorver no mesmo comprimento de onda que a cafeína. Para isso, fez-se a diferença entre os valores das absorvâncias obtidos para as amostras da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A gelificadas contendo cafeína e os valores das absorvâncias obtidos para as amostras sem cafeína.

Este ensaio foi realizado para a microemulsão A/O/A e para a nanodispersão S/O/A gelificadas, após 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, de modo a avaliar se havia alterações na quantidade de cafeína ao longo do tempo.

#### 2.2.5.6. Libertação *in vitro* da cafeína a partir da microemulsão e nanodispersão gelificadas

A libertação de cafeína incorporada na microemulsão A/O/A e na nanodispersão S/O/A gelificadas pode ser avaliada por meio de ensaios *in vitro*. Tal como referido anteriormente, estes testes permitem efetuar um controlo qualitativo do sistema.

No ensaio de libertação de cafeína a partir das preparações gelificadas, utilizou-se o aparelho de dissolução, SOTAX AT7 com pá agitadora. Pesaram-se 2,5 g de cada uma das preparações gelificadas, em recipiente apropriado e, em seguida, foi aplicada uma membrana de 0,45 µm (previamente hidratada com o líquido de dissolução) sobre a amostra e fixou-se ao recipiente. Posteriormente, o sistema foi mergulhado num vaso de dissolução contendo 250 ml de solução tampão de fosfatos pH 7,4, a 37,0 ±0,5°C, e submeteu-se o sistema a uma agitação de 50 rpm. Posteriormente, recolheram-se alíquotas de 2,5 ml aos 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min, sem reposição de volume. As alíquotas foram recolhidas em balões de 25 ml e diluídas com tampão de fosfatos pH 7,4. As absorvâncias da cafeína libertada foram determinadas no espectrofotómetro UV/Vis, Jasco V650, a 273 nm.

Para determinar a quantidade de cafeína que foi libertada na microemulsão A/O/A e na nanodispersão S/O/A gelificadas recorreu-se à curva de calibração referida anteriormente na seção 2.2.3.4. Posteriormente, fez-se a diferença entre os valores das absorvâncias obtidos para as amostras da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A gelificadas com cafeína e os valores das absorvâncias obtidos para as respetivas amostras sem cafeína.

### 2.2.6. Análise estatística

Os resultados dos tamanhos das gotículas, do pH (amostras gelificadas e não gelificadas) e da textura foram analisados estatisticamente utilizando o teste F (para determinar se as variâncias eram iguais), seguido do Teste T-Student (bi-caudal) para avaliar a significância estatística de quaisquer diferenças nos valores médios apresentados. Toda a análise estatística foi efetuada no software Microsoft® Office Excel, usando um nível de significância de 95% ($\alpha = 0,05$).

# 3.Resultados e discussão

## 3.1. Caracterização das formulações

### 3.1.1. Tamanho das gotículas

Os tamanhos das gotículas da fase oleosa das microemulsões A/O/A e das nanodispersões S/O/A, com e sem cafeína, foram avaliados utilizando o Mastersizer 3000, sendo os resultados expressos na Tabela 8.

**Tabela 8:** Tamanho das gotículas da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A (apresentados sob a forma de percentis médios e dos respetivos coeficientes de variação) e valor de *Span.*

| | $D_{10}$ (µm) | CV (%) | $D_{50}$ (µm) | CV (%) | $D_{90}$ (µm) | CV (%) | *Span* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ME_B | 0,112 | 0 | **0,223** | 0 | 0,441 | 0,101 | 1,476 |
| ME | 0,024 | 0,229 | **0,121** | 0,693 | 0,699 | 0,412 | 5,591 |
| ND_B | 0,018 | 6,038 | **0,045** | 8,749 | 0,124 | 7,293 | 2,372 |
| ND | 0,020 | 0 | **0,051** | 0,256 | 0,140 | 0,784 | 2,359 |

**Legenda:** microemulsão A/O/A sem cafeína (ME_B), microemulsão A/O/A com cafeína (ME), nanodispersão S/O/A sem cafeína (ND_B), nanodispersão S/O/A com cafeína (ND).

No caso das microemulsões A/O/A, verifica-se que a microemulsão com cafeína (ME) apresenta um valor da mediana ($D_{50}$ = 0,121 µm) inferior ao da microemulsão sem cafeína (ME_B) ($D_{50}$ = 0,223 µm). Assim, é possível observar que a adição da cafeína ao sistema afetou este parâmetro, existindo diferenças significativas do ponto de vista estatístico ($p<0,01$) entre os valores do $D_{50}$ das microemulsões com e sem cafeína.

Em relação às nanodispersões S/O/A, pode-se observar que a nanodispersão com cafeína (ND) e sem cafeína (ND_B) apresentaram valores de mediana ligeiramente diferentes, $D_{50}$ = 0,051 µm e $D_{50}$ = 0,045 µm, respetivamente, verificando-se diferenças estatisticamente significativas (p= 0,027) entre os valores obtidos.

Segundo a literatura, quanto mais próximo de 1 estiver o valor de *Span*, mais estreita é a distribuição do tamanho das gotículas e, consequentemente, mais uniforme é o tamanho das gotículas (50). Por isso, quanto menor o valor de *Span*, mais uniforme é a amostra analisada.

Relativamente à ME_B, conclui-se que o valor de *Span* está próximo de 1 *(Span*=1,476) e, dessa forma, a amostra é considerada uniforme apresentando uma baixa dispersão dos

tamanhos das gotículas, enquanto a ME apresenta um valor de *Span* muito superior a 1 (*Span*=5,591), o que significa que a amostra é polidispersa, apresentando uma maior dispersão e uma menor uniformidade nos tamanhos das gotículas.

No caso das nanodispersões (ND_B e ND) verifica-se que apresentam um valor de *Span* muito semelhante entre si, 2,372 e 2,359, respetivamente, sendo um pouco superior a 1. Assim sendo, estes sistemas apresentam uma dispersão relativamente baixa dos tamanhos das gotículas.

Comparando os dois sistemas que têm presente o ingrediente ativo de interesse (ME e ND) pode-se observar que existem diferenças estatisticamente significativas ($p<0,01$) entre o tamanho das gotículas, uma vez que a ND apresenta um valor da mediana mais baixo ($D_{50}$ = 0,051 µm) que a ME ($D_{50}$ = 0,121 µm). Para além disso, 90% das gotículas da ND não são superiores a 0,140 µm enquanto na ME, este valor é muito mais alto ($D_{90}$ = 0,699 µm). Em relação ao valor de *Span*, verificou-se que a ND apresentou um valor mais próximo de 1 do que a ME, 2,359 e 5,591, respetivamente, o que indica que a ND é um sistema mais uniforme e com baixa dispersão no tamanho das gotículas, comparativamente à ME.

Após análise da Tabela 8, verifica-se que todas as formulações preparadas revelam a presença de 90% de gotículas com tamanhos na escala nanométrica, tal como pretendido. As microemulsões para serem consideradas estáveis devem apresentar um tamanho médio de gotícula compreendido entre 100 e 400 nm, aproximadamente (51). Neste caso, tanto a ME_B como a ME cumprem esse requisito, apresentando um valor da mediana de 0,223 µm e 0,121 µm, respetivamente. Os resultados obtidos são coerentes com o estudo realizado por outros autores (52) e que apresenta microemulsões com tamanhos de gotículas inferiores a 400 nm.

As nanodispersões para serem estáveis devem ter um tamanho médio de gotícula inferior a 500 nm (18), tendo-se verificado que a ND_B e a ND satisfazem esse critério, apresentando um valor da mediana de 45 nm e 51 nm, respetivamente. Num estudo realizado por Tahara *et al.* (26), também foram preparadas nanodispersões S/O com um tamanho médio de gotículas compreendido entre 200 e 300 nm destinadas à administração de proteínas. Noutro estudo realizado por Piao *et al.* (25), uma nanodispersão S/O utilizada para a administração transdérmica de diclofenac sódico apresentou tamanhos médios de gotícula de aproximadamente 15 nm, sendo estes resultados similares aos obtidos neste trabalho.

### 3.1.2. Determinação do pH

A medição do pH das microemulsões A/O/A com e sem cafeína e das nanodispersões S/O/A com e sem cafeína foi efetuada logo após a preparação, estando os resultados obtidos expressos na Tabela 9.

**Tabela 9:** Valores médios de pH e respetivos desvios padrão das várias formulações.

| | ME_B | ME | ND_B | ND |
|---|---|---|---|---|
| $pH_{Médio}$ | 8,87 | 8,80 | 7,21 | 7,20 |
| DP(%) | 0,01 | 0,02 | 0,04 | 0,05 |

Analisando a Tabela 9, verifica-se que os valores de pH obtidos para a ME_B e ME diferem pouco entre si, 8,87± 0,01 e 8,80 ± 0,02, respetivamente. Isto indica que a presença da cafeína afetou pouco o pH da formulação. Em relação à ND_B e ND, estas apresentaram valores de pH muito idênticos, 7,21 ± 0,04 e 7,20 ± 0,05, respetivamente, não havendo diferenças significativas ($p= 0,853$) o que indica que a presença de cafeína não afetou o pH do sistema.

As microemulsões apresentam uma composição muito semelhante às das nanodispersões (embora o método de preparação seja consideravelmente diferente), diferindo apenas num componente, a glicerina, que está presente somente nas nanodispersões. Comparando estes dois sistemas, constata-se que as microemulsões (ME_B e ME) apresentaram um valor de pH mais alto do que as nanodispersões (ND_B e ND), existindo diferenças significativas entre estes dois sistemas ($p<0,01$). As nanodispersões apresentaram um pH mais compatível com a pele, porém, este valor não é muito relevante uma vez que estas formulações não correspondem às preparações definitivas. Estes sistemas irão posteriormente ser gelificados, após adição de Carbopol e neutralização com trietanolamina.

### 3.1.3. Estabilidade acelerada por centrifugação

O estudo de estabilidade acelerada por centrifugação foi efetuado após a preparação das microemulsões A/O/A com e sem cafeína e das nanodispersões S/O/A com e sem cafeína, tendo as formulações sido submetidas a uma centrifugação a 3000 rpm, durante 30 min.

Nas Figuras 20 e 21 encontram-se representados os resultados do ensaio de estabilidade acelerada para as microemulsões A/O/A e nanodispersões S/O/A, respetivamente.

