



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Nanoemulsão contendo óleo fixo de tucumã
(*Astrocaryum vulgare* Mart.): desenvolvimento de
um produto cosmético inovador para a pele**

Fernanda Borges de Almeida

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

**Araraquara – SP
2021**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Nanoemulsão contendo óleo fixo de tucumã
(*Astrocaryum vulgare* Mart.): desenvolvimento de um
produto cosmético inovador para a pele**

Fernanda Borges de Almeida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac

**Araraquara – SP
2021**

A447n Almeida, Fernanda Borges de.
Nanoemulsão contendo óleo fixo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): desenvolvimento de um produto cosmético inovador para a pele / Fernanda Borges de Almeida. – Araraquara: [S.n.], 2021.

132 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. *Astrocaryum vulgare*. 2. Óleo de tucumã. 3. Nanoemulsão. 4. Antioxidante. 5. Melasma. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Nanoemulsão contendo óleo fixo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): desenvolvimento de um produto cosmético inovador para a pele.

AUTORA: FERNANDA BORGES DE ALMEIDA

ORIENTADORA: VERA LUCIA BORGES ISAAC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. VERA LUCIA BORGES ISAAC (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof^o. Dr^a. TERESA MARIA GARRIGUES PELUFO (Participação Virtual)
University of Valencia

Prof^a. Dr^a. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Centro Universitário de Araraquara-UNIARA

Araraquara, 01 de fevereiro de 2021

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Lígia e Ricardo, por me ensinarem o enorme valor da leitura e do estudo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Lúgia e Ricardo, e irmãos Bernardo, Gustavo e Alexandre por todo apoio, incentivo, companheirismo e amor incondicional.

Às minhas cunhadas Cinthia, Thaylla e Katita por toda a amizade e incentivo.

À minha sobrinha Clara, por tornar a minha vida mais leve e feliz, com o seu sorriso de quatro dentinhos.

Aos meus avós Walter (*in memoriam*) e Aurea, por me ensinarem que os momentos mais importantes da vida são os vividos com amor, de maneira despretensiosa.

Aos meus tios, Rogério e Maria; aos meus padrinhos, Eduardo e Marcia e à minha afilhada Gabriela, por todo o incentivo.

À minha tia-avó Vilma, por todo carinho, conselhos e amor comigo.

Às minhas amigas da vida, Karine, Paula e Luiza, por estarem sempre ao meu lado, em todos os momentos.

Aos amigos da graduação, Carol, Maíra, Kemes, Amandinha, Talita, Clarice, Dani, Paulinha, Desirane, Hérica, Naima e Jonatas, por me ensinarem tanto sobre companheirismo, não importando a distância física entre nós.

Aos amigos da UNESP, Amanda Silvestre, Bruna Furquim, Bruno Fonseca, Leonardo Di Filippo, Suzana Carvalho e Victor Hugo Araujo, por tornarem os dias na pós-graduação e a vida em Araraquara mais leve e engraçada.

Às alunas do LaCos, em especial à Bruna Kauffmann, Laís Roveri e Isabela Rueda por toda ajuda, conversas, risadas, cafés e infinitas horas compartilhadas no laboratório.

Ao Professor Dr. Marcos Corrêa, por sempre estar disponível para sanar dúvidas e compartilhar seu enorme conhecimento sobre cosmetologia.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Vera Isaac, que me recebeu de braços abertos no LaCos e se tornou muito mais que uma orientadora, mas uma conselheira e amiga. Muito obrigada por acreditar e confiar em mim.

Aos membros das bancas examinadoras de qualificação Prof. Dr. Marcos Corrêa e Prof. Dr. Marcio Ferrari, e de defesa, Prof.^a Dr.^a Teresa Garrigues e Prof.^a Dr.^a Bruna Chiari-Andréo, por avaliarem este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Aos funcionários e prestadores de serviço da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, em especial à Ilza Yogui, por todo apoio e dedicação em ajudar a todo o momento.

À Praid pela doação dos tensoativos utilizados na pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da bolsa de pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro à pesquisa.

Obrigada!

EPÍGRAFE

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

Astrocaryum vulgare Mart é uma espécie de palmeira nativa e não endêmica do Brasil, pertence à família Arecaceae e é popularmente conhecida como tucumã. O óleo fixo de frutos de *A. vulgare* possui, em sua composição química, diversos carotenóides, responsáveis por conferir a sua coloração alaranjada, sendo o β -caroteno, o majoritário, além de ácidos graxos e fitosteróis. As substâncias encontradas no óleo fixo de *A. vulgare* são de classes com atividades biológicas importantes; porém, de características lipofílicas, o que dificulta a sua utilização em muitos produtos de matriz aquosa. Nesse contexto, a obtenção de sistemas nanoestruturados é uma excelente estratégia para solucionar esse problema. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma nanoemulsão, contendo óleo fixo de frutos de *A. vulgare*, por método de baixo aporte de energia. Para isso, foi determinado o teor de β -caroteno presente no óleo, avaliada a atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, e frente à inibição da oxidação lipídica do sistema β -caroteno/Ácido linoleico, avaliada a atividade inibitória da enzima tirosinase, determinado o valor de EHLr da fase oleosa da formulação, avaliada a influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação, determinada a região de formação de nanoemulsão no diagrama pseudoternário e avaliada a estabilidade da nanoemulsão escolhida, por 90 dias. O óleo de *A. vulgare* possui um teor de 272,67 mg de β -caroteno por grama de óleo. O EC₅₀ para o radical DPPH[•] foi de 0,676 mg/mL, o TEAC para o radical ABTS^{•+} foi de 908,29 μ M Trolox/mg de óleo e o percentual de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/Ácido linoleico foi de 47,36%. A enzima tirosinase foi 96,94% inibida na primeira hora e 99,33% na segunda hora de análise. O EHLr da fase oleosa foi determinado como 14 e o melhor par de tensoativo foi PPG-5-Ceteth-20 e Sorbitan Oleate, obtendo-se uma nanoemulsão estável com tamanho médio de gotícula de 174,1 nm, PDI de 0,295 e potencial zeta de 20,7 mV, em módulo. Dessa maneira, o óleo fixo de *A. vulgare* possui potencial na redução do melasma na pele. Além disso, a nanoemulsão apresenta um potencial no uso como nanocosmético verde, visto que sua produção utiliza métodos de baixo aporte de energia, sem aquecimento e sem uso de solventes orgânicos.

Palavras-chave: *Astrocaryum vulgare*; óleo de tucumã; nanoemulsão; antioxidante; melasma.

ABSTRACT

Astrocaryum vulgare Mart is a species of palm native and not endemic from Brazil, belonging to the Arecaceae family, it is popularly known as tucumã. The fixed oil of *A. vulgare* fruits has in its chemical composition several carotenoids, responsible for giving its orange color, with β -carotene being the major factor besides fatty acids and phytosterols. The compounds found in the fixed oil of *A. vulgare* are from classes with important biological activities; however, with lipophilic characteristics, which makes it difficult to use in many aqueous matrix products. In this context, obtaining nanostructured systems is an excellent strategy to solve this problem. The aim of this work was to develop a nanoemulsion containing fixed oil from *A. vulgare* fruits using a low energy method. For this, the content of β -carotene present in the oil was determined, the antioxidant activity was evaluated against the radicals DPPH $^{\bullet}$, ABTS $^{+\bullet}$ and against of inhibition of lipidic oxidation of β -carotene/Linoleic acid system, the inhibitory activity of the tyrosinase enzyme was evaluated, the HLB_r value of the oil phase of the formulation was determined, evaluated at influence of different surfactants on the nanoemulsification, the region of formation of the nanoemulsion in the pseudo ternary diagram was determined and the stability of the chosen nanoemulsion for 90 days was evaluated. *A. vulgare* oil has a content of 272.67 mg of β -carotene per gram of oil. The EC₅₀ for the DPPH $^{\bullet}$ radical was 0.676 mg/mL, the TEAC for the ABTS $^{+\bullet}$ radical was 908.29 μ M Trolox/mg of oil and the percentage of oxidation inhibition was 47.36%. The tyrosinase enzyme was 96.94% inhibited in the first hour and 99.33% in the second hour of analysis. The HLB_r of the oil phase was determined to be 14 and the best surfactant pair was PPG-5-Ceteth-20 and Sorbitan Oleate, obtaining a stable nanoemulsion with an average droplet size of 174.1 nm, PDI of 0.295 and zeta potential of 20.7 mV, in module. In this way, the nanoemulsion containing fixed oil of *A. vulgare* has great potential for reducing melasma on the skin. Moreover, the nanoemulsion has a potential for use as a green nanocosmetic, since its production uses low energy input methods, without heating and without using organic solvents.

Keywords: *Astrocaryum vulgare*; tucumã oil; nanoemulsion; antioxidant; melasma.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABTS ^{•+}	Radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AI%	Atividade inibitória percentual
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DPPH [•]	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo
EHLr	Equilíbrio Hidrófilo-lipófilo requerido
FORM	Formulação
mV	Milivolts
nm	Nanômetro
OT	Óleo de <i>A. vulgare</i>
P4DO	PEG 4 Dioleate
P4MO	PEG 4 Oleate
P6DO	PEG 6 Dioleate
P6MO	PEG 6 Oleate
PAWS	PPG-5-Ceteth-20
PDI	Índice de polidispersão
PIP	Isopropyl Palmitate
S80	Sorbitan Oleate
S85	Sorbitan Trioleate
T20	Polysorbate 20
T40	Polysorbate 40
T60	Polysorbate 60
T80	Polysorbate 80
T85	Polysorbate 85
Tenso	Tensoativo

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1.	Substâncias mais utilizadas na redução do melasma na pele e seus mecanismos de ação (RENDON et al., 2006; SARKAR et al., 2014).....	27
Tabela 1.	Composição percentual dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário.....	60
Tabela 2.	Composição percentual dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário.....	61
Tabela 3.	Teste de solubilidade do óleo de <i>A. vulgare</i>	64
Tabela 4.	Percentual de inibição da oxidação.....	75
Tabela 5.	Atividade inibitória percentual (AI%) frente à enzima tirosinase pelo óleo de <i>A. vulgare</i>	77
Tabela 6.	Composição percentual das formulações.....	79
Tabela 7.	Composição percentual das formulações F1 a F7.....	83
Tabela 8.	Composição percentual das formulações F8 a F14.....	84
Tabela 9.	Composição percentual das formulações F15 a F21.....	85
Tabela 10.	Composição percentual das formulações F22 a F28.....	86
Tabela 11.	Composição percentual das formulações F29 a F35.....	87
Tabela 12.	Composição percentual das formulações F7 e F30.....	90
Tabela 13.	Caracterização das nanoemulsões F7 e F30.....	92
Tabela 14.	Caracterização das melhores nanoemulsões do diagrama.....	99
Tabela 15.	Atividade inibitória percentual (AI%) frente à enzima tirosinase por NE-TCM.....	101
Tabela 16.	Tamanho médio de gotícula \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	102
Tabela 17.	Valor médio de PDI \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	103
Tabela 18.	Valor médio de potencial zeta \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	104
Tabela 19.	Valor médio de pH \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Astrocaryum vulgare</i> (INPN, 2020).....	19
Figura 2.	Distribuição de <i>A. vulgare</i> no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).....	20
Figura 3.	Fruto de <i>A. vulgare</i> em corte transversal (MORAIS, GUTJAHR, 2012).....	20
Figura 4.	Cacho de frutos de <i>A. vulgare</i> (INPN, 2020).....	21
Figura 5.	Ilustração de <i>A. vulgare</i> (Biodiversity Heritage Library, 2020).....	21
Figura 6.	Óleo fixo de frutos de <i>A. vulgare</i> (Própria autora).....	22
Figura 7.	Desenho esquemático da pele humana (Própria autora, criado em BioRender.com).....	23
Figura 8.	Esquema simplificado da síntese de melanina (Própria autora, criado em BioRender.com).....	26
Figura 9.	Tipos de nanoemulsões (Própria autora).....	31
Figura 10.	Tipos de instabilidade das nanoemulsões (Adaptado de JAFARI. McCLEMENTS, 2018).....	34
Figura 11.	Óleo fixo de polpa de frutos de <i>A. vulgare</i> (Própria autora).....	38
Figura 12.	Estrutura química do radical DPPH [•] (Própria autora).....	39
Figura 13.	Estrutura química do radical ABTS ^{•+} (Própria autora).....	39
Figura 14.	Estrutura química do Trolox (Própria autora).....	40
Figura 15.	Estrutura química de L-tirosina (Própria autora).....	40
Figura 16.	Estrutura química do ácido kójico (Própria autora).....	41
Figura 17.	Estrutura química do Isopropyl Palmitate (Própria autora).....	41
Figura 18.	Estrutura química do Polysorbate 20 (Própria autora).....	42
Figura 19.	Estrutura química do PPG-5-Ceteth-20 (Própria autora).....	42
Figura 20.	Estrutura química do Polysorbate 40 (Própria autora).....	43
Figura 21.	Estrutura química do Polysorbate 80 (Própria autora).....	43
Figura 22.	Estrutura química do Polysorbate 60 (Própria autora).....	44
Figura 23.	Estrutura química do PEG-6 Oleate (Própria autora).....	44
Figura 24.	Estrutura química do Polysorbate 85 (Própria autora).....	45
Figura 25.	Estrutura química do PEG-4 Oleate (Própria autora).....	45
Figura 26.	Estrutura química do PEG-6 Dioleate (Própria autora).....	46
Figura 27.	Estrutura química do PEG-4 Dioleate (Própria autora).....	46
Figura 28.	Estrutura química do Sorbitan Oleate (Própria autora).....	47