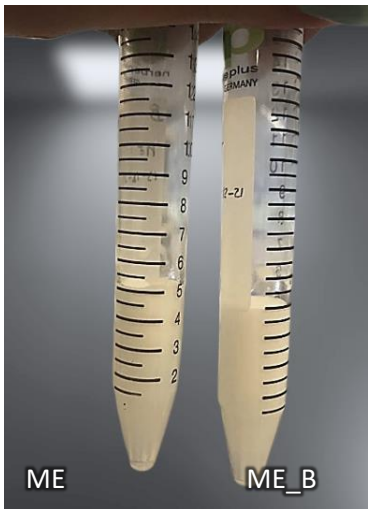



**Figura 20**:Aspeto das microemulsões A/O/A com (ME) e sem (ME_B) cafeína, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.




**Figura 21:** Aspeto das nanodispersões S/O/A com (ND) e sem (ND_B) cafeína, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

Analisando as imagens constata-se que ambas as amostras permanecem com o mesmo aspeto homogéneo verificado antes da centrifugação. Como não se observou separação de fases, precipitação, formação de grumos ou quaisquer outros sinais de instabilidade quando expostas a condições de força centrífuga excessiva, é possível prever que nenhuma das amostras apresentará instabilidade física a longo prazo.

Estes resultados são semelhantes aos descritos num outro estudo (45) em que após a centrifugação, todas as microemulsões preparadas permaneceram homogéneas e apresentaram uma boa estabilidade física.

### 3.1.4. Libertação *in vitro* da cafeína a partir da microemulsão e da nanodispersão

O perfil de libertação *in vitro* da cafeína a partir microemulsão e da nanodispersão foi avaliado utilizando o aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça) com pá agitadora, contendo 250 ml de solução tampão de fosfatos pH 7,4, a 37,0±0,5°C, utilizando 2,5 g de cada tipo de amostra.

Como já mencionado anteriormente, antes de se efetuar o ensaio de libertação *in vitro* da cafeína foi necessário realizar uma curva de calibração, para posteriormente usar a equação da reta para calcular o teor de cafeína presente nas formulações. Para obter a curva de calibração foram preparadas soluções padrão de cafeína em tampão de fosfatos pH 7,4 em concentrações compreendidas entre 2 µg/ml e 12 µg/ml, e lidas as respetivas absorvâncias a 273 nm. A representação gráfica dos valores da absorvância em função das concentrações das soluções padrão de cafeína é apresentada na Figura 22.

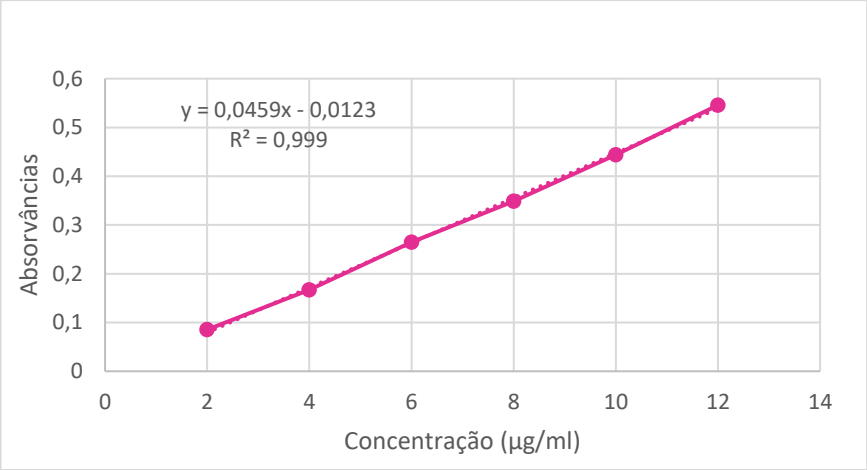



**Figura 22:** Gráfico da reta de calibração da cafeína em solução tampão de fosfatos pH 7,4.

O método de doseamento da cafeína por espectrofotometria UV/Vis revelou uma correlação linear para a gama de concentrações utilizadas, tendo sido obtido um valor do coeficiente de determinação ($R^2$) de 0,999, o que é indicativo de uma correlação satisfatória (45).

A concentração de cafeína libertada a partir das formulações ao longo de 3 horas foi determinada através da análise das absorvâncias das amostras recolhidas (lidas a 273 nm), tendo os valores finais das absorvâncias sido corrigidos de forma a eliminar a eventual interferência de outros componentes das formulações (descrito na secção 2.2.3.4).

Posteriormente, as concentrações foram calculadas utilizando a equação da reta obtida a partir da curva de calibração (Figura 22).

Na Figura 23 estão representados os perfis de libertação *in vitro* da cafeína no caso da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A ao longo de 3 horas de ensaio.

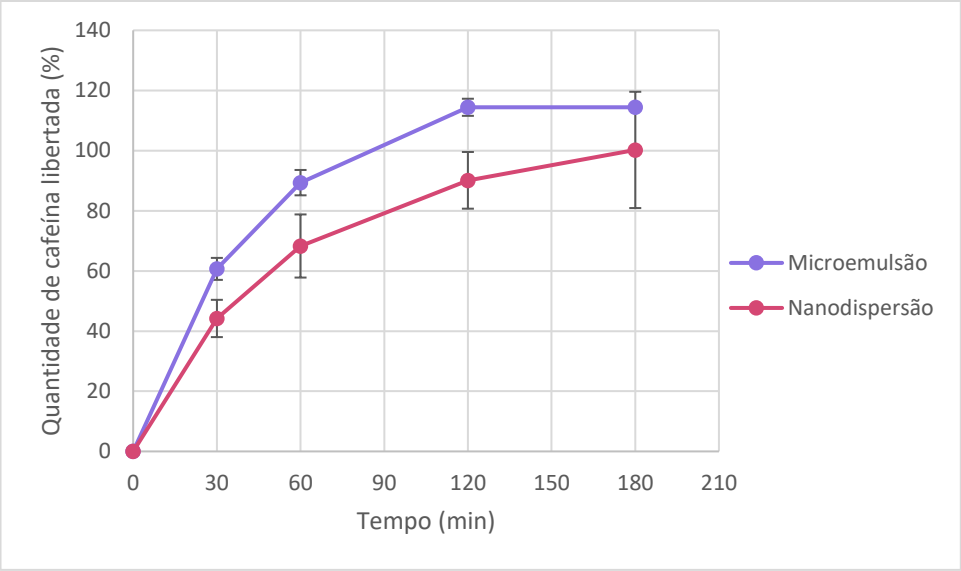



**Figura 23:** Perfil de libertação da cafeína em formulações não gelificadas.

Observando o gráfico da Figura 23, verifica-se que no caso da microemulsão A/O/A mais de metade da cafeína foi libertada nos primeiros 30 min de ensaio (aproximadamente 60%). Ao fim de 2 horas de ensaio, é possível constatar que houve uma libertação total da cafeína atingindo-se, assim, um *plateau*.

No caso da nanodispersão S/O/A, constata-se que nos primeiros 30 min de ensaio, foi libertada cerca de 40% da cafeína. Posteriormente, ao fim de 2 horas de ensaio, é possível constatar que a maioria da cafeína foi libertada, aproximadamente 90%, verificando-se que ao fim das 3 horas de ensaio a cafeína foi libertada na totalidade.

O facto de se verificar a libertação completa da cafeína ao fim de 3 horas é indicativo de que este ingrediente ativo teve de atravessar a fase hidrófoba intermédia constituída pelo miristato de isopropilo.

Comprando os perfis de libertação das duas formulações, verifica-se que a microemulsão A/O/A libertou mais rapidamente a cafeína do que a nanodispersão S/O/A. Isto é constatado logo a partir dos 30 min de ensaio. Além disso, a microemulsão A/O/A consegue libertar ao fim de 2 horas a totalidade da quantidade de cafeína enquanto a

nanodispersão necessita de 3 horas para o mesmo efeito. Estes resultados permitem concluir que a nanodispersão S/O/A demonstrou ser um sistema mais eficaz quando se pretende uma libertação mais prolongada da cafeína.

## 3.2. Caracterização das formulações gelificadas

### 3.2.1. Determinação do pH

O pH das microemulsões A/O/A gelificadas com e sem cafeína e das nanodispersões S/O/A gelificadas com e sem cafeína foi medido ao longo de 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente, sendo os resultados obtidos expressos no gráfico da Figura 24.

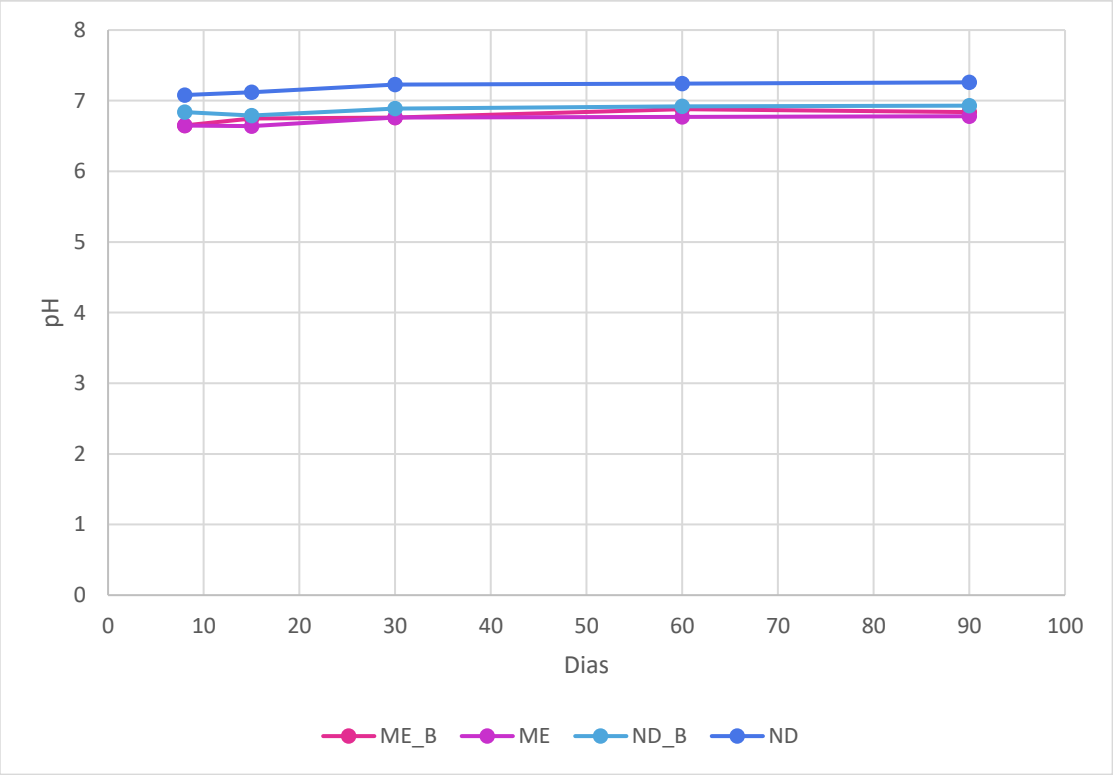



**Figura 24:** Valores de pH da ME_B, ME, ND_B e ND ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

Através do gráfico da Figura 24, é possível constatar que os valores de pH da ME_B oscilaram sempre ao longo do tempo. Já os valores de pH da ME, a ND_B e a ND foram oscilando apenas até aos 30 dias de armazenamento, observando-se que a partir desse momento, os valores mantiveram-se praticamente constantes.

Os valores de pH observados para a ME_B e a ME vão diferindo um pouco entre si ao longo do tempo, como se pode constatar principalmente ao fim de 15 e 60 dias, havendo,

nestes casos, diferenças estatisticamente significativas ($p<0,01$). Contudo, ao fim de 8, 30 e 90 dias de armazenamento, os valores de pH não apresentaram diferenças significativas ($p=0,866$, $p=0,815$ e $p=0,068$, respetivamente). Isto indica que a cafeína não provocou muitas alterações dado que na maioria das medições ao longo do tempo, a ME_B e a ME apresentaram valores de pH muito próximos.

Relativamente à ND_B e a ND constata-se que os valores de pH foram estatisticamente diferentes tanto aos 30 dias de armazenamento ($p<0,01$) como ao fim de 90 dias ($p<0,01$) indicando que a presença da cafeína provocou um ligeiro aumento no pH do sistema.

Comparando a ME com a ND, verifica-se que estes dois sistemas apresentaram diferenças estatisticamente significativas aos 30 dias ($p<0,01$) e aos 90 dias de armazenamento ($p<0,01$), porém ambos apresentaram um pH aceitável para a aplicação na pele.

Analisando os valores de pH da ME na primeira medição (ao fim de 8 dias) e na última medição (ao fim de 90 dias), é possível observar a existência de diferenças significativas ($p<0,01$), depreendendo-se que o sistema se alterou com o tempo. O mesmo se verifica com a ND, isto é, ocorreram diferenças estatisticamente significativas ao longo do tempo ($p<0,01$). Porém, apesar de se terem verificado, em ambos os casos, oscilações nos valores de pH nos primeiros 30 dias, posteriormente, os valores mantiveram-se constantes.

Resultados semelhantes foram obtidos num estudo (52) em que foi avaliado o pH de microemulsões múltiplas A/O/A com e sem albumina ao longo de 5 meses, tendo sido obtidos valores de pH próximos de 7, revelando ser compatíveis com a aplicação cutânea. Num outro estudo (53), em que foram avaliadas possíveis alterações de pH em nanodispersões gelificadas, ao longo de 7 meses de armazenamento, não foram reportadas diferenças significativas.

### 3.2.2. Avaliação da viscosidade

A avaliação da viscosidade das microemulsões A/O/A gelificadas e das nanodispersões S/O/A gelificadas foi realizada a 20°C e a 32°C conforme descrito na secção 2.2.5.2. Este ensaio foi realizado a estas duas temperaturas para poder analisar o comportamento das preparações quando armazenadas à temperatura ambiente (ensaio a 20°C) e quando aplicadas sobre a pele (ensaio a 32°C), uma vez que a temperatura média da pele de uma pessoa saudável em repouso, à temperatura ambiente, é de 31,7°C (54).

Na Figura 25 estão representados os gráficos da tensão de corte *versus* velocidade de corte a 20°C das microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME), ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

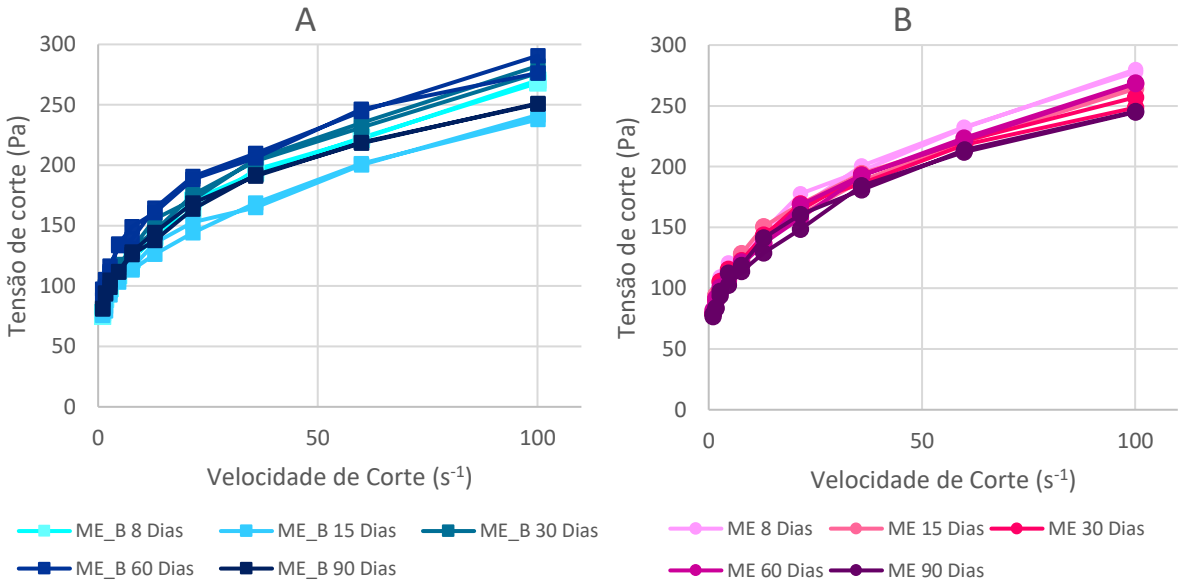



**Figura 25:** Reogramas a 20°C: A- microemulsão A/O/A gelificada sem cafeína (ME_B) e B- microemulsão A/O/A gelificada com cafeína (ME), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

No gráfico da Figura 25 pode observar-se que, tanto na ME_B (gráfico A) como na ME (gráfico B), os valores de tensão de corte a velocidades de corte mais elevadas variaram ligeiramente com o tempo. Na medição ao fim de 8 dias, a ME_B e a ME apresentaram valores de tensão de corte, a elevadas velocidades de corte, muito semelhantes, o mesmo se tendo verificado ao fim de 90 dias. De um modo geral, os resultados permitiram verificar que a presença da cafeína não alterou as características reológicas da microemulsão A/O/A.

Tanto a ME_B como a ME apresentaram comportamento não-Newtoniano, pseudoplástico ou reofluidificante com tensão de cedência, uma vez que a viscosidade aparente diminuiu com o aumento da velocidade de corte, mas a deformação só ocorreu após a aplicação de uma determinada tensão de corte. Além disso, estas preparações não apresentaram tixotropia nem anti-tixotropia uma vez que as curvas ascendentes e descendentes dos reogramas foram praticamente sobreponíveis.

Este comportamento é característico deste tipo de preparações, sendo estes resultados semelhantes aos obtidos num outro estudo (52), em que foi também observado que as microemulsões gelificadas apresentaram um comportamento pseudoplástico com tensão de cedência.

Na Figura 26 estão representados os gráficos da tensão de corte *versus* velocidade de corte a 20°C das nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

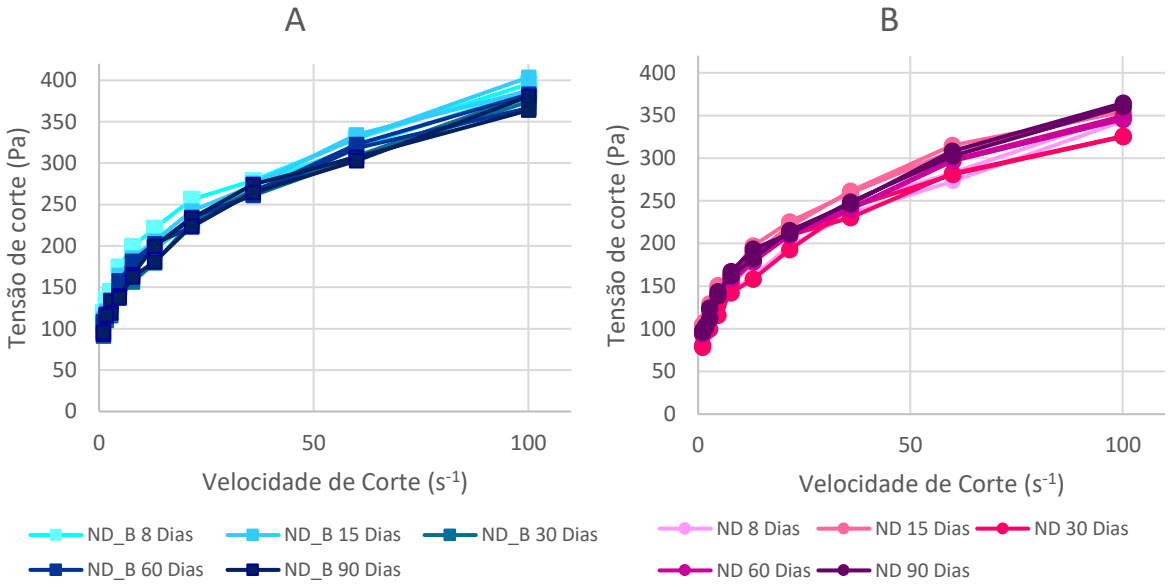



**Figura 26:** Reogramas a 20°C: A- nanodispersão S/O/A gelificada sem cafeína (ND_B) e B- nanodispersão S/O/A gelificada com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Analisando a Figura 26 observa-se que, de uma forma geral, a ND_B e a ND praticamente não apresentaram alterações reológicas ao longo do tempo de armazenamento. Comparando a ND_B com a ND ao longo dos 90 dias de armazenamento, verifica-se que para elevadas velocidades de corte, a ND_B apresentou valores de tensão de corte ligeiramente superiores à ND. Esta pequena diferença revela que a presença do ingrediente ativo provocou uma ligeira diminuição na viscosidade do sistema.

Tal como nas microemulsões (ME_B e ME), é possível verificar que com o aumento da velocidade de corte, a viscosidade aparente diminuiu, sendo que a deformação só ocorreu após a aplicação de uma determinada tensão de corte. Como tal, a ND_B e a ND também podem ser classificadas como fluidos não-Newtonianos com comportamento pseudoplástico ou reofluidificante com tensão de cedência. Além disso, estas preparações também apresentam as curvas ascendentes e descendentes praticamente sobreponíveis, não apresentando tixotropia nem anti-tixotropia.