Figura 29.	Estrutura química do Sorbitan Trioleate (Própria autora).....	47
Figura 30.	Estrutura química do β -caroteno (Própria autora).....	48
Figura 31.	Ilustração do sistema de preparação das formulações (Própria autora, criado em BioRender.com).....	56
Figura 32.	Diagrama de fases pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).....	59
Figura 33.	Curva analítica do padrão β -caroteno (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).....	66
Figura 34.	Gráfico das curvas TG e DSC (Fonte: Software do equipamento).....	68
Figura 35.	Espectro de FTIR dos gases despreendidos (Fonte: Software do equipamento).....	69
Figura 36.	Curva analítica do radical DPPH [•] (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).....	70
Figura 37.	Curva de inibição do radical DPPH [•] pelo óleo de <i>A. vulgare</i> (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).....	71
Figura 38.	Curva analítica do padrão Trolox (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).....	73
Figura 39.	Curva de inibição do radical ABTS ^{•+} (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).....	73
Figura 40.	Formulações para a determinação do EHLr da fase oleosa, após 24 h em repouso (Própria autora).....	80
Figura 41.	Formulações (F1 a F7) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 h em repouso (Própria autora).....	84
Figura 42.	Formulações (F8 a F14) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 h em repouso (Própria autora).....	85
Figura 43.	Formulações (F15 a F21) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 h em repouso (Própria autora).....	86
Figura 44.	Formulações (F22 a F28) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 h em repouso (Própria autora).....	87
Figura 45.	Formulações (F29 a F35) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 h em repouso (Própria autora).....	88
Figura 46.	Melhores formulações após 24 h em repouso (Própria autora).....	88
Figura 47.	Formulações obtidas nos pontos 1 a 15 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).....	94

Figura 48. Formulações obtidas nos pontos 16 a 30 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).....	95
Figura 49. Formulações obtidas nos pontos 31 a 36 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).....	95
Figura 50. Região de formação de nanoemulsão no diagrama pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).....	96
Figura 51. Pontos intermediários do diagrama pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).....	97
Figura 52. Formulações obtidas nos pontos intermediários N1 a N15 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).....	98
Figura 53. Formulações obtidas nos pontos intermediários N16 a N24 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).....	98
Figura 54. Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula por intensidade percentual (Fonte: Zetasizer Software).....	100

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.....	19
2.2	Pele.....	23
2.3	Melanogênese e melasma.....	25
2.4	Antioxidante.....	28
2.5	Nanoemulsões.....	31
3	OBJETIVOS.....	37
3.1	Objetivo geral.....	37
3.2	Objetivos específicos.....	37
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1	Material.....	38
4.2	Métodos.....	48
4.2.1	Aquisição do óleo fixo de frutos de <i>A. vulgare</i>	48
4.2.2	Avaliação da solubilidade do óleo de <i>A. vulgare</i>	48
4.2.3	Quantificação de carotenoides totais expressos em β -caroteno por espectrofotometria.....	49
4.2.4	Avaliação do perfil de decomposição térmica do óleo de <i>A. vulgare</i>	49
4.2.5	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do óleo de <i>A. vulgare</i>	50
4.2.5.1	Inibição do radical DPPH*.....	50
4.2.5.2	Inibição do radical ABTS* ⁺	51
4.2.5.3	Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico.....	52
4.2.6	Avaliação da atividade inibitória <i>in vitro</i> da tirosinase pelo óleo de <i>A. vulgare</i>	53
4.2.7	Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) da fase oleosa e obtenção das nanoemulsões.....	54
4.2.8	Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação.....	56
4.2.9	Caracterização das nanoemulsões.....	58
4.2.10	Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário.....	59

4.2.11 Avaliação da atividade inibitória <i>in vitro</i> da tirosinase pela nanoemulsão obtida.....	61
4.2.12 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão obtida.....	62
4.2.13 Análise estatística dos resultados.....	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
5.1 Avaliação da solubilidade do óleo de <i>A. vulgare</i>	64
5.2 Quantificação de carotenoides totais expressos em β -caroteno por espectrofotometria.....	65
5.3 Avaliação do perfil de decomposição térmica do óleo de <i>A. vulgare</i>	67
5.4 Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i> do óleo de <i>A. vulgare</i>	70
5.4.1 Inibição do radical DPPH [•]	70
5.4.2 Inibição do radical ABTS [•]	72
5.4.3 Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico.....	74
5.5 Avaliação da atividade inibitória <i>in vitro</i> da tirosinase pelo óleo de <i>A. vulgare</i>	76
5.6 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) da fase oleosa e obtenção das nanoemulsões.....	78
5.7 Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação.....	82
5.8 Caracterização das nanoemulsões.....	90
5.9 Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário.....	93
5.10 Avaliação da atividade inibitória <i>in vitro</i> da tirosinase pela nanoemulsão obtida.....	100
5.11 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão obtida.....	101
6 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS.....	109
ANEXO I.....	130
ANEXO II.....	131

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo humano e possui, como uma das suas principais funções, a proteção contra agentes externos, como patógenos e radiação UV, que ocorre pela formação da melanina, de forma fisiológica, em células específicas, na epiderme da pele humana, nos cabelos e na retina dos olhos.

Embora a pigmentação seja um processo fisiológico, em algumas pessoas pode ocorrer o processo de hiperpigmentação da pele, devido à produção excessiva de melanina. Essa hiperpigmentação promove um transtorno cutâneo, conhecido como melasma, caracterizado pela presença de regiões amarronzadas na pele da face, o que produz um impacto negativo na autoestima e na qualidade de vida das pessoas acometidas por essa alteração.

Fatores como a exposição solar, estresse, má alimentação e tabagismo podem contribuir para o aparecimento do melasma na pele, além de contribuírem para a formação de radicais livres em excesso.

Os radicais livres são formados, naturalmente, como subprodutos do metabolismo celular e desempenham papel importante, envolvidos em processos fisiológicos diversos; entretanto, sua produção em excesso, chamada de estresse oxidativo, tem efeitos nocivos ao organismo. As substâncias que impedem ou retardam os efeitos deletérios do estresse oxidativo na pele são conhecidas como antioxidantes.

Popularmente conhecida como tucumã, uma das muitas palmeiras encontradas na região amazônica, tem frutos amplamente consumidos e utilizados pela população local. O óleo fixo extraído de seus frutos apresenta uma coloração alaranjada característica e possui diversas atividades biológicas descritas na literatura.

As substâncias encontradas no óleo fixo de tucumã são de classes com atividades biológicas importantes; porém, de características lipofílicas, o que dificulta a sua utilização em muitos produtos de matriz aquosa. Nesse contexto, a obtenção de sistemas nanoemulsionados é uma excelente estratégia para solucionar esse problema.

As nanoemulsões do tipo óleo em água apresentam papel de destaque para essa finalidade. As nanoemulsões são consideradas opções viáveis para encapsulação de substâncias que possuem baixa solubilidade em água. Essa estratégia permite a obtenção de produtos aquosos e possível incremento da biodisponibilidade das substâncias ativas presentes na formulação. Elas são sistemas cineticamente estáveis, com tamanho de gotícula da ordem de poucos nanômetros e que, usualmente, apresentam aparência transparente ou translúcida.

Diferentes processos são utilizados para o preparo de nanoemulsões, normalmente divididos entre metodologias de alto aporte de energia e baixo aporte de energia e possibilitam sua aplicação direta em produtos como agroquímicos, medicamentos, cosméticos e alimentos.

A principal metodologia para determinação do tamanho de gotícula de nanoemulsões envolve o espalhamento dinâmico da luz. No entanto, outras mais acuradas, capazes de estimar, de forma mais exata, a variação no tamanho de gotícula e a estabilidade das nanoemulsões, como a metodologia de microscopia eletrônica de transmissão, têm sido consideradas ferramentas poderosas para essa finalidade. Nesse contexto, nanoemulsões são excelentes opções viáveis para a incorporação de óleos fixos em matrizes aquosas e o desenvolvimento de produtos cosméticos contendo óleos vegetais.

Desta forma, empregar um óleo fixo da biodiversidade brasileira, na forma de um sistema nanoemulsionado, que apresente estabilidade, atividade antioxidante e inibidora da tirosinase, mostra ser um desafio a pesquisadores para oferecer um produto cosmético inovador para a pele.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Astrocaryum vulgare* Mart

Pertencente à família *Arecaceae*, *Astrocaryum vulgare* (Figura 1) é uma espécie de palmeira nativa e não endêmica do Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020).



Figura 1. *Astrocaryum vulgare* (INPN, 2020)

Popularmente conhecida como tucumã (MORAIS; GUTJAHR, 2012; SHANLEY, 2015) e tucumã-do-pará (LUNZ et al., 2010; MORAIS; GUTJAHR, 2012; OLIVEIRA et al., 2012), é encontrada nos domínios fitogeográficos Amazônia e Cerrado e distribuída nos estados do Amapá, Pará, Tocantins, Maranhão e Goiás (Figura 2) (FLORA DO BRASIL, 2020). Possui quatro sinonímias descritas *Astrocaryum awarra*, *Astrocaryum guianense*, *Astrocaryum segregatum*, *Astrocaryum tucumoides* (THE PLANT LIST, 2013).



Figura 2. Distribuição do tucumã no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020)

A palmeira do tucumã cresce em forma de touceiras, podendo atingir de 10 a 15 m de altura (LIMA et al., 1986; MORAIS; GUTJAHR, 2012). Seus frutos (Figura 3) apresentam-se na forma de cachos de até 1,20 m de comprimento (Figura 4). Além disso, possui, em toda extensão de seus troncos e folhas, espinhos escuros (Figura 5) (LIMA et al., 1986; LUNZ et al., 2010; MORAIS; GUTJAHR, 2012, OLIVEIRA et al., 2012).



Figura 3. Fruto de tucumã em corte transversal (MORAIS; GUTJAHR, 2012)



Figura 4. Cacho de frutos de tucumã (INPN, 2020)



Figura 5. Ilustração de *Astrocaryum vulgare* (Biodiversity Heritage Library, 2020)

Diversos trabalhos encontrados na literatura descrevem várias atividades do óleo de *A. vulgare*, como atividade anti-hiperglicemiante (BALDISSERA et al., 2017a;

BALDISSERA et al., 2017b; BALDISSERA et al., 2017c; BALDISSERA et al., 2018), antioxidante (SANTOS et al., 2015; BALDISSERA et al., 2017b), anti-inflamatória (BONY et al., 2012a; BONY et al., 2012b), ação redutora do estresse oxidativo hepático (BALDISSERA et al., 2018), antimicrobiana (JOBIM et al., 2014) e despigmentante da pele (TEIXEIRA et al., 2012).

O óleo de tucumã (Figura 6) é rico em ácidos graxos, sendo os ácidos oleico e palmítico, os majoritários (OBOH et al., 1988; MAMBRIM et al., 1997; BORA et al., 2001; FERREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010; BONY et al., 2012a; SANTOS et al., 2013; BALDISSERA et al., 2017a; SANTOS et al., 2017; SERRA et al., 2019). Possui elevado teor de carotenoides, principalmente β -caroteno (OBOH et al., 1988; ROSSO; MERCADANTE, 2007; FERREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010; ROJAS-GARBANZO et al., 2011; BONY et al., 2012b; SAINI et al. 2015; SANTOS et al., 2015a; SANTOS et al., 2015b; MATOS et al., 2019; SERRA et al., 2019) e fitosteróis (OBOH et al., 1988; FERREIRA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2010; BONY et al., 2012b; SANTOS et al., 2013; MATOS et al., 2019).



Figura 6. Óleo fixo de frutos de *A. vulgare* (Própria autora)

2.2. Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e representa em torno de 10% de todo o peso corporal (BENSON et al., 2019). É originada do mesoderma e ectoderma embrionário e, quando está na sua forma íntegra, possui, como principal função, a proteção do organismo frente à contaminação de vírus, parasitas, fungos, bactérias, radiação e produtos químicos (MANCINI, 2004; BENSON et al., 2019).

A pele é constituída de quatro estruturas: o estrato córneo (1), a epiderme (2), a derme (3) e o tecido subcutâneo (4) (Figura 7), além de possuir apêndices como folículos pilosos, glândulas apócrinas e ductos sudoríparos (BENSON et al., 2019).

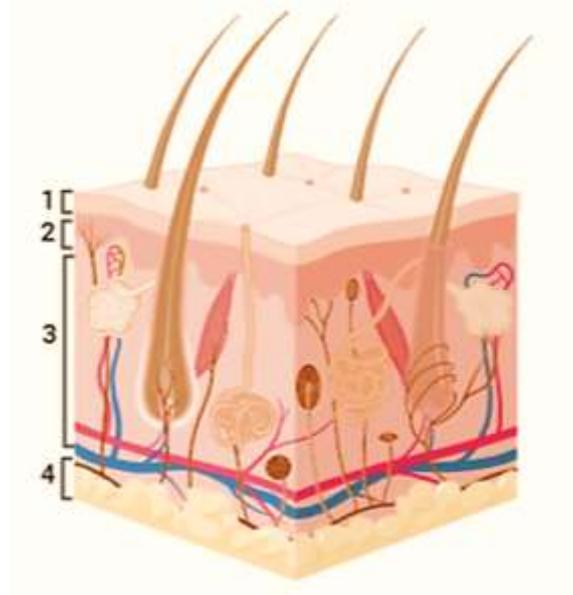


Figura 7. Desenho esquemático da pele humana (Própria autora, criado em BioRender.com)

O tecido subcutâneo (4), anteriormente chamado de hipoderme, é formado por tecido conjuntivo frouxo e células de gordura. Possui, como principais funções,

absorver impactos e armazenar energia, além de atuar como isolante térmico (BENSON et al., 2019).

A derme (3) possui de 0,1 a 0,5 cm de espessura e é formada por, aproximadamente, 70% de fibras de colágeno, o que promove sustentação e elasticidade ao tecido cutâneo. A maioria das células que constitui a derme são os fibroblastos, além de apresentar células do sistema imune. Além disso, é na derme que se encontram os receptores dos nervos sensoriais e os vasos sanguíneos, que irão irrigar as camadas mais superiores do tecido (BENSON et al., 2019).

A epiderme (2) é formada por várias camadas de células em diferentes níveis de diferenciação celular. A camada celular mais próxima à derme é denominada camada basal e é constituída por células cubóides, basófilas, que repousam sobre a membrana basal, que faz a separação entre a derme e a epiderme. A camada basal possui intensa atividade mitótica e é rica em células tronco. Logo acima da camada basal, há a camada espinhosa, formada por células cubóides, núcleo central e com feixes de filamentos de queratina, no citoplasma. Acima da camada espinhosa, há a camada granulosa, que contém apenas algumas camadas de células achatadas, com núcleo central e citoplasma rico em grânulos de querato-hialina. Logo acima, há a camada lúcida, que é formada por uma fina camada de células achatadas e sem núcleo. O citoplasma possui inúmeros filamentos de queratina. Essa camada é vista com mais facilidade na pele espessa. Acima da camada lúcida, tem-se o estrato córneo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; BENSON et al., 2019).

O estrato córneo (1) possui aproximadamente 10-20 μm de espessura, sendo a parte mais externa da pele. É constituído de células achatadas, anucleadas e mortas e que possuem o citoplasma repleto de queratina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). O

estrato córneo é a principal barreira de proteção, devido a sua elevada densidade e sua baixa hidratação, quando comparado ao restante da pele (BENSON et al., 2019).

2.3 Melanogênese e melasma

A melanogênese é um processo fisiológico de pigmentação da pele, por meio da produção de melanina (CHO et al, 2012; LAI et al., 2018). A biossíntese da melanina ocorre nos melanossomos, que são organelas localizadas no interior dos melanócitos e, em seguida, transportadas para os queratinócitos. Os melanócitos são células especializadas, sendo encontrados na epiderme da pele humana, cabelos e na retina dos olhos, na proporção de 1:36, em relação aos queratinócitos (LAI et al., 2018; PILLAIYAR et al., 2018).

A síntese da melanina ocorre a partir da oxidação de L-tirosina em L-DOPA, pela ação da enzima tirosinase (TYR). Em seguida, L-DOPA é convertida em dopaquinona (DQ) que será convertida em eumelanina ou em feomelanina, dependendo do tipo de estímulo recebido (Figura 8) (PILLAIYAR et al., 2018).

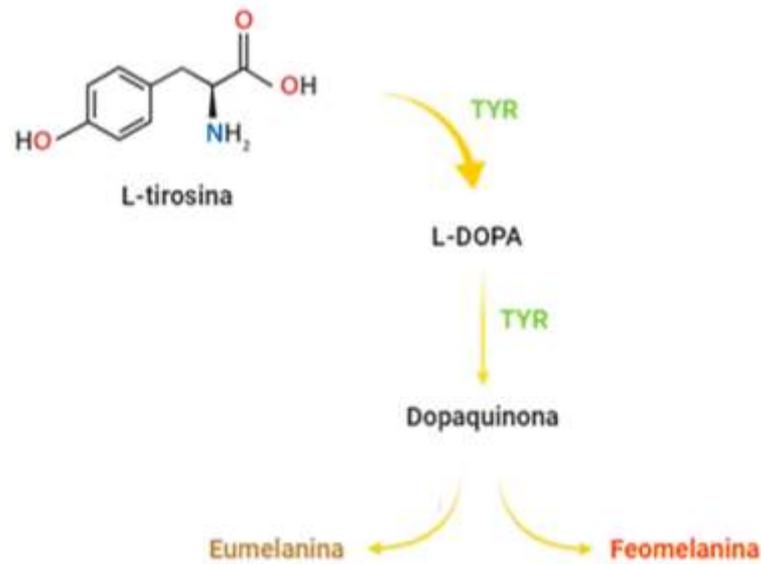


Figura 8. Esquema simplificado da síntese de melanina (Própria autora, criado em BioRender.com).

A eumelanina é responsável pela formação da melanina preta e marrom, enquanto a feomelanina é responsável pela melanina vermelha e amarela. A proporção entre eumelanina e feomelanina é responsável pelos fenótipos da pele humana (BERNARD; BERTHON, 2000; CHANG, 2012; PILLAIYAR et al., 2018).

A hiperpigmentação da pele devido à produção excessiva de melanina promove um transtorno cutâneo conhecido como melasma, uma dermatose comum que se caracteriza pela presença de máculas marrons, na pele mais exposta à radiação solar, como a face (RIGOPOULOS et al., 2007; MIOT et al., 2009; JIANG et al., 2018; POLLO et al., 2018). Essa condição acomete, majoritariamente, mulheres em idade fértil; entretanto, também pode ocorrer em homens, porém, em menor incidência (MIOT et al., 2009; VACHIRAMON et al., 2012).

O melasma é uma condição multifatorial frequentemente associada ao uso de hormônios anticoncepcionais sintéticos e à gravidez. Além disso, a predisposição genética e a exposição solar excessiva também contribuem para o surgimento e a piora do quadro (RIGOPOULOS et al., 2007).

Por se tratar de uma dermatose que se manifesta na face, o melasma produz um impacto negativo na autoestima e qualidade de vida dos indivíduos com esta condição (MIOT et al., 2009; JIANG et al., 2018; POLLO et al., 2018).

A redução do melasma é realizada utilizando uma série de ativos de uso tópico e terapias físicas como *peelings* e laser (RENDON et al., 2006; MIOT et al., 2009; SALEM et al., 2009). Os ativos clareadores mais utilizados e seus respectivos mecanismos de ação estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Substâncias mais utilizadas na redução do melasma e seus mecanismos de ação (RENDON et al., 2006; SARKAR et al., 2014).

Substância	Mecanismo de ação
Hidroquinona	Inibe a atividade da enzima tirosinase
Ácido azelaico	Ação antiproliferativa nos melanócitos
Ácido ascórbico	Reduz a melanina oxidada
Ácido kójico	Inibe a atividade da enzima tirosinase

O uso desses ativos clareadores do melasma, em geral, é insatisfatório, visto que não promovem um clareamento definitivo, além de promoverem irritações na pele (RENDON et al., 2006; MIOT et al., 2009). Dessa maneira, o uso de produtos de origem natural, como potenciais ativos para a redução do melasma, estão sendo estudados e têm se mostrado promissores e sugerindo, inclusive, novos mecanismos

de ação, como a inibição de radicais livres, que estariam associados à ativação da tirosinase, promovendo um aumento na síntese de melanina (SARKAR et al., 2020).

2.4 Antioxidante

Antioxidantes são substâncias capazes de reagir rapidamente com radicais livres impedindo sua ação (MOLYNEUX, 2004; ATKINS; JONES, 2006). Os radicais livres são formados, naturalmente, como subprodutos do metabolismo celular e desempenham um papel importante, pois estão envolvidos em processos fisiológicos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular (ATKINS; JONES, 2006; ALVES et al., 2010); entretanto, sua produção em excesso, chamada de estresse oxidativo, têm efeitos nocivos ao organismo, como alterações na membrana plasmática, danos ao DNA e ao RNA, produzindo danos celulares irreversíveis e contribuindo para o surgimento de diversas patologias como câncer e doenças cardiovasculares, além de promover o envelhecimento precoce da pele (ALVES et al., 2010; FRIES; FRASSON, 2011). Alguns hábitos de vida podem contribuir para a produção excessiva de radicais livres, tais como o tabagismo, exposição prolongada à radiação UV, consumo de álcool e poluição (FRIES; FRASSON, 2011).