Estes resultados são semelhantes aos resultados descritos num outro estudo (53), em que as preparações semissólidas baseadas em nanodispersões S/O/A também apresentaram comportamento pseudoplástico e sem tixotropia.

Na Figura 27 estão representados os gráficos da tensão de corte *versus* velocidade de corte a 32°C das microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME), ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

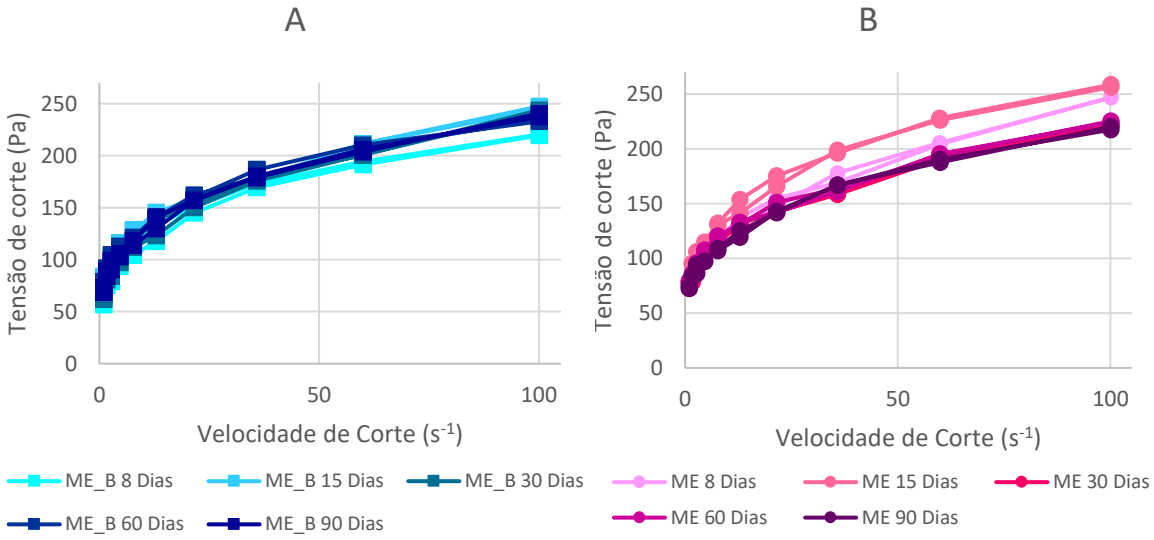



**Figura 27:** Reogramas a 32°C: A- microemulsão A/O/A gelificada sem cafeína (ME_B) e B- microemulsão A/O/A gelificada com cafeína (ME), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Na Figura 27 é possível observar que a ME_B (gráfico A) apresenta perfis praticamente sobreponíveis, não sendo afetada pelo tempo de armazenamento. No que concerne à ME (gráfico B), verifica-se que aos 90 dias de armazenamento os valores da tensão de corte e, por conseguinte, da viscosidade, diminuíram quando se atingiu a velocidade de corte mais elevada. Ao comparar estas duas preparações constata-se que os perfis reológicos não apresentam diferenças consideráveis pelo que a presença da cafeína não afetou o comportamento da microemulsão A/O/A a 32ºC.

A comparação da ME_B com a ME a 20°C e a 32°C permite verificar que, tal como era expectável, a 32ºC os valores da viscosidade foram ligeiramente mais baixos que a 20ºC, o que vai facilitar a aplicação. Além disso, o comportamento reológico reofluidificante com tensão de cedência e sem tixotropia manteve-se.

Na Figura 28 estão representados os gráficos da tensão de corte *versus* velocidade de corte a 32°C das nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

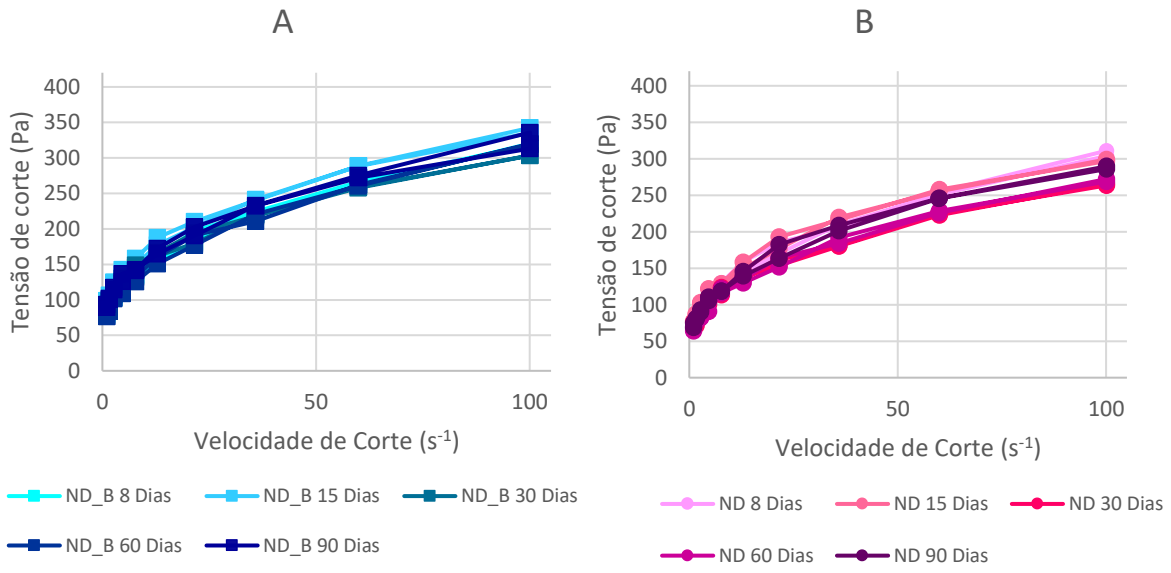



**Figura 28**: Reogramas a 32°C: A- nanodispersão S/O/A gelificada sem cafeína (ND_B) e B- nanodispersão S/O/A gelificada com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 8, 15, 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Analisando a Figura 28 observa-se que não há grandes variações nos perfis reológicos em função do tempo, tanto no caso da ND_B como da ND. Comparando estas duas preparações constata-se que a velocidades de corte mais elevadas, a ND apresenta valores ligeiramente mais baixos que a ND_B. Estes resultados indicam que a presença da cafeína apenas afetou ligeiramente a viscosidade do sistema.

A comparação da ND_B com a ND a 20°C e a 32°C permite verificar que a 32ºC a viscosidade aparente foi mais baixa, sendo mais fácil o seu espalhamento na pele, mas manteve-se o comportamento reológico reofluidificante com tensão de cedência e sem tixotropia.

Estes resultados podem ser comparados com o estudo realizado por Dwornicka *et al*.(55), no qual foi analisada a viscosidade a 20°C e a 32°C de cremes contendo 5% de cafeína, tendo sido observado que a 32°C a viscosidade das preparações semissólidas era menor.

Comparando os resultados das microemulsões A/O/A gelificadas com as nanodispersões S/O/A gelificadas verificou-se que apresentam um comportamento reológico semelhante, embora a velocidades de corte mais elevadas as microemulsões tenham apresentado valores de viscosidade aparente ligeiramente inferiores.

### 3.2.3. Avaliação da textura

A análise dos parâmetros de textura, isto é, a firmeza (aferida pelos valores da força máxima) e a adesividade (aferida pelos valores da área negativa) das microemulsões A/O/A gelificadas e das nanodispersões S/O/A gelificadas foi realizada a duas temperaturas, 20°C e 32°C, conforme descrito na secção 2.2.5.3. Este ensaio, tal como o anterior, foi realizado a estas duas temperaturas para poder analisar o comportamento das preparações quando armazenadas à temperatura ambiente (ensaio a 20°C) e quando aplicadas sobre a pele (ensaio 32°C).

Na Figura 29 estão representados os resultados da firmeza a 20°C das preparações gelificadas, aos 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

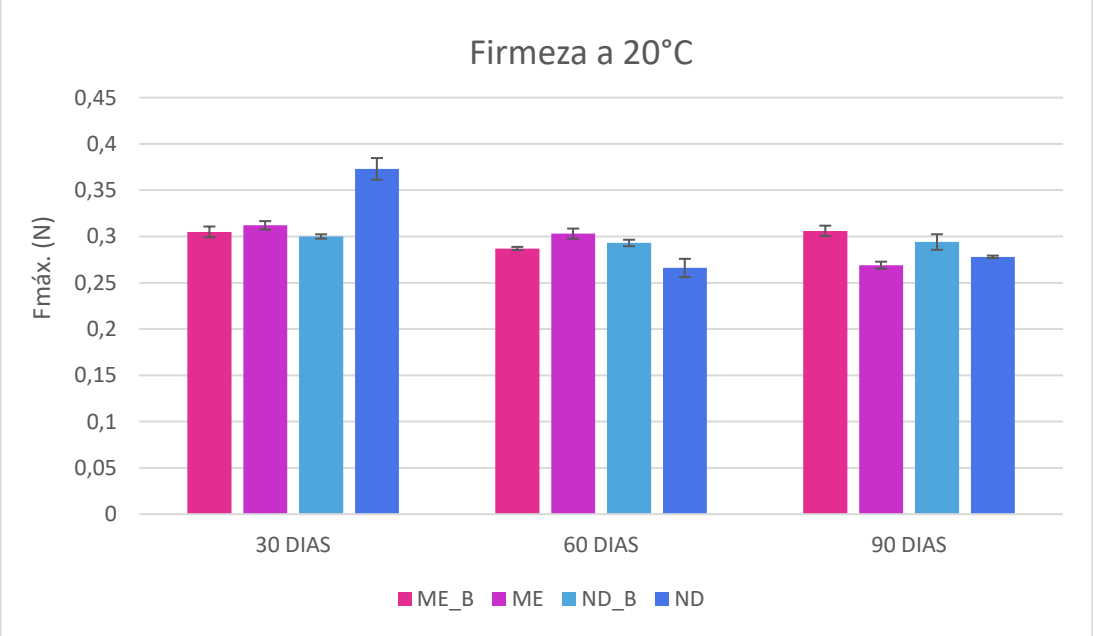



**Figura 29:** Resultados da firmeza a 20°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

O gráfico da Figura 29 mostra que a firmeza a 20°C das microemulsões A/O/A gelificadas (ME_B e ME) nos primeiros 30 dias de armazenamento não apresentaram diferenças significativas ($p=0,192$). Contudo, aos 60 e aos 90 dias, verificou-se que os valores de firmeza da ME_B basicamente mantiveram-se constantes, enquanto no caso da ME os valores foram diminuindo verificando-se diferenças estatisticamente significativas entre estas preparações ($p<0,01$). Estas diferenças indicam que a presença da cafeína provocou uma ligeira diminuição na firmeza do sistema.