As substâncias que possuem atividade antioxidante são aquelas que impedem ou retardam os efeitos deletérios do estresse oxidativo na pele (SCOTTI et al., 2007). As substâncias antioxidantes podem ser classificadas como primárias, sinérgicas, removedoras de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos, dependendo do mecanismo de ação associado a elas (RAMALHO; JORGE, 2006).

As substâncias classificadas como primárias são aquelas que atuam inativando os radicais livres, por meio da doação de átomos de hidrogênio, como a glutatona e seus derivados (RAMALHO; JORGE, 2006; SCOTTI et al., 2007).

As sinérgicas são substâncias que possuem a função de promover um incremento da atividade antioxidante, das substâncias primárias, quando utilizadas em conjunto (RAMALHO; JORGE, 2006). O ácido ascórbico é um exemplo de antioxidante sinérgico, quando usado em associação com a vitamina E, pois promove a regeneração da vitamina E, na membrana celular oxidada (SCOTTI et al., 2007).

As substâncias removedoras de oxigênio são aquelas que impedem a autoxidação pela captura do oxigênio livre, no meio celular. O ácido ascórbico e seus derivados são classificados como removedores de oxigênio, além de serem antioxidantes sinérgicos (RAMALHO; JORGE, 2006).

As enzimas como a ubiquinona (coenzima Q-10) são classificadas como antioxidantes biológicos e atuam neutralizando oxigênios reativos, pela transferência de prótons (RAMALHO; JORGE, 2006; SCOTTI et al., 2007).

Os agentes quelantes complexam íons metálicos, que são catalisadores das reações oxidativas (RAMALHO; JORGE, 2006). As substâncias mais utilizadas são o ácido cítrico e o ácido lipóico (FRIES; FRASSON, 2011).

Por fim, os antioxidantes mistos são aqueles que incluem os derivados de produtos naturais e podem atuar por mais de um mecanismo de ação, como os carotenóides, em especial o β -caroteno, que atua pelo mecanismo de fotoxidação e neutralização do oxigênio singlete, e os derivados do ácido cinâmico, como o ácido caféico, que atuam como removedores de oxigênio e antioxidante sinérgico (RAMALHO; JORGE, 2006; SCOTTI et al., 2007).

Para determinar o potencial antioxidante de uma substância, existem diversas análises *in vitro*, como a metodologia de captura do radical DPPH[•], a metodologia de captura do radical ABTS^{•+}, a metodologia de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (sistema β -caroteno/ácido linoleico), a metodologia ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), entre outros.

As metodologias de captura do radical DPPH[•], radical ABTS^{•+} e o sistema β -caroteno/ácido linoleico são baseadas na transferência de elétron singlete e avaliam a capacidade, das substâncias antioxidantes, de reduzir o radical livre sintético, que tem a sua coloração alterada, quando ocorre a redução (RUFINO et al., 2006; NORMAH; HANAPI, 2019). Essas são metodologias colorimétricas, pois têm a atividade medida pela redução da absorbância; ou seja, quanto maior o decréscimo da absorbância, maior será a redução da substância oxidante (RUFINO et al., 2006; RUFINO et al., 2007a; RUFINO et al., 2007b; NORMAH; HANAPI, 2019).

A metodologia ORAC é baseada na transferência de átomos de hidrogênio e atua pela competição, entre antioxidantes e substratos, por radicais peroxila gerados termicamente, por meio da decomposição de compostos azo (NORMAH; HANAPI, 2019). Nesse ensaio, a atividade antioxidante é medida a partir da área sob a curva da redução da fluorescência *versus* o tempo. A principal vantagem de utilização da metodologia ORAC é a semelhança do seu mecanismo de ação com o mecanismo fisiológico de oxidação (BISBY et al., 2008; NORMAH; HANAPI, 2019).

2.5 Nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas dispersos de pequenas gotículas de dois líquidos imiscíveis e cineticamente estáveis (SOLANS et al., 2005; ANTON et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008; BRUXEL et al., 2012; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Possui tamanho médio de gotícula de 20-200 nm (IZQUIERDO et al., 2004; SOLANS et al., 2005; MAESTRO et al., 2008; GUTTOFF et al., 2015; KOMAIKO et al., 2015; MUSAZZI et al., 2018); entretanto, alguns autores consideram sistemas com até 500 nm como nanoemulsões (FORGIARINI et al., 2000; ANTON et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2008; BERNARDI et al., 2011; SOLANS; SOLÉ, 2012)

Podem se apresentar na forma de sistemas óleo em água (O/A), água em óleo (A/O) ou nanoemulsões múltiplas como água, óleo, água (A/O/A) ou óleo, água, óleo (O/A/O) (Figura 9) (SOLANS et al., 2005; GUTIÉRREZ et al., 2008; SOLÉ et al., 2012; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

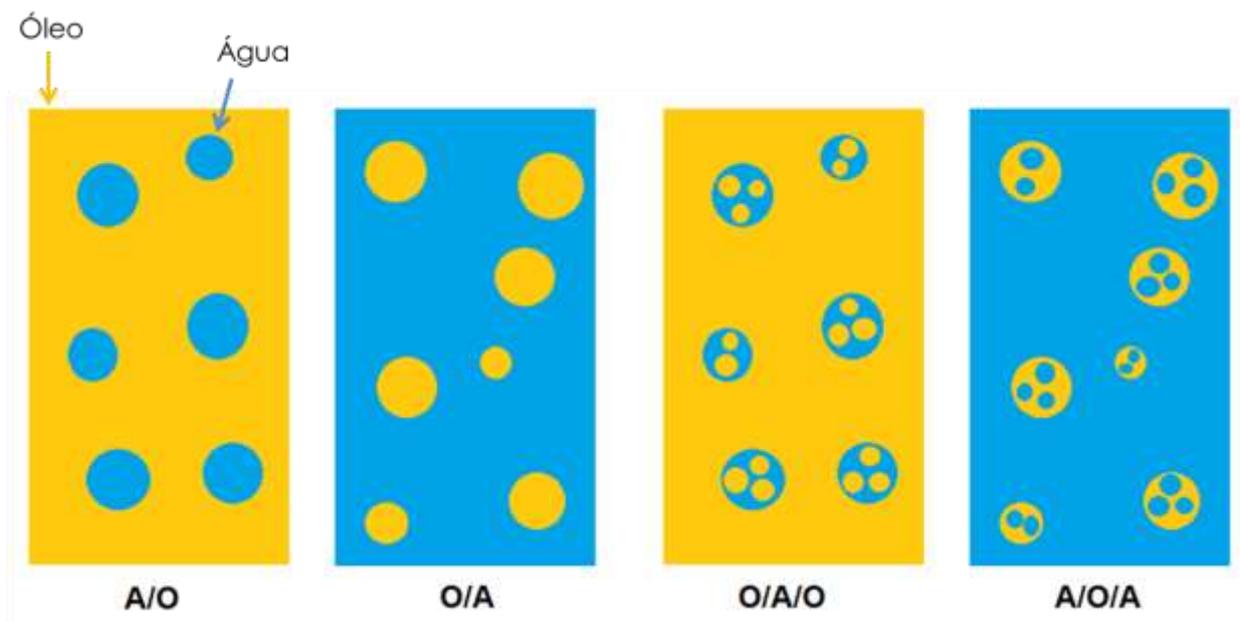


Figura 9. Tipos de nanoemulsões (Própria autora).

As metodologias de obtenção de uma nanoemulsão podem ser divididas em metodologias que utilizam alto aporte de energia e aquelas que fazem uso do baixo aporte de energia (TADROS et al., 2004; SOLANS et al., 2005; McCLEMENTS; RAO, 2011; OSTERTAG et al., 2012; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

As metodologias de alto aporte de energia envolvem elevadas forças de cisalhamento, como as induzidas por homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores e sonicação (SOLANS et al., 2005; RAO; McCLEMENTS, 2010; QIAN; McCLEMENTS, 2011; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Após o preparo de uma emulsão convencional, a fase dispersa é reduzida a gotículas diminutas em escala nanométrica, por meio do fornecimento de alta energia (QIAN; McCLEMENTS, 2011; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Devido à necessidade de investimentos de alto custo, as metodologias de alto aporte de energia são mais usadas em escala industrial de produção de sistemas nanoemulsionados (JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Já as metodologias de baixo aporte de energia envolvem formação espontânea de pequenas gotículas em misturas específicas de tensoativo, óleo e água (JAFARI; McCLEMENTS, 2018). As metodologias de obtenção que utilizam baixo aporte energético mais utilizadas são as de inversão de fase por temperatura, emulsificação espontânea ou auto-emulsificação e a metodologia por inversão da composição (SOLANS et al., 2005; RAO; McCLEMENTS, 2010; SOLANS; SOLÉ, 2012; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

A emulsificação espontânea ou auto-emulsificação baseia-se na diluição da fase externa, que induz à difusão dos componentes mais hidrofílicos, da fase orgânica para a fase aquosa, sem que ocorra alteração na curvatura do tensoativo (SOLANS; SOLÉ, 2012; SABERI et al., 2013; DAVIDOV-PARDO; McCLEMENTS, 2015). Já a inversão de fases refere-se à transição de fases envolvendo inversão da curvatura do(s)

tensoativo(s) utilizado(s) ou, até mesmo, transição de estruturas contendo um filme de tensoativo com curvatura zero. A transição de fases pode ocorrer à temperatura constante e com variação da composição (PIC – do inglês *phase inversion composition method*) ou composição constante e variação da temperatura (PIT – do inglês *phase inversion temperature method*) (ANTON et al., 2008; OSTERTAG et al., 2012; SOLANS; SOLÉ, 2012; GONÇALVES et al., 2019). A escolha da metodologia de preparação da nanoemulsão depende de diversos fatores como a natureza do material a ser homogeneizado, o comportamento físico-químico desejado e a aplicação do produto final (SOLANS et al., 2005; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

As nanoemulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, assim como as emulsões convencionais, causadas pelas interações moleculares que são desfavoráveis na interface óleo-água, o que favorece a separação das fases (SOLANS et al., 2005; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Devido a essa instabilidade, as nanoemulsões estão mais sujeitas a sofrerem os efeitos da separação gravitacional que ocasiona a formação da cremagem ou sedimentação, dependendo da densidade da fase oleosa. Além disso, a instabilidade termodinâmica também pode ocasionar floculação, coalescência e amadurecimento de Ostwald (Figura 10) (JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

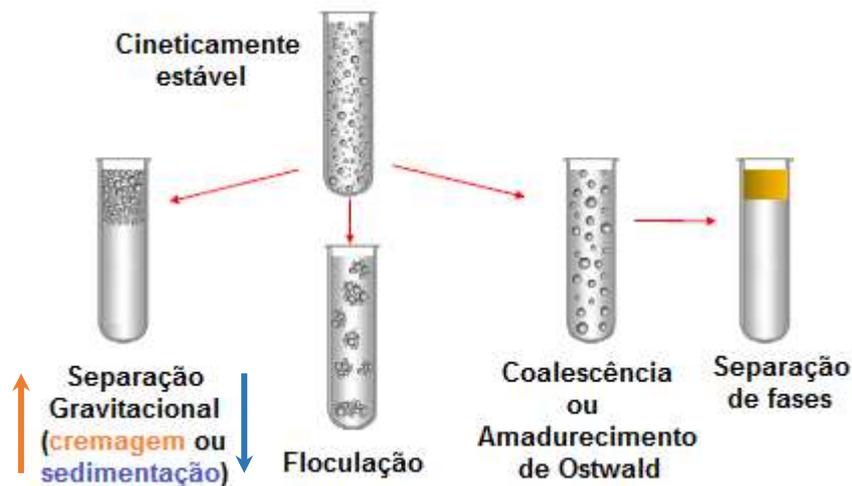


Figura 10. Tipos de instabilidade das nanoemulsões (Adaptado de JAFARI, McCLEMENTS, 2018).

A cremagem ou sedimentação é um processo em que as gotículas dispersas se unem e, por diferença de densidade, entre a fase oleosa e a fase aquosa, sobem à superfície, formando uma camada de emulsão mais concentrada semelhante a uma nata (cremagem) ou descem ao fundo, formando uma camada mais espessa (sedimentação). Esse processo é reversível e a formulação pode retornar a seu estado original por agitação leve; entretanto, não é desejável que a sua formação ocorra, pois é um sinal claro de instabilidade física (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

A floculação é uma união instável e reversível entre as gotículas, formando aglomerados que se comportam como uma unidade. Sua formação ocorre quando as forças atrativas de Van der Waals das gotículas são superiores às forças repulsivas que mantêm as gotículas separadas. Os floculados podem ser desfeitos por agitação leve e, assim, a formulação retorna ao seu estado original (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

A coalescência é uma etapa de instabilidade posterior à flocculação, quando as gotículas atraídas fundem-se, formando gotículas maiores. É um processo irreversível e contínuo, que só cessa quando ocorre a separação de fases e, conseqüentemente, a quebra da emulsão (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O amadurecimento de Ostwald ocorre quando as gotículas menores diminuem e as gotículas maiores de fundem e aumentam de tamanho devido à difusão, das moléculas da fase dispersa, para a fase contínua. O amadurecimento de Ostwald pode ser inibido utilizando-se uma fase oleosa com baixa solubilidade em água ou adicionando substâncias inibidoras do amadurecimento como, por exemplo, triglicerídeos de cadeia longa, como óleo de girassol e palma (SOLANS et al., 2005; WOOSTER et al., 2008; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

A caracterização das nanoemulsões pode ser realizada utilizando diversas metodologias analíticas. A distribuição dos tamanhos de gotícula é avaliada utilizando a o espalhamento dinâmico da luz (DLS – do inglês *dynamic light scattering*). O equipamento mede a intensidade de luz espalhada pelo movimento Browniano das gotículas e a quantidade de luz espalhada é diretamente proporcional ao tamanho das gotículas. Além disso, o DLS fornece informações de índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (TADROS et al., 2004; GRAPENTIN et al., 2015; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). As características morfológicas das nanoemulsões podem ser analisadas por meio de metodologias como a microscopia eletrônica ou de força atômica (RAO; McCLEMENTS, 2010; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O índice de polidispersão (PDI) indica a variedade de populações de micelas presentes na formulação; ou seja, quanto maior o valor de PDI, maior a variabilidade populacional. Sabe-se que, em preparações farmacêuticas, é incomum que as

gotículas sejam completamente monodispersas, sendo mais comumente encontrados sistemas polidispersos; entretanto, um sistema com um baixo índice de polidispersão é um sistema mais estável e, portanto, um gráfico de dispersão monomodal é o desejável (AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O potencial zeta é utilizado como um parâmetro para avaliação da estabilidade das formulações frente à floculação e é determinado observando o movimento das gotículas pela influência da corrente elétrica (AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Quando seu valor se encontra superior a 30 mV, em módulo, indica que as forças repulsivas da dupla camada estão atuando com maior intensidade do que as forças atrativas de Van der Waals; assim, há menor tendência à formação de floculado e, conseqüentemente, menor possibilidade de ocorrer coalescência e quebra da emulsão (FRIBERG; JANSSON; CEDERBERG, 1976; MAHDI et al., 2011; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar nanoemulsões cosméticas contendo óleo fixo de frutos de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o teor de β -caroteno presente no óleo fixo de frutos de *A. vulgare*;
- Avaliar o perfil de decomposição térmica do óleo fixo de frutos de *A. vulgare*;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo fixo de frutos de *A. vulgare*;
- Avaliar a atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pelo óleo fixo de frutos de *A. vulgare*;
- Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) da fase oleosa da formulação;
- Avaliar a influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação;
- Determinar a região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário;
- Avaliar a atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pelo nanoemulsão obtida;
- Avaliar a estabilidade da nanoemulsão obtida.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

- Óleo fixo de polpa de frutos de tucumã (Figura 11)

Fornecedor: Amazon Oil

Lote: AMO 255-001/0318

INCI: *Astrocaryum Tucuma* Fruit Oil



Figura 11. Óleo fixo de polpa de frutos de *A. vulgare* (Própria autora).

- Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) (Figura 12)

Fabricante: Sigma

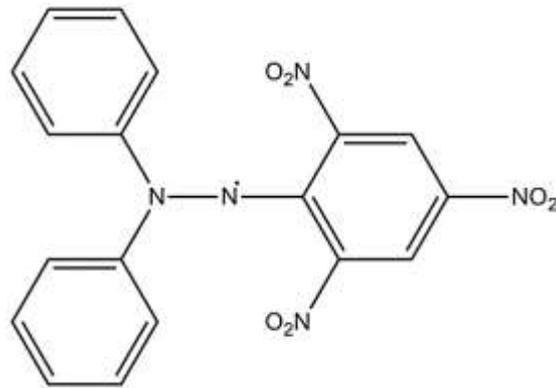


Figura 12. Estrutura química do radical DPPH[•] (Própria autora).

- Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}) (Figura 13)

Fabricante: Sigma

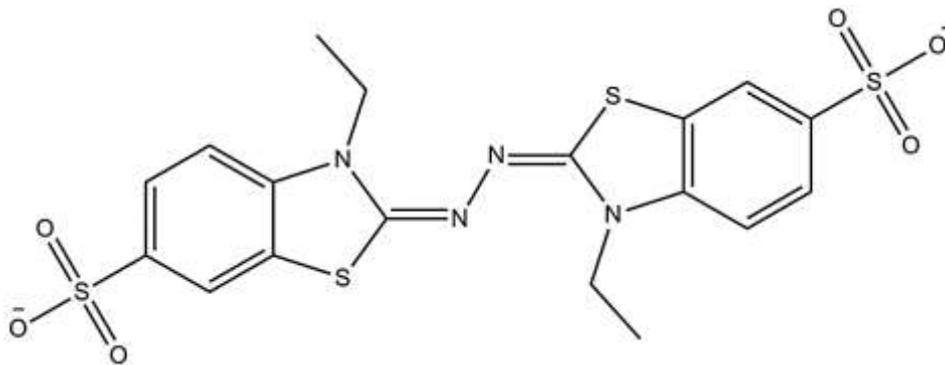


Figura 13. Estrutura química do radical ABTS^{•+} (Própria autora).

- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) (Figura 14)

Fabricante: Sigma

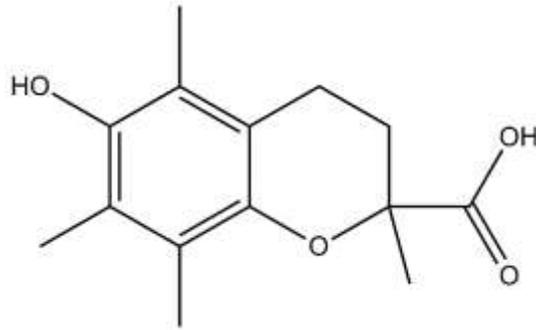


Figura 14. Estrutura química do Trolox (Própria autora).

- L-tirosina (Figura 15)

Fabricante: Sigma

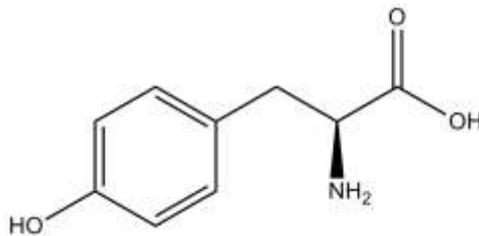


Figura 15. Estrutura química de L-tirosina (Própria autora).

- Tirosinase de cogumelo

Fabricante: Sigma

- Ácido kójico (Figura 16)

Fabricante: Sigma

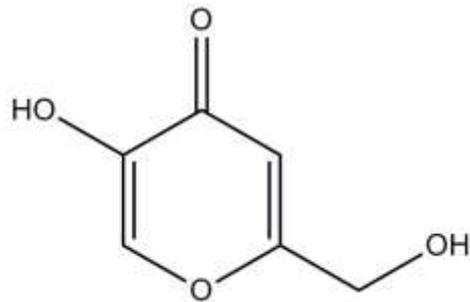


Figura 16. Estrutura química do ácido kójico (Própria autora).

- Isopropyl Palmitate (Figura 17)

Fornecedor: Croda

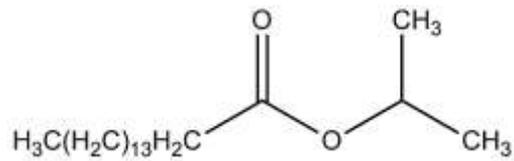


Figura 17. Estrutura química do Isopropyl Palmitate (Própria autora).

- Polysorbate 20 (Figura 18)

Fornecedor: Synth

EHL: 16,7

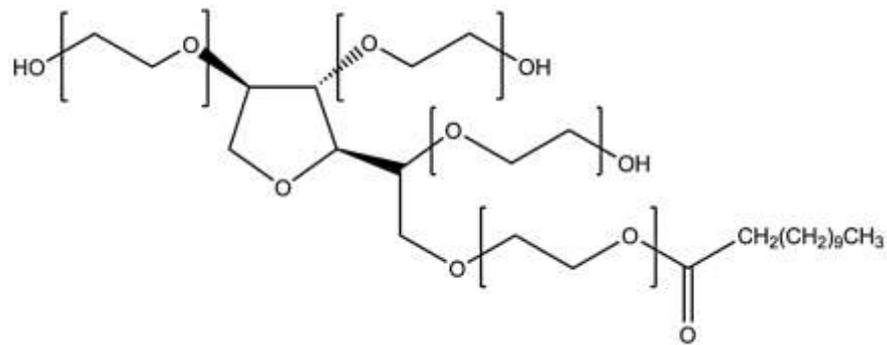


Figura 18. Estrutura química do Polysorbate 20 (Própria autora).

- PPG-5-Ceteth-20 (Figura 19)

Fornecedor: Croda

EHL: 16

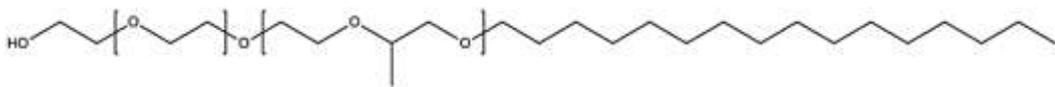


Figura 19. Estrutura química do PPG-5-Ceteth-20 (Própria autora).

- Polysorbate 40 (Figura 20)

Fornecedor: Croda

EHL:15,6

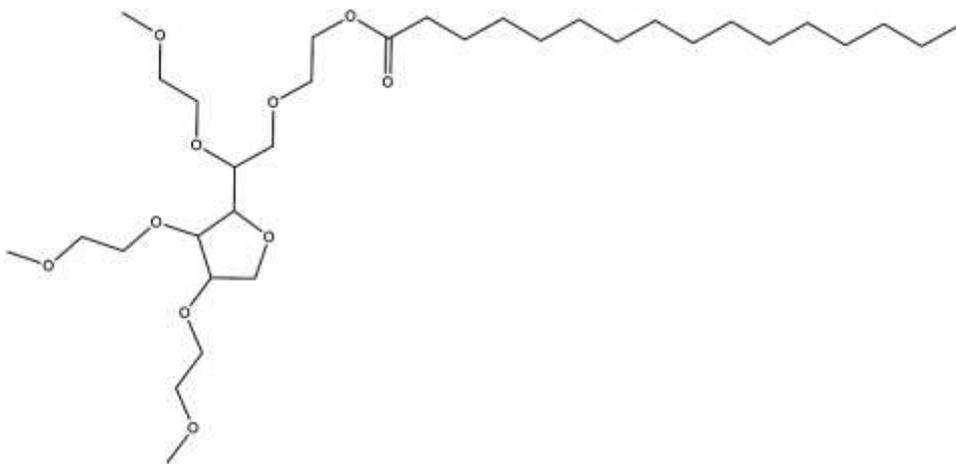


Figura 20. Estrutura química do Polysorbate 40 (Própria autora).