Os valores da firmeza da ND_B mantiveram-se constantes ao longo do tempo, enquanto no caso da ND diminuíram com o tempo. Comparando as nanodispersões S/O/A gelificadas (ND_B e ND), constatou-se que apresentaram valores de firmeza estatisticamente diferentes entre si nos primeiros 30 dias de armazenamento ($p<0,01$). No entanto, com o decorrer do tempo de armazenamento essa diferença foi diminuindo, verificando-se que aos 90 dias os valores da firmeza da ND_B e da ND tenderam a igualar, não apresentando diferenças significativas ($p=0,092$). A presença da cafeína provocou uma diminuição acentuada na firmeza da nanodispersão S/O/A.

Comparando os valores de firmeza da ME com a ND, constatou-se que ao fim de 30 dias existiam grandes diferenças entre si, todavia, ao fim de 60 dias essas diferenças eram menores. Em ambas as situações se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p<0,01$). No entanto, aos 90 dias os valores de firmeza entre estas duas preparações foram praticamente semelhantes e, portanto, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas ($p=0,173$).

Tanto no caso da ME como da ND os valores da firmeza diminuíram ao longo do tempo de armazenamento, tendo apresentado diferenças significativas ($p<0,01$) entre os valores medidos aos 30 dias e os valores aos 90 dias.

Na Figura 30 estão representados os resultados da firmeza das preparações gelificadas, avaliados a 32°C, após 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente.

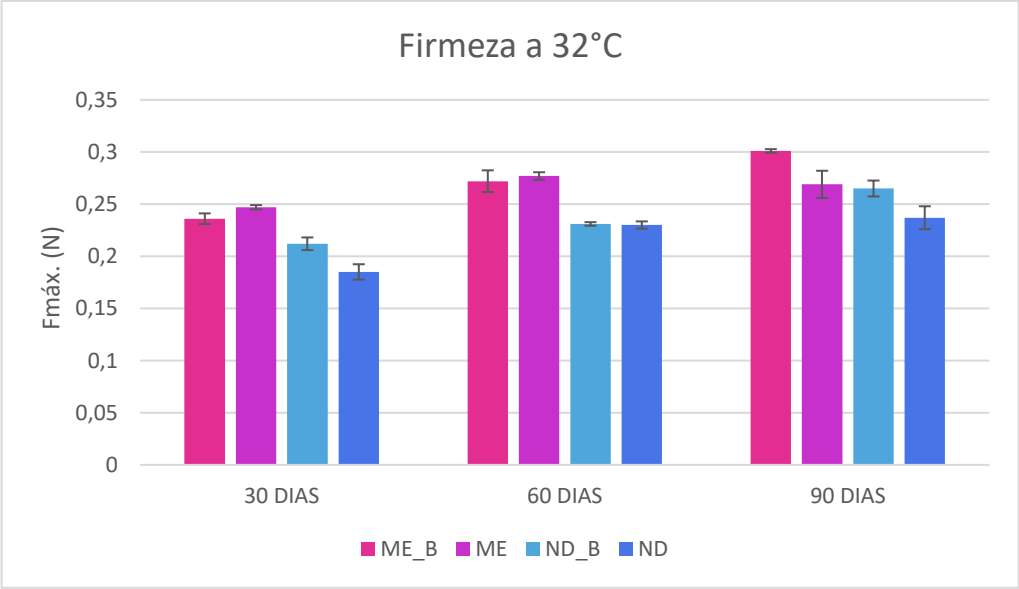



**Figura 30**: Resultados da firmeza a 32°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Observando o gráfico da Figura 30 verifica-se que os valores de firmeza a 32°C das microemulsões A/O/A gelificadas (ME_B e ME) aumentaram ao longo do tempo, provavelmente devido à evaporação da água da fase aquosa externa. A firmeza destas duas preparações aos 30 e aos 90 dias de armazenamento apresentaram diferenças significativas ($p=0,022$ e $p<0,01$, respetivamente), sendo os valores da ME mais baixos aos 90 dias, o que indica que a cafeína afetou a microemulsão A/O/A relativamente a este parâmetro.

Os valores de firmeza das nanodispersões S/O/A gelificadas (ND_B e ND) aumentaram ao longo do tempo, supostamente devido à evaporação da fase aquosa externa. Comparando ambas as preparações, observa-se que os valores da firmeza aos 30 e aos 90 dias de armazenamento apresentaram valores significativamente diferentes ($p<0,01$ e $p=0,024$, respetivamente). Neste caso também se verificou que a adição da cafeína provocou uma diminuição da firmeza do sistema.

Pela comparação da ME com a ND, constatou-se que estes dois sistemas apresentaram valores de firmeza estatisticamente diferentes desde os 30 dias até aos 90 dias de armazenamento ($p<0,01$ aos 30 e 60 dias, e $p=0,029$ aos 90 dias).

Analisando os resultados da avaliação da firmeza a 20°C e a 32°C, verificou-se que no caso da ME os valores de firmeza a 20°C são ligeiramente mais altos que a 32°C, em todas as medições ao longo dos 90 dias.

Relativamente à ND, ao comparar os valores de firmeza a 20°C e a 32°C observou-se que à temperatura de 20°C a ND apresentou valores de firmeza mais elevados do que a 32°C em todas as medições, sendo as diferenças estatisticamente significativas ($p<0,01$). Este resultado evidencia o efeito do aumento da temperatura na diminuição da firmeza deste tipo de preparações.

Os resultados da adesividade a 20°C das preparações gelificadas, aos 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente encontram-se representados na Figura 31.

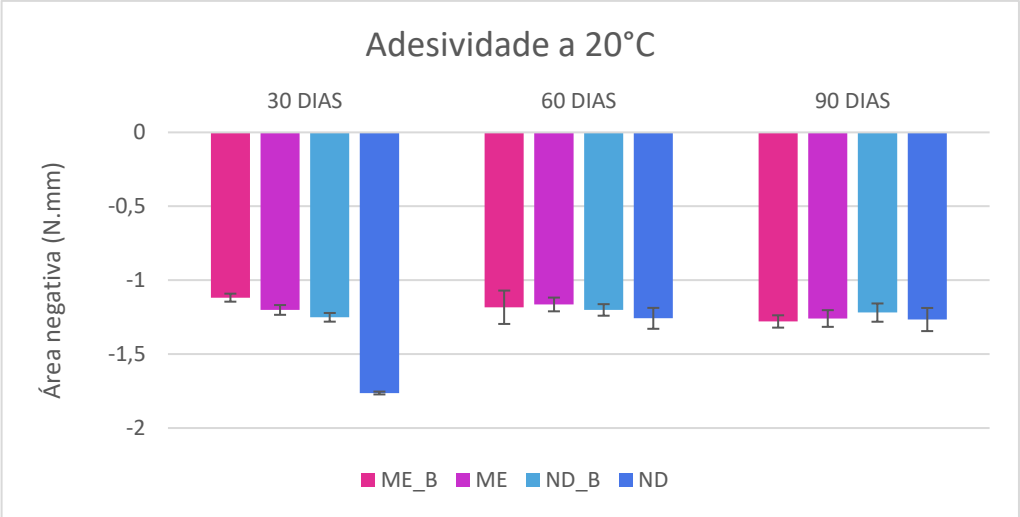



**Figura 31:** Resultados da adesividade a 20°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Pela análise dos resultados da Figura 31, é possível observar que a adesividade a 20°C das microemulsões A/O/A gelificadas (ME_B e ME) se manteve praticamente constante ao longo do tempo. À exceção dos primeiros 30 dias de armazenamento, os valores de adesividade da ME_B e da ME não apresentaram diferenças significativas ($p=0,801$ e $p=0,653$ aos 60 e aos 90 dias, respetivamente). Estes resultados demonstraram que a cafeína não teve qualquer impacto sobre a adesividade do sistema.

No que concerne à adesividade a 20°C das nanodispersões S/O/A gelificadas (ND_B e ND) verificou-se que os valores diminuíram com o tempo e que, à exceção dos primeiros 30 dias, não se verificaram diferenças significativas ($p=0,294$ e $p=0,463$ aos 60 e aos 90 dias, respetivamente) nos valores deste parâmetro relativos às preparações com e sem cafeína.

Comparando os valores de adesividade a 20°C da ME com os da ND observou-se que os valores são muito díspares na primeira medição (ao fim de 30 dias), revelando diferenças estatísticas significativas ($p<0,01$). Contudo, nas medições seguintes (ao fim de 60 e 90 dias), os valores de adesividade destas duas amostras não apresentaram diferenças significativas ($p=0,129$ e $p=0,906$, respetivamente).

Os resultados da adesividade a 32°C das preparações gelificadas, aos 30, 60 e 90 dias de armazenamento à temperatura ambiente encontram-se representados na Figura 32.

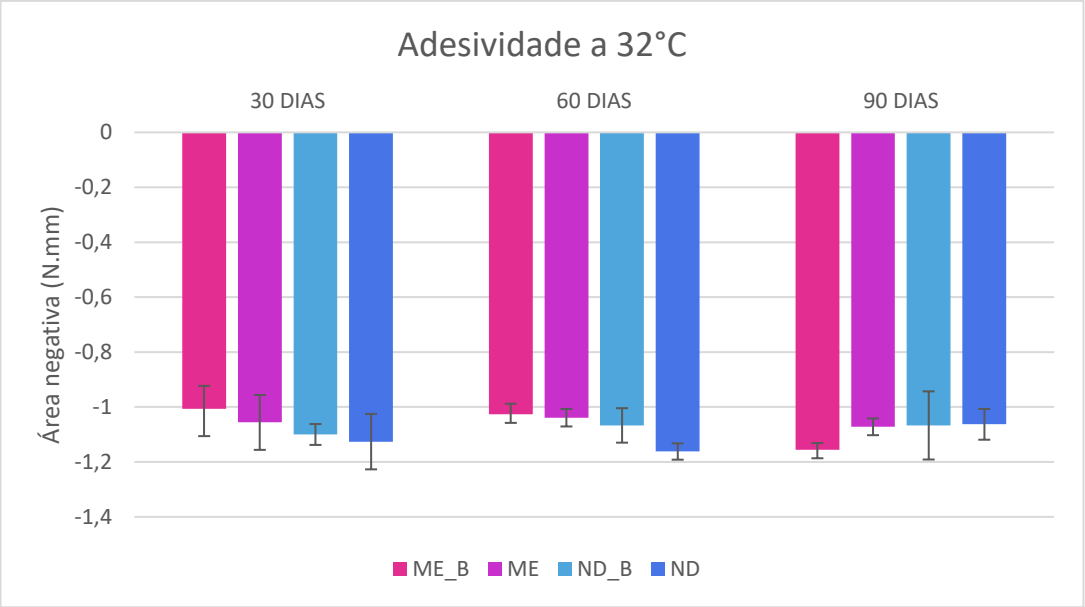



**Figura 32:** Resultados da adesividade a 32°C para as microemulsões A/O/A gelificadas sem cafeína (ME_B) e com cafeína (ME) e para as nanodispersões S/O/A gelificadas sem cafeína (ND_B) e com cafeína (ND), avaliadas ao fim de 30, 60 e 90 dias de armazenamento.

Ao analisar os resultados apresentados na Figura 32, observa-se que a adesividade a 32°C das microemulsões A/O/A gelificadas (ME_B e ME) aos 90 dias aumentou ligeiramente. Comparando os valores da adesividade da ME_B com a ME, verificou-se que aos 90 dias de armazenamento apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p=0,021$). Portanto, a presença da cafeína teve um ligeiro efeito na adesividade.

Relativamente à adesividade a 32°C das nanodispersões S/O/A gelificadas (ND_B e ND) verificou-se que os valores praticamente se mantiveram constantes, não se tendo observado diferenças estatísticas significativas entre as duas preparações ao fim de 90 dias ($p=0,694$, $p=0,077$ e $p=0,959$ aos 30, 60 e 90 dias, respetivamente). Assim, é possível inferir que a presença da cafeína não afetou o sistema.

Analisando os valores de adesividade a 32°C da ME com os da ND pode constatar-se que na primeira medição (ao fim de 30 dias) e na última (ao fim de 90 dias), estas duas preparações apresentam valores de adesividade semelhantes.

Comparando a adesividade a 20°C com a adesividade a 32°C verificou-se que no caso da ME, à exceção da medição aos 30 dias, os valores da adesividade a 32°C foram mais baixos que a 20°C. Assim, ao comparar a ME a estas duas temperaturas, ao fim de 90 dias observaram-se diferenças significativas ($p<0,01$), o que demonstra que, de um modo geral, a temperaturas mais elevadas os valores de adesividade são mais baixos.

Em relação à ND, ao comparar os valores de adesividade a 20°C com os valores a 32°C verificou-se que, à exceção da medição aos 60 dias, os valores de adesividade a 32°C ao fim de 90 dias são mais baixos que a 20°C, apresentando diferenças significativas ($p<0,01$ e $p=0,022$ aos 30 e aos 90 dias, respetivamente). Este resultado evidenciou que, também no caso da nanodispersão S/O/A, a temperaturas mais elevadas os valores da adesividade foram mais baixos.

De um modo geral, pode-se inferir que tanto nas microemulsões A/O/A gelificadas como nas nanodispersões S/O/A gelificadas verificou-se que a firmeza e a adesividade são menores a 32°C. Estes resultados são coerentes com os resultados da viscosidade apresentados na secção anterior, em que se observou também que a uma temperatura mais alta, as preparações são menos viscosas. Além disso, como os valores de firmeza e adesividade não são muito diferentes, comparando os dois tipos de formulações desenvolvidas neste trabalho, pode-se afirmar que ambas são adequadas para uma fácil remoção do recipiente de acondicionamento e a sua menor consistência à temperatura corporal facilita a aplicação na pele.

Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos num outro estudo (52) no qual foi também observado que as microemulsões gelificadas apresentaram uma menor firmeza e adesividade a temperaturas mais elevadas.

### 3.2.4. Estabilidade acelerada por centrifugação

De modo a prevenir eventuais alterações nas preparações gelificadas ao longo do tempo, realizou-se um ensaio de estabilidade acelerada. As microemulsões A/O/A gelificadas com e sem cafeína e as nanodispersões S/O/A gelificadas com e sem cafeína foram submetidas a centrifugação durante 30 min, a 3000 rpm, conforme descrito na secção 2.2.5.4.

Os resultados do ensaio de estabilidade acelerada para as microemulsões gelificadas e para as nanodispersões gelificadas encontram-se representados nas Figuras 33 e 34.




**Figura 33**:Aspeto das microemulsões A/O/A gelificadas, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.




**Figura 34**:Aspeto das nanodispersões S/O/A gelificadas, após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

Após a centrifugação verificou-se que as amostras tanto das microemulsões como das nanodispersões permanecem com o mesmo aspeto homogéneo constatado logo após a preparação. Tal como se pode constatar nas Figuras 33 e 34, não se visualizou separação de fases, precipitação, formação de grumos ou quaisquer outros sinais de instabilidade, demonstrando que são preparações estáveis quando submetidas a condições de força centrífuga excessiva.

Estes resultados foram também obtidos num estudo sobre microemulsões múltiplas (52) em que após centrifugação, todas as microemulsões múltiplas preparadas permaneceram homogéneas e apresentaram uma boa estabilidade física.

### 3.2.5. Teor de cafeína

Como referido anteriormente, antes de se proceder ao doseamento da cafeína foi necessário realizar uma curva de calibração, para posteriormente usar a equação da reta para calcular o teor de cafeína presente nas formulações. Para obter a curva de calibração foram preparadas soluções padrão de cafeína numa solução de NaCl 1% (m/v) em concentrações compreendidas entre 2 µg/ml e 20 µg/ml, e lidas as respetivas absorvâncias a 273 nm, sendo os resultados expressos no gráfico da Figura 35.

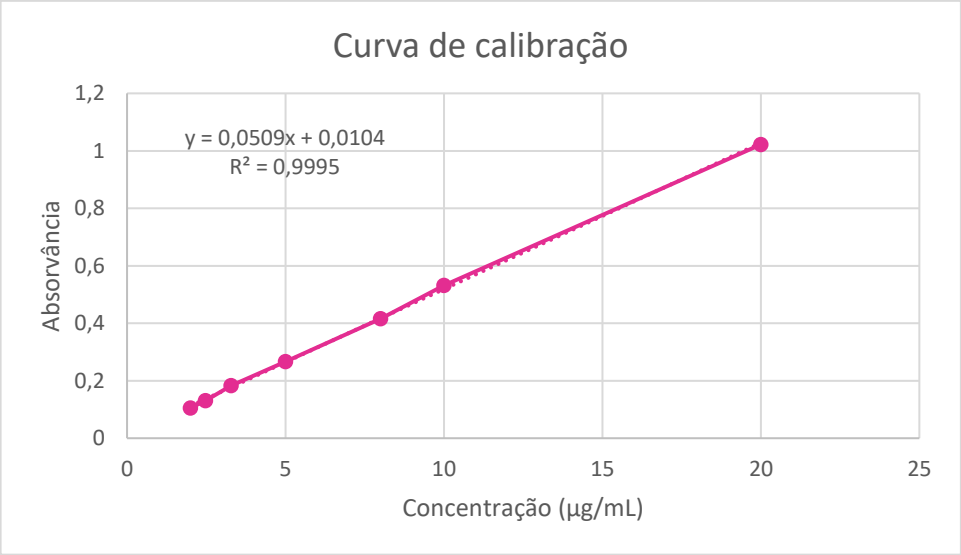



**Figura 35:** Curva de calibração dos padrões de cafeína em solução de NaCl 1%.

O método de doseamento da cafeína por espectrofotometria UV/Vis demonstrou apresentar uma correlação linear para a gama de concentrações analisadas, tendo sido obtido um valor do coeficiente de determinação ($R^2$) superior a 0,999, o que é indicativo de uma correlação satisfatória.

Todos os valores das absorvâncias obtidos para as preparações com cafeína foram corrigidos de forma a eliminar a interferência dos componentes que pudessem absorver no mesmo comprimento de onda que a cafeína (descrito na secção 2.2.5.5).

Verificou-se que ao fim de 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, a ME apresentou um decréscimo de 7,56% do teor de cafeína. Este resultado sugere que a molécula poderá ter sofrido uma ligeira degradação, revelando ser um pouco instável neste sistema. No caso da ND, não se verificou nenhuma alteração no teor de cafeína, indicando que esta não sofreu degradação ao fim de 30 dias e, como tal, revelou ser estável neste tipo de sistema.

Como a microemulsão A/O/A gelificada apresentou uma menor estabilidade química em relação à nanodispersão S/O/A, pode inferir-se que o tipo de sistema poderá ter tido influência na degradação da cafeína.

Num estudo realizado por Dwornicka *et al.* (55) é possível observar que estes autores também recorreram à espetrofotometria UV/VIS, num comprimento de onda de 273 nm para dosear a quantidade de cafeína presente nos cremes preparados. Neste estudo os autores verificaram que todas as preparações continham um teor de 100% de cafeína.

### 3.2.6. Libertação in vitro de cafeína a partir da microemulsão gelificada e da nanodispersão gelificada

O perfil de libertação *in vitro* da cafeína foi avaliado utilizando o aparelho de dissolução SOTAX AT7 (Suíça) com pá agitadora, contendo 250 ml de solução tampão de fosfatos pH 7,4, a 37,0±0,5°C, utilizando 2,5 g de microemulsão A/O/A gelificada e de nanodispersão S/O/A gelificada.

De forma a determinar a concentração de cafeína libertada das formulações ao longo de 5 horas, foi efetuada a análise das absorvâncias das amostras recolhidas (lidas a 273 nm), na qual os valores finais das absorvâncias foram corrigidos de forma a eliminar a interferência dos componentes (descrito na secção 2.2.5.6). Posteriormente, as concentrações foram calculadas utilizando a equação da reta da curva de calibração obtida anteriormente na secção 3.1.4.

Na Figura 36 estão representados os perfis de libertação *in vitro* da cafeína a partir da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A gelificadas, ao longo de 5 horas de ensaio.