- Polysorbate 80 (Figura 21)

Fornecedor: Synth

EHL: 15

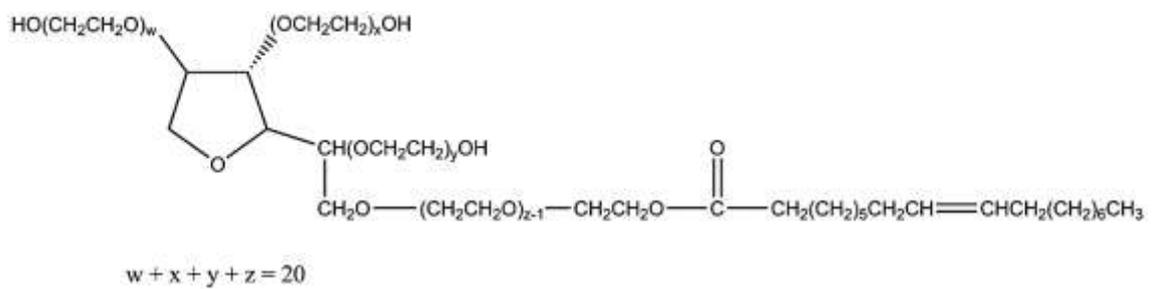


Figura 21. Estrutura química do Polysorbate 80 (Própria autora).

- Polysorbate 60 (Figura 22)

Fornecedor: Sigma

EHL: 14,9

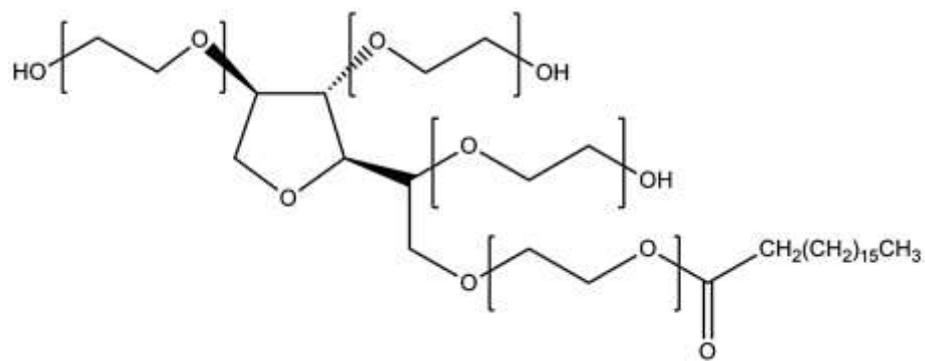


Figura 22. Estrutura química do Polysorbate 60 (Própria autora).

- PEG-6 Oleate (Figura 23)

Fornecedor: Praid

EHL: 13

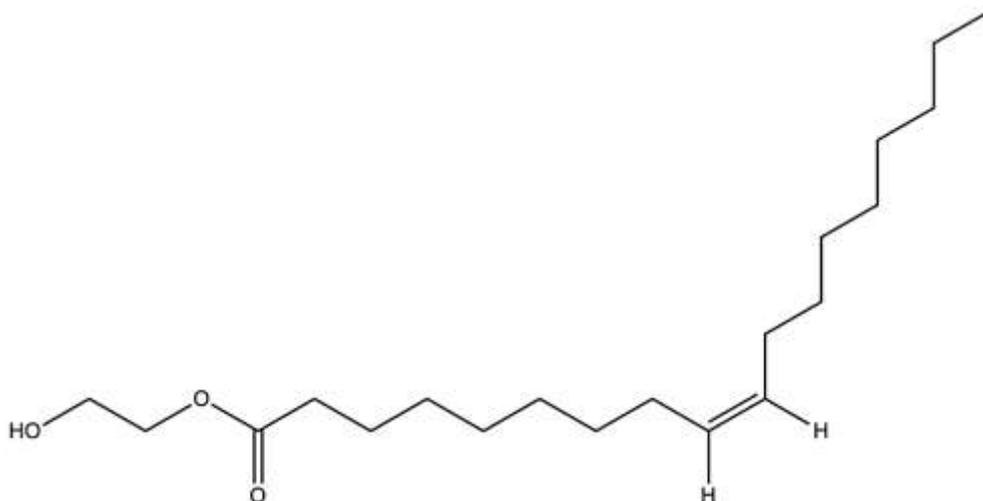


Figura 23. Estrutura química do PEG-6 Oleate (Própria autora).

- Polysorbate 85 (Figura 24)

Fornecedor: Croda

EHL: 11

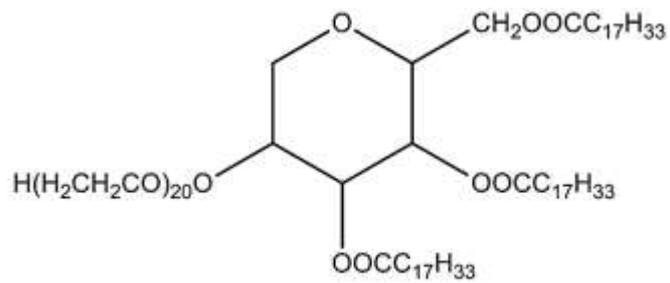


Figura 24. Estrutura química do Polysorbate 85 (Própria autora).

- PEG-4 Oleate (Figura 25)

Fornecedor: Praid

EHL: 11

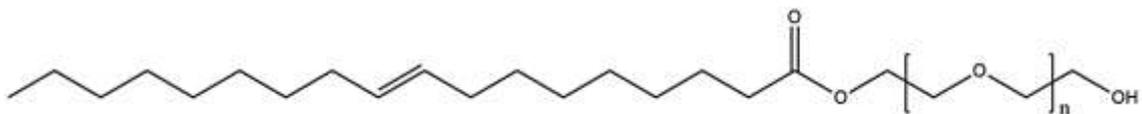


Figura 25. Estrutura química do PEG-4 Oleate (Própria autora).

- PEG-6 Dioleate (Figura 26)

Fornecedor: Praid

EHL:10

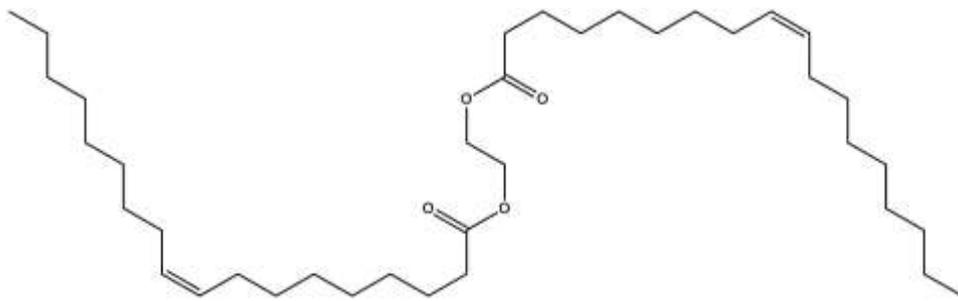


Figura 26. Estrutura química do PEG-6 Dioleate (Própria autora).

- PEG-4 Dioleate (Figura 27)

Fornecedor: Praid

EHL: 8,5

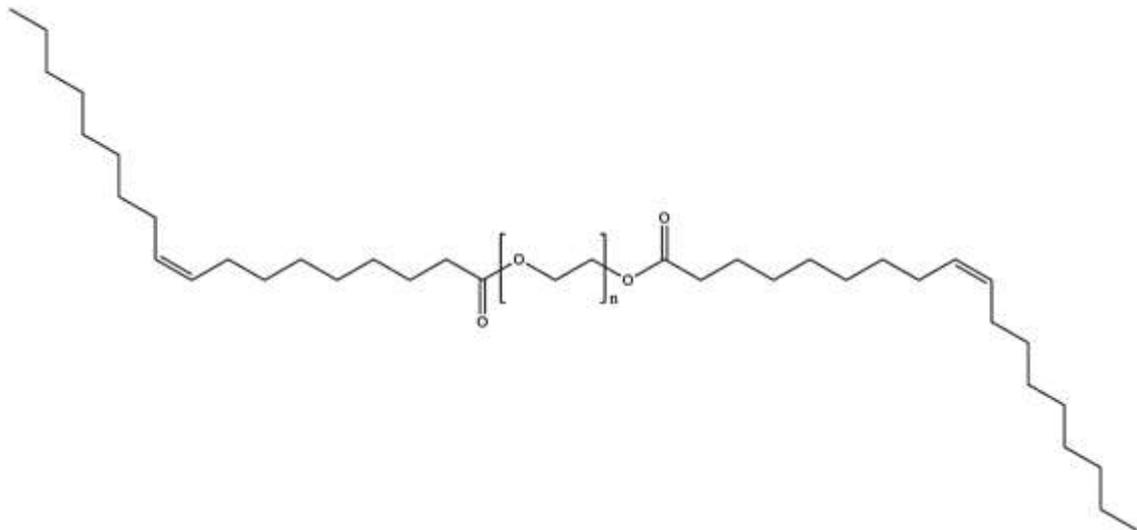


Figura 27. Estrutura química do PEG-4 Dioleate (Própria autora).

- Sorbitan oleate (Figura 28)

Fornecedor: Croda

EHL: 4,3

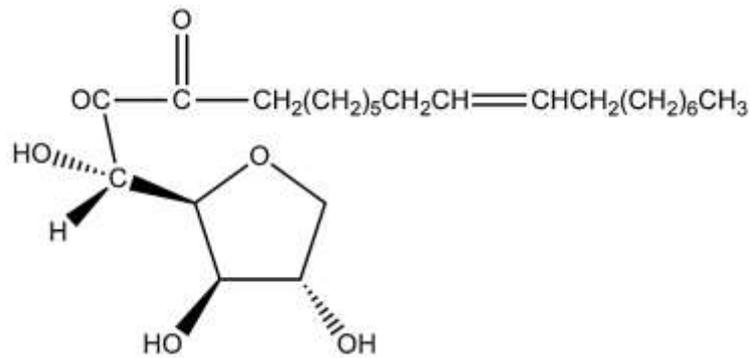


Figura 28. Estrutura química do Sorbitan oleate (Própria autora).

- Sorbitan trioleate (Figura 29)

Fornecedor: Praid

EHL: 1,8

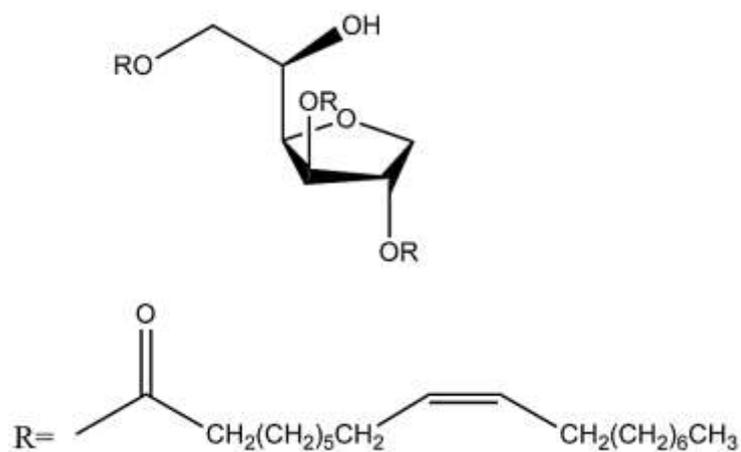


Figura 29. Estrutura química do Sorbitan trioleate (Própria autora).