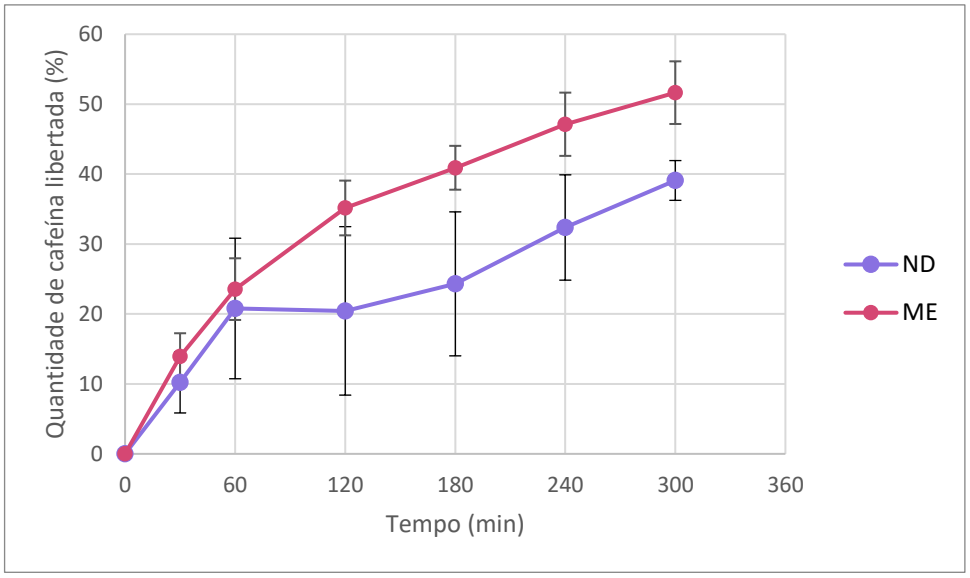



**Figura 36:** Perfis de libertação da cafeína a partir das formulações gelificadas.

Observando o gráfico da Figura 36, verifica-se que no caso da ME mais de 10% da cafeína foi libertada nos primeiros 30 min de ensaio. Ao fim de 2 horas de ensaio, é possível constatar que houve uma libertação de aproximadamente 35% da cafeína e que no fim das 5 horas de ensaio foi libertada cerca de 50% da cafeína.

No caso da ND, constata-se que nos primeiros 30 min de ensaio, foi libertada aproximadamente 10% da cafeína. Posteriormente, ao fim de 2 horas de ensaio, é possível observar que cerca de 20% da cafeína foi libertada, verificando-se que ao fim das 5 horas de ensaio foi libertado cerca de 40% deste ingrediente ativo.

Analisando os dois perfis de libertação é possível observar que na primeira hora de ensaio, ambas as formulações apresentam uma percentagem de libertação de cafeína semelhante (próximo de 20%). Contudo, a partir daí a ME revelou ser a preparação que libertou uma maior quantidade do ingrediente ativo. A ND necessitou de 5 horas para libertar 40% da cafeína, enquanto a ME apenas necessitou de 3 horas para libertar a mesma quantidade. A ME mostrou ser o sistema que libertou mais rapidamente a cafeina, e como tal, será o sistema mais adequado para uma ação mais rápida da cafeína, enquanto a ND poderá ter mais interesse caso se pretenda uma libertação mais prolongada.

Na Figura 37 está representada a comparação dos perfis de libertação *in vitro* da cafeína a partir da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A não gelificadas (referidas na secção 3.1.5) com os da microemulsão A/O/A e da nanodispersão S/O/A gelificadas.

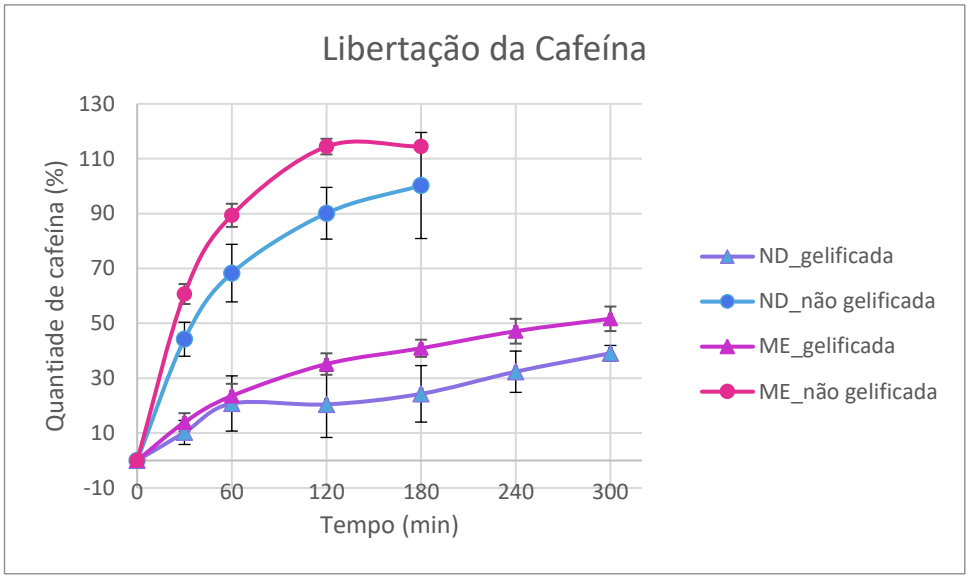



**Figura 37**: Comparação dos perfis de libertação da cafeína em formulações não gelificadas com as formulações gelificadas.

No gráfico da Figura 37 é possível verificar que as formulações não gelificadas libertaram muito mais rapidamente a cafeína que as formulações gelificadas. Isto pode ser observado logo nos primeiros 30 min, em que a ME e a ND não gelificadas libertaram aproximadamente 40% e 60%, respetivamente, enquanto a ME e a ND gelificadas apenas libertaram cerca de 10%. Além disso, a ME e a ND conseguem libertar na totalidade a quantidade de cafeína incorporada no sistema, necessitando de 2 horas no caso da ME e 3 horas no caso da ND. No entanto, as preparações gelificadas não conseguem libertar a totalidade da cafeína, ao fim de 5 h de ensaio, o que pode ser explicado pela presença do gelificante que confere viscosidade ao sistema e dificulta a libertação da cafeína. Em ambas as situações, a ME foi o sistema que revelou apresentar uma libertação mais rápida.

Num estudo realizado por Reis *et al.* (56) sobre a influência do sistema de libertação na permeação de uma molécula hidrofílica, estes autores usaram a cafeína como modelo, e constataram que em preparações semissólidas, a libertação deste ingrediente ativo é retardada devido à viscosidade do sistema, apresentando uma libertação mais rápida em soluções aquosas em relação ás preparações semissólidas. Os resultados obtidos neste trabalho estão, portanto, em concordância com os descritos por estes autores.

# 4.Conclusões

A nanotecnologia é uma área que tem sido amplamente utilizada na indústria da cosmética para melhorar a estabilidade e a eficácia dos seus produtos. Num produto cosmético apesar de ser fundamental o tipo de ingrediente ativo presente, também é importante a base em que o mesmo está inserido e o eventual nanossistema de transporte utlizado.

Na literatura científica existem vários estudos que comprovam uma melhor eficácia dos ingredientes ativos cosméticos incorporados em nanossistemas, como por exemplo, microemulsões e nanodispersões. Assim, dado que os nanossistemas têm, entre outras, a vantagem de promover a penetração cutânea dos ingredientes ativos, a sua utilização tem vindo a crescer ao longo dos anos.

Neste trabalho foram desenvolvidas microemulsões S/O/A gelificadas e nanodispersões S/O/A gelificadas, contendo cafeína, tendo em vista a sua utilização como anticelulíticos. Numa fase inicial foram preparadas e caracterizadas as microemulsões A/O/A e as nanodispersões S/O/A antes de serem gelificadas, tendo sido avaliado o tamanho das gotículas da fase oleosa, o pH, a estabilidade acelerada por centrifugação e a libertação *in vitro* da cafeína. No que se refere ao tamanho das gotículas, as nanodispersões apresentaram valores inferiores aos das microemulsões, e também foram as preparações que apresentaram o valor de *Span* mais próximo de 1, indicando que são sistemas com tamanhos de gotículas mais uniformes. As nanodispersões apresentaram também valores de pH mais compatíveis com a pele. Os estudos de estabilidade acelerada por centrifugação revelaram que as microemulsões e as nanodispersões são estáveis quando expostas à força gravítica utilizada neste ensaio. Em relação ao ensaio de libertação *in vitro* da cafeína, ambas as preparações libertaram a totalidade da cafeína ao fim de 3h, porém a microemulsão foi o sistema que libertou mais rapidamente.

Posteriormente, as preparações foram gelificadas com Carbopol® 980 NF e foram caracterizadas relativamente ao pH, comportamento reológico, textura, estabilidade acelerada por centrifugação, teor de cafeína e libertação *in vitro* da cafeína. No que diz respeito ao pH, as nanodispersões gelificadas apresentaram valores um pouco mais elevados que as microemulsões, porém ambas as preparações exibiram um pH compatível com a aplicação cutânea, o qual se manteve praticamente constante ao longo de 90 dias de armazenamento, evidenciando a estabilidade química das formulações desenvolvidas.

No que diz respeito à reologia, todas as preparações apresentaram comportamento reofluidificante com tensão de cedência e sem tixotropia, tanto a 20ºC como a 32ºC, o qual

se manteve praticamente sem alterações ao longo do tempo, indicando que as formulações são estáveis. No entanto, a microemulsão foi o sistema que apresentou valores mais baixos de tensão de corte e, por conseguinte, menor viscosidade aparente.

Quanto aos parâmetros de textura, firmeza e adesividade, as microemulsões e as nanodispersões gelificadas apresentaram valores mais baixos a 32°C do que a 20°C, tendo estes resultados sido concordantes com os resultados da viscosidade. No entanto, ambos os sistemas apresentaram uma consistência adequada para a remoção do recipiente de acondicionamento e espalhamento na pele.

Relativamente ao ensaio de estabilidade acelerada, as microemulsões e as nanodispersões gelificadas permaneceram com aspeto homogéneo, fazendo prever uma estabilidade física a longo prazo.

No que concerne ao teor de cafeína presente nas preparações gelificadas, a nanodispersão S/O/A não apresentou nenhuma alteração do valor de cafeína ao fim de 30 dias. Já a microemulsão A/O/A revelou uma ligeira diminuição do teor de cafeína ao fim de 30 dias, podendo ser indicativo da ocorrência de degradação.

O ensaio de libertação *in vitro* da cafeína demonstrou que ao fim de 5 horas nenhuma das preparações gelificadas libertou a totalidade da cafeína, sendo a microemulsão o sistema que libertou maior quantidade. Comparando com as preparações não gelificadas verificou-se, como era expectável, que a presença do agente gelificante retardou a libertação da cafeína, permitindo uma ação mais prolongada. De um modo geral, a nanodispersão S/O/A apresentou uma libertação mais lenta da cafeína do que a microemulsão A/O/A.