- Padrão de β -caroteno (Figura 30)

Fornecedor: Sigma

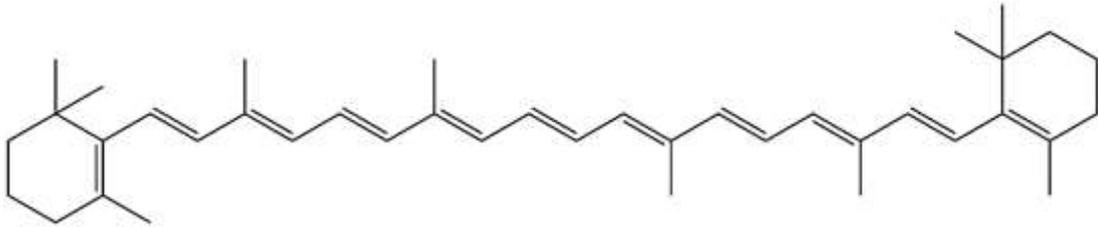


Figura 30. Estrutura química do β -caroteno (Própria autora).

4.2 Métodos

4.2.1 Aquisição do óleo fixo de frutos de *A. vulgare*

O óleo fixo de frutos de *A. vulgare* foi adquirido da empresa Amazon Oil (CNPJ: 07.928.840/0001-68), que realiza a extração do óleo por prensagem a frio (ANEXO II).

4.2.2 Avaliação da solubilidade do óleo de *A. vulgare*

A avaliação da solubilidade do óleo foi realizada segundo a metodologia descrita no primeiro volume da quinta edição da Farmacopeia Brasileira. Foi avaliada a solubilidade do óleo na presença dos solventes: etanol absoluto, metanol, acetona, clorofórmio, diclorometano, dimetilsulfóxido (DMSO), propilenoglicol, miristato de isopropila, palmitato de isopropila e glicerina.

Uma parte de óleo foi adicionada a tubos de ensaio e, em seguida, partes de solvente foram adicionadas aos tubos. Após cada parte de solvente adicionada, os

tubos foram agitados, em agitador do tipo Vortex, por 1 min e, em seguida, deixados em repouso, por 24 h, para posterior análise da solubilidade.

4.2.3 Quantificação de carotenoides totais expressos em β -caroteno por espectrofotometria

Para a determinação do teor de carotenoides totais em relação ao β -caroteno, foi utilizada a metodologia descrita por Zeraik; Yariwake (2008) com modificações. Inicialmente, foi realizada a curva analítica do padrão de β -caroteno, em diclorometano, em cinco diferentes concentrações (10, 15, 20, 25 e 30 $\mu\text{g/mL}$), em triplicata. As absorbâncias das amostras foram lidas a 450 nm, em espectrofotômetro (SPECTROstar Nano® - BMG Labtech).

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico da absorbância pela concentração de β -caroteno e a equação da reta obtida foi utilizada para calcular o teor de carotenóides totais em relação ao β -caroteno.

Em seguida, foi preparada uma solução do óleo de tucumã em diclorometano (7 mg/mL), em triplicata. A absorbância da amostra também foi lida a 450 nm, em espectrofotômetro.

O resultado obtido foi substituído em y, na equação da reta da curva analítica realizada anteriormente, para obter o valor da concentração de β -caroteno presente no óleo de *A. vulgare*.

4.2.4 Avaliação do perfil de decomposição térmica do óleo de *A. vulgare*

Para a avaliação do perfil de decomposição térmica do óleo fixo de frutos de *A. vulgare*, foram realizadas análises de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória

diferencial simultânea (DSC), seguida da análise dos gases liberados por espectroscopia no infravermelho, com transformada de Fourier (FTIR).

As curvas TG-DSC foram obtidas utilizando um sistema de análise térmica da Mettler Toledo, modelo TG/DSC-1, sendo a atmosfera de ar como gás de purga, a uma vazão de 50 mL/min, massa da amostra de aproximadamente 20 mg e cadinhos de α - Al_2O_3 de 150 μL , razão de aquecimento de $10^\circ \text{C min}^{-1}$ e intervalo de temperatura de 30 – 800° C.

A análise de gases liberados (EGA, do inglês Evolved gas analysis) por TG-FTIR dos produtos liberados durante a decomposição térmica foi realizada usando um TG-DSC1 Mettler-Toledo, acoplado a um espectrofotômetro Nicolet FTIR, com uma célula de gás e um detector DTGS ZnSe. O forno e célula de gás aquecido (250° C) foram acoplados por meio de uma linha de transferência de aço inoxidável de 120 cm, aquecida a 225° C, com diâmetro de 3,0 mm, que foi purgada com ar seco (50 mL/min). Os espectros de FTIR foram registrados com 16 varreduras por espectro, a uma resolução de 4 cm^{-1} . A identificação dos produtos gasosos foi baseada nos espectros de referência disponíveis no *software* do espectrômetro (OMNIC 8.0).

4.2.5 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do óleo de *A. vulgare*

4.2.5.1 Inibição do radical DPPH[•]

A avaliação da atividade antioxidante do óleo de *A. vulgare* foi realizada pela metodologia de captura do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]), segundo descrito por Rufino et al., 2007, com modificações.

Inicialmente, foi realizada uma curva analítica do radical DPPH[•], em solução de metanol, em seis diferentes concentrações (10; 20; 30; 40; 50 e 60 µM), em triplicata. Em seguida, soluções de óleo fixo, em acetona, foram preparadas nas concentrações 0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 0,750 e 1,000 mg/mL, em triplicata. Em tubos de ensaio, 0,1 mL de solução de óleo foi adicionado, seguido da adição de 3,9 mL de solução de radical DPPH[•], 0,06 mM. As soluções foram deixadas em repouso, ao abrigo da luz, por 30 minutos. Após o tempo decorrido, as absorvâncias das amostras foram lidas, a 515 nm, em espectrofotômetro (SPECTROstar Nano® - BMG Labtech).

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico da absorvância pela concentração de óleo de *A. vulgare* e a equação da reta foi utilizada para calcular o valor de concentração necessária para inibir a atividade de 50% do radical DPPH[•] (EC₅₀).

4.2.5.2 Inibição do radical ABTS^{•+}

A avaliação da atividade antioxidante do óleo de *A. vulgare* foi realizada através da metodologia de captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), segundo a metodologia descrita por Rufino et al., 2007b, com modificações

Inicialmente, foi preparado o radical ABTS^{•+}, a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL de solução de persulfato de sódio (140 mM). A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, 1 mL dessa mistura foi diluída em etanol absoluto, até se obter uma absorvância de 0,70 ± 0,05 a 734 nm.

Em seguida, foi realizada a curva analítica do Trolox, em etanol absoluto, em cinco diferentes concentrações (100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM). Uma alíquota de 30 μL de cada concentração foi transferida para tubos de ensaio, contendo 3,0 mL da solução de radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e homogeneizados em agitador de tubos. A leitura da absorbância foi realizada a 734 nm, em espectrofotômetro (SPECTROstar Nano® - BMG Labtech), após 6 minutos da mistura.

Para avaliação da atividade antioxidante do óleo de *A. vulgare*, soluções de óleo fixo, em acetona, foram preparadas nas concentrações 0,125; 0,250; 0,500; 0,750; 1,000 e 1,250 mg/mL, em triplicata. Em seguida, uma alíquota de 30 μL de cada concentração foi transferida para tubos de ensaio contendo 3,0 mL da solução de radical $\text{ABTS}^{+\cdot}$ e homogeneizados em agitador de tubos. A leitura das absorbâncias também foi realizada a 734 nm, após 6 minutos da mistura. Como branco, foi utilizada uma alíquota de 30 μL da solução de maior concentração do óleo e 3 mL de etanol absoluto.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico da absorbância pela concentração de óleo de *A. vulgare* e a equação da reta foi utilizada para calcular o valor da capacidade antioxidante equivalente em Trolox ou TEAC.

4.2.5.3 Sistema β -caroteno/Ácido Linoleico

Para a avaliação da capacidade antioxidante do óleo de *A. vulgare*, frente aos radicais livres gerados durante a peroxidação lipídica do ácido linoleico, foi utilizada a metodologia descrita por Rufino et al., 2006, com modificações (RUFINO et al., 2006).

A solução sistema β -caroteno/Ácido linoleico foi preparada a partir da mistura de 40 μL de ácido linoleico, 530 μL de Polysorbate 40, 50 μL de uma solução de β -

caroteno (20 mg/mL em clorofórmio) e 1 mL de clorofórmio. Após a homogeneização, o clorofórmio foi evaporado com o auxílio de um oxigenador. Em seguida, foi adicionada água destilada, previamente oxigenada por 30 min, com o auxílio de um oxigenador, até que se obtivesse uma absorvância entre 0,6 e 0,7, a 470 nm.

Após o preparo da solução sistema, foram misturados 0,4 mL de soluções do óleo de *A. vulgare*, em diversas concentrações (0,500; 1,000 e 1,500 mg/mL em acetona), em triplicata, com 5 mL da solução sistema. Foi utilizado, como controle positivo, uma solução de Trolox 200 mg/L, em etanol absoluto.

A primeira leitura das absorvâncias em espectrofotômetro (SPECTROstar Nano® - BMG Labtech), a 470 nm, foi realizada após 2 min da mistura. Em seguida, as amostras foram submetidas a um aquecimento, a 40° C, em banho-maria, por 2 horas. Após o tempo decorrido, a absorvância das amostras foi novamente lida a 470 nm. Também foi realizada a leitura da solução sistema, nas mesmas condições.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno.

4.2.6 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pelo óleo de *A. vulgare*

Para avaliar o potencial inibitório da enzima tirosinase pelo óleo de *A. vulgare* foi utilizada a metodologia descrita por Teixeira et al., 2012, com modificações (TEIXEIRA et al., 2012).

Para a realização do ensaio, foi usado o controle positivo, o controle negativo e a amostra contendo óleo de *A. vulgare*, em triplicata, utilizando uma microplaca de 96 poços (Falcon®). O controle positivo consistia em 10 μ L da enzima tirosinase (125 U/mL) em água Mili-Q, 70 μ L de tampão fosfato (pH 6,8), 60 μ L de ácido kójico (17,5 μ g/mL) em acetona e 70 μ L de L-tirosina (0,3 mg/mL), em água Mili-Q. A amostra

continha todos os itens descritos anteriormente para o controle positivo, com a substituição do ácido kójico por 60 µL de uma solução de óleo de *A. vulgare*, em acetona (350 µg/mL). Para o controle negativo, foram utilizados 60 µL de acetona em substituição ao ácido kójico e ao óleo de *A. vulgare*.

Imediatamente após o preparo, a absorbância dos poços foi lida em espectrofotômetro a 510 nm (t_0). Em seguida, a placa foi incubada a $30 \pm 1^\circ \text{C}$, por 60 min e a absorbância novamente lida após o tempo decorrido (t_1). Após a segunda leitura, a placa foi novamente incubada, utilizando as mesmas condições e, após o tempo de incubação, a absorbância foi novamente lida (t_2). Todas as amostras foram feitas em triplicata.

O percentual de inibição da tirosinase foi calculado segundo a equação:

$$AI\% = \left(\frac{C - S}{C} \right) \times 100$$

Onde,

C = absorbância do controle negativo

S = absorbância da amostra ou do controle positivo (absorbância do tempo t_1 ou t_2 menos a absorbância do tempo t_0)

4.2.7 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) da fase oleosa e obtenção das nanoemulsões

A determinação do EHL requerido (EHLr) da fase oleosa, contendo óleo de *A. vulgare* e Isopropyl Palmitate (PIP), foi realizada solubilizando o óleo em PIP e, em seguida, misturando-se PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e Sorbitan Oleate (S80-

EHL 4,3) a fim de se obter várias formulações com uma ampla faixa de EHL (4,3 – 16) (JESUS et al., 2017, com modificações). O EHL_r foi calculado segundo a equação:

$$\text{EHL}_r = \frac{\text{EHL}_A \times A\% + \text{EHL}_B \times B\%}{100}$$

Onde:

EHL_r é o valor de EHL resultante da mistura de dois tensoativos

EHL_A é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofóbico

EHL_B é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofílico

A% é o percentual do tensoativo mais hidrofóbico

B% é o percentual do tensoativo mais hidrofílico

A% + B% = 100

Para a obtenção das formulações, foi utilizada a metodologia de baixo aporte de energia. Foram preparadas nanoemulsões do tipo óleo em água, com composição de 5% (p/p) de óleo de *A. vulgare*, 5% (p/p) de Isopropyl Palmitate, 10% (p/p) de tensoativo e 80% (p/p) de água deionizada.