Os estudos *in vitro* possibilitam a previsão do comportamento das preparações cosméticas *in vivo*, permitindo reduzir a realização de ensaios em voluntários, seguindo, deste modo, os princípios da declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial. Contudo, para que um produto cosmético seja introduzido no mercado, é fundamental a realização de ensaios em voluntários. Assim, num trabalho futuro seria pertinente considerar a hipótese de testar a microemulsão A/O/A e a nanodispersão S/O/A em voluntários, de modo a avaliar as propriedades da cafeina incorporada nas formulações semissólidas desenvolvidas neste trabalho com a finalidade de reduzir a celulite.

Em suma, os resultados deste trabalho permitiram concluir que, de um modo geral, ambas as formulações desenvolvidas demonstraram ser estáveis, com pH compatível com a pele, bem como comportamento reológico e textura adequadas. Apesar de a nanodispersão S/O/A gelificada ter apresentado maior estabilidade química, a

microemulsão A/O/A apresentou uma libertação mais rápida da cafeína. No entanto, ambas poderão constituir sistemas promissores para promover a penetração cutânea da cafeína.

## 5.Referências Bibliográficas


1. Lai F, Caddeo C, Manca ML, Manconi M, Sinico C, Fadda AM. What's new in the field of phospholipid vesicular nanocarriers for skin drug delivery. International Journal of Pharmaceutics. 2020;583:119398.
2. Parhi R, Suresh P, Mondal S, Kumar PM. Novel Penetration Enhancers for Skin Applications: A Review. Current drug delivery. 2011;9:219-30.
3. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, Skin. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
4. Nafisi S, Maibach HI. Chapter 3 - Skin penetration of nanoparticles. In: Shegokar R, Souto EB, editors. Emerging Nanotechnologies in Immunology. Boston: Elsevier; 2018. p. 47-88.
5. Skin layers [Internet]. Disponível em: https://medlineplus.gov/ency/imagepages/8912.htm [acedido em 10/11/2021].
6. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.
7. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. Drug Deliv Transl Res. 2021:1-34.
8. Dąbrowska AK, Rotaru GM, Derler S, Spano F, Camenzind M, Annaheim S, et al. Materials used to simulate physical properties of human skin. Skin Res Technol. 2016;22(1):3-14.
9. Vinay Mishra SB. Transdermal Drug Delivery System- A Total View. 2011.
10. Lane ME. Skin penetration enhancers. International Journal of Pharmaceutics. 2013;447(1):12-21.
11. Kováčik A, Kopečná M, Vávrová K. Permeation enhancers in transdermal drug delivery: benefits and limitations. Expert Opin Drug Deliv. 2020;17(2):145-55.
12. Silva JA, Apolinário A, Souza MSR, Damasceno B, Medeiros AC. Cutaneous administration of drugs: Challenges and strategies for the development of transdermal formulations. Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada. 2010;31.
13. Katz LM, Dewan K, Bronaugh RL. Nanotechnology in cosmetics. Food Chem Toxicol. 2015;85:127-37.
14. Vogt A, Wischke C, Neffe AT, Ma N, Alexiev U, Lendlein A. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin - Do existing technologies match clinical challenges? J Control Release. 2016;242:3-15.

15. Europeia C. Comunicação da Comissão ao Parlamento Europeu, ao Conselho e ao Comité Económico e Social Europeu [Disponível em: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:52012DC0572&from=ES [acedido em 21/11/2022].
16. Callender SP, Mathews JA, Kobernyk K, Wettig SD. Microemulsion utility in pharmaceuticals: Implications for multi-drug delivery. Int J Pharm. 2017;526(1-2):425-42.
17. Tartaro G, Mateos H, Schirone D, Angelico R, Palazzo G. Microemulsion Microstructure(s): A Tutorial Review. Nanomaterials (Basel). 2020;10(9).
18. Kitaoka M, Wakabayashi R, Kamiya N, Goto M. Solid-in-oil nanodispersions for transdermal drug delivery systems. Biotechnol J. 2016;11(11):1375-85.
19. Lakshmi JA, Kumar BA, Gupta S, editors. Investigation of Microemulsion as a Potential Carrier for Advanced Transdermal Delivery: An Overview2013.
20. Mcclements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. Soft Matter. 2012;8:1719-29.
21. Lawrence MJ, Rees GD. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. Adv Drug Deliv Rev. 2000;45(1):89-121.
22. Zhu W, Guo C, Yu A, Gao Y, Cao F, Zhai G. Microemulsion-based hydrogel formulation of penciclovir for topical delivery. Int J Pharm. 2009;378(1-2):152-8.
23. Butani D, Yewale C, Misra A. Amphotericin B topical microemulsion: Formulation, characterization and evaluation. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2014;116:351-8.
24. Tahara Y, Kamiya N, Goto M. Solid-in-oil dispersion: a novel core technology for drug delivery systems. Int J Pharm. 2012;438(1-2):249-57.
25. Piao H, Kamiya N, Hirata A, Fujii T, Goto M. A novel solid-in-oil nanosuspension for transdermal delivery of diclofenac sodium. Pharm Res. 2008;25(4):896-901.
26. Tahara Y, Honda S, Kamiya N, Piao H, Hirata A, Hayakawa E, et al. A solid-in-oil nanodispersion for transcutaneous protein delivery. J Control Release. 2008;131(1):14-8.
27. Wakabayashi R, Sakuragi M, Kozaka S, Tahara Y, Kamiya N, Goto M. Solid-in-Oil Peptide Nanocarriers for Transcutaneous Cancer Vaccine Delivery against Melanoma. Molecular Pharmaceutics. 2018;15(3):955-61.
28. Cosméticos PI. Quais os ingredientes de um anticelulítico? Disponível em: https://portalinfocosmeticos.pt/produtos/quais-os-ingredientes-de-um-anticelulitico/ [acedido em 20/07/2022].
29. Friedmann DP, Vick GL, Mishra V. Cellulite: a review with a focus on subcision. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2017;10:17-23.
30. Luebberding S, Krueger N, Sadick NS. Cellulite: An Evidence-Based Review. American Journal of Clinical Dermatology. 2015;16(4):243-56.
31. Nürnberger F, Müller G. So-called cellulite: an invented disease. J Dermatol Surg Oncol. 1978;4(3):221-9.

32. Sadick N. Treatment for cellulite. International Journal of Women's Dermatology. 2019;5(1):68-72.
33. Turati F, Pelucchi C, Marzatico F, Ferraroni M, Decarli A, Gallus S, et al. Efficacy of cosmetic products in cellulite reduction: systematic review and meta-analysis. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014;28(1):1-15.
34. Roure R, Oddos T, Rossi A, Vial F, Bertin C. Evaluation of the efficacy of a topical cosmetic slimming product combining tetrahydroxypropyl ethylenediamine, caffeine, carnitine, forskolin and retinol, In vitro, ex vivo and in vivo studies. Int J Cosmet Sci. 2011;33(6):519-26.
35. Herman A, Herman AP. Caffeine's mechanisms of action and its cosmetic use. Skin Pharmacol Physiol. 2013;26(1):8-14.
36. Shakeel F, Ramadan W. Transdermal delivery of anticancer drug caffeine from water-in-oil nanoemulsions. Colloids Surf B Biointerfaces. 2010;75(1):356-62.
37. Caffeine [Internet]. 2022. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Caffeine [acedido em 10/02/2022].
38. Infarmed. Cosméticos Disponível em: https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos [acedido em 09/06/2022].
39. Mustapha RB, Lafforgue C, Fenina N, Marty JP. Influence of drug concentration on the diffusion parameters of caffeine. Indian J Pharmacol. 2011;43(2):157-62.
40. Buchi. Rotavapor® R-100 Manual de instruções Disponível em: https://assets.buchi.com/image/upload/v1605799597/pdf/Operation-Manuals/OM_11593795_R-100_ptb.pdf [acedido em 20/06/2022].
41. Ltd MP. Laser Diffraction Disponível em: https://www.malvernpanalytical.com/en/products/technology/light-scattering/laser-diffraction [acedido em 20/06/2022].
42. Panalytical M. A basic guide to particle characterization Disponível em: https://www.malvernpanalytical.com/en/learn/knowledge-center/Whitepapers/WP120620BasicGuidePartChar.html [acedido em 10/02/2022].
43. Zaidi k. 429 Light Diffraction Measurement of Particle Size. USP29–NF24 Disponível em: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c429.html [acedido em 19/06/2022].
44. Krambeck K. Desenvolvimento de Preparações Cosméticas contendo Vitamina C Faculdade de Fármacia da Universidade do Porto; 2009.
45. Santos PS. Desenvolvimento e caracterização de microemulsões e microemulgeles contendo ibuprofeno: Faculdade de Fármacia da Universidade do Porto; 2015.

46. Abels C, Reich H, Knie U, Werdier D, Lemmnitz G. Significant improvement in mild acne following a twice daily application for 6 weeks of an acidic cleansing product (pH 4). J Cosmet Dermatol. 2014;13(2):103-8.
47. Prista LN, Alves AC, Morgado R. Tecnologia farmacêutica. 7ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2008.
48. Tichota DM, Silva AC, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. Int J Nanomedicine. 2014;9:3855-64.
49. Almeida HEPPdJ. Aplicação de polímeros sensíveis a estímulos em sistemas de libertação modificada de fármacos para uso oftálmico: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2015.
50. Teeranachaideekul V, Souto EB, Junyaprasert VB, Müller RH. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. Eur J Pharm Biopharm. 2007;67(1):141-8.
51. Souto EB, Cano A, Martins-Gomes C, Coutinho TE, Zielińska A, Silva AM. Microemulsions and Nanoemulsions in Skin Drug Delivery. Bioengineering (Basel). 2022;9(4).
52. Gomes CS. Sistemas baseados em microemulsões para a administração cutânea de proteínas: Faculdade de Fármacia da Universidade do Porto; 2020.
53. Eiras FRL. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e do potencial irritativo de formulações cosméticas à base de nanopartículas lipídicas Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2016.
54. Price MJ, Trbovich M. Chapter 50 - Thermoregulation following spinal cord injury. In: Romanovsky AA, editor. Handbook of Clinical Neurology. 157: Elsevier; 2018. p. 799-820.
55. Dwornicka D, Wojciechowska K, Zun M, Kasperek R, Swiader K, Szumilo M, et al. The inflluence of emulsifiers on physical properties and release parameters of creams with caffeine. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2015;28:81-4.
56. Reis C, Carvalho P, Cangueiro M, Fernandes C, Rosado C. Influência do sistema de libertação na permeação de uma molécula hidrofílica. 2010.