Inicialmente, o óleo de *A. vulgare* e o Isopropyl Palmitate foram homogeneizados por 1 min, em agitador do tipo vortex (TECNAL®, TE162). Em seguida, os tensoativos foram adicionados e a mistura foi homogeneizada, por mais 1 min, também em agitador do tipo vortex. Após a homogeneização, a água deionizada foi gotejada, lentamente, com o auxílio de uma seringa, sob agitação constante, também em agitador do tipo vortex (Figura 31). Após a completa adição da água deionizada, a formulação foi homogeneizada por mais 1 min e, em seguida, deixada em repouso por 24 h para posterior análise macroscópica de estabilidade (JESUS et al., 2017, com

modificações), avaliando formação de cremagem, floculação, coalescência, precipitação e separação de fases (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).



Figura 31. Ilustração do sistema de preparo das formulações (Própria autora, criado em BioRender.com).

4.2.8 Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação

Após a determinação do valor de EHLr, 35 diferentes pares de tensoativos foram utilizados para o preparo das formulações. As emulsões foram preparadas utilizando os seguintes pares de tensoativos:

Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e PEG-6 Oleate (P6MO - EHL 13)

Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e Polysorbate 85 (T85 - EHL 11)

Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e PEG-4 Oleate (P4MO - EHL 11)

Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e PEG-6 Dioleate (P6DO - EHL 10)

Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e PEG-4 Dioleate (P4DO - EHL 8,5)
Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e Sorbitan Oleate (S80 - EHL 4,3)
Polysorbate 20 (T20 - EHL 16,7) e Sorbitan Trioleate (S85 - EHL 1,8)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e PEG-6 Oleate (P6MO - EHL 13)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e Polysorbate 85 (T85 - EHL 11)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e PEG-4 Oleate (P4MO - EHL 11)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e PEG-6 Dioleate (P6DO - EHL 10)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e PEG-4 Dioleate (P4DO - EHL 8,5)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e Sorbitan Oleate (S80 - EHL 4,3)
PPG-5-Ceteth-20 (PAWS - EHL 16) e Sorbitan Trioleate (S85 - EHL 1,8)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e PEG-6 Oleate (P6MO - EHL 13)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e Polysorbate 85 (T85 - EHL 11)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e PEG-4 Oleate (P4MO - EHL 11)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e PEG-6 Dioleate (P6DO - EHL 10)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e PEG-4 Dioleate (P4DO - EHL 8,5)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e Sorbitan Oleate (S80 - EHL 4,3)
Polysorbate 40 (T40 - EHL 15,6) e Sorbitan Trioleate (S85 - EHL 1,8)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e PEG-6 Oleate (P6MO - EHL 13)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e Polysorbate 85 (T85 - EHL 11)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e PEG-4 Oleate (P4MO - EHL 11)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e PEG-6 Dioleate (P6DO - EHL 10)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e PEG-4 Dioleate (P4DO - EHL 8,5)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e Sorbitan Oleate (S80 - EHL 4,3)
Polysorbate 80 (T80 - EHL 15) e Sorbitan Trioleate (S85 - EHL 1,8)
Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e PEG-6 Oleate (P6MO - EHL 13)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e Polysorbate 85 (T85 - EHL 11)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e PEG-4 Oleate (P4MO - EHL 11)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e PEG-6 Dioleate (P6DO - EHL 10)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e PEG-4 Dioleate (P4DO - EHL 8,5)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e Sorbitan Oleate (S80 - EHL 4,3)

Polysorbate 60 (T60 - EHL 14,9) e Sorbitan Trioleate (S85 - EHL 1,8)

Após obtenção das formulações, as emulsões foram deixadas 24 h em repouso para avaliação macroscópica dos parâmetros de estabilidade, como formação de cremagem, floculação, coalescência, precipitação e separação de fases (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

4.2.9 Caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões foram caracterizadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS – Malvern. Foram avaliados os tamanhos de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta. Cada análise foi realizada após a diluição das formulações em água Mili-Q (1:25). As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os gráficos de distribuição do tamanho de gotícula, por intensidade populacional, foram obtidos pelo *software* do próprio equipamento (Zetasizer software – Malvern) (JESUS et al., 2017).

4.2.10 Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário

O diagrama foi construído posicionando a água, os pares de tensoativos, previamente determinados, e a mistura de óleo e PIP em cada um dos vértices do triângulo e o percentual de cada componente variando de 0 a 100, a cada 10%, ao longo de cada lado do triângulo, conforme ilustrado na Figura 32 (BARRETO et al., 2017; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

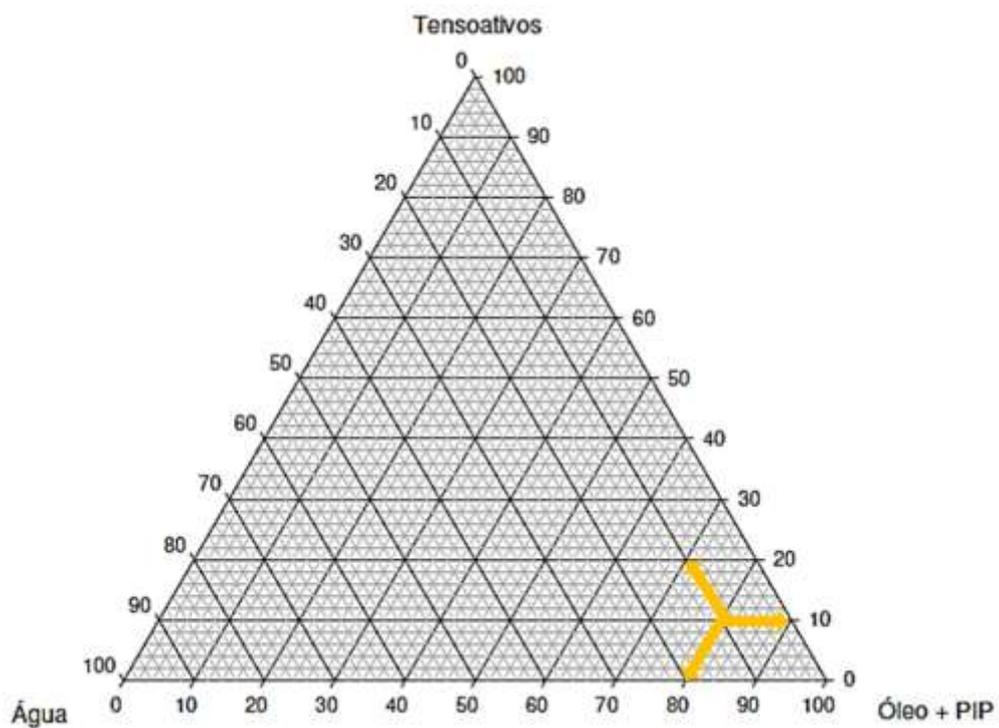


Figura 32. Diagrama de fases pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).

Inicialmente, foram preparadas 36 formulações, correspondentes aos pontos principais do diagrama (Tabela 1), para a determinação da região de formação das nanoemulsões.

Tabela 1. Composição percentual dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário.

FORM	TENS%	ÓLEO+PIP%	H ₂ O%	FORM	TENS%	ÓLEO+PIP%	H ₂ O%
1	10	10	80	19	30	40	30
2	10	20	70	20	30	50	20
3	10	30	60	21	30	60	10
4	10	40	50	22	40	10	50
5	10	50	40	23	40	20	40
6	10	60	30	24	40	30	30
7	10	70	20	25	40	40	20
8	10	80	10	26	40	50	10
9	20	10	70	27	50	10	40
10	20	20	60	28	50	20	30
11	20	30	50	29	50	30	20
12	20	40	40	30	50	40	10
13	20	50	30	31	60	10	30
14	20	60	20	32	60	20	20
15	20	70	10	33	60	30	10
16	30	10	60	34	70	10	20
17	30	20	50	35	70	20	10
18	30	30	40	36	80	10	10

Em seguida, foram preparadas mais 24 formulações (Tabela 2) dentro da região de formação de nanoemulsões com o objetivo de se obter formulações com maior percentual de água e melhor estabilidade (BARRETO et al., 2017).

Tabela 2. Composição porcentual dos pontos intermediário do diagrama de fases pseudoternário.

FORM	TENS%	ÓLEO+PIP%	H ₂ O%	FORM	TENS%	ÓLEO+PIP%	H ₂ O%
N1	2	2	96	N13	6	6	88
N2	2	4	94	N14	6	8	86
N3	2	6	92	N15	6	10	84
N4	2	8	90	N16	8	2	90
N5	2	10	88	N17	8	4	88
N6	4	2	94	N18	8	6	86
N7	4	4	92	N19	8	8	84
N8	4	6	90	N20	8	10	82
N9	4	8	88	N21	10	2	88
N10	4	10	86	N22	10	4	86
N11	6	2	92	N23	10	6	84
N12	6	4	90	N24	10	8	82

4.2.11 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pela nanoemulsão obtida

Para avaliar o potencial inibitório da enzima tirosinase pela nanoemulsão, foi utilizada a metodologia descrita por Teixeira et al., 2012, com modificações (TEIXEIRA et al., 2012).

Para a realização do ensaio, foi utilizado o controle positivo, o controle negativo e a amostra contendo a nanoemulsão, em triplicata, utilizando uma microplaca de 96 poços (Falcon®). O controle positivo consistia em 10 µL da enzima tirosinase (125 U/mL) em água Mili-Q, 70 µL de tampão fosfato (pH 6,8), 60 µL de ácido kójico (17,5 µg/mL) em acetona e 70 µL de L-tirosina (0,3 mg/mL), em água Mili-Q. A amostra continha todos os itens descritos anteriormente para o controle positivo, com a substituição do ácido kójico por 60 µL de uma solução da nanoemulsão em acetona (350 µg/mL). Para o controle negativo foram utilizados 60 µL de acetona em substituição ao ácido kójico e à nanoemulsão.

Imediatamente após o preparo, a absorbância dos poços foi lida em espectrofotômetro a 510 nm (t_0). Em seguida, a placa foi incubada a $30 \pm 1^\circ \text{C}$ e as absorbâncias foram lidas, até que ocorresse a estabilização dos valores, de tempo em tempo. O percentual de inibição da tirosinase foi calculado segundo a equação:

$$AI\% = \left(\frac{C - S}{C} \right) \times 100$$

Onde,

C = absorbância do controle negativo

S = absorbância da amostra ou do controle positivo (absorbância do tempo t menos a absorbância do tempo t_0)

4.2.12 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão obtida

A fim de se avaliar a estabilidade da nanoemulsão escolhida, foram preparados 10 g de nanoemulsão, em triplicata, e acondicionados em frasco de vidro transparente,

com tampa, envolto em papel alumínio. As formulações foram armazenadas nas condições de estresse: geladeira com temperatura de $5 \pm 2^\circ \text{C}$; estufa incubadora BOD, com temperatura de $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e temperatura ambiente (ISAAC et al., 2008, com modificações).

As formulações foram avaliadas quanto a alterações de tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH nos dias 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 e 90 após o preparo.

Para as análises de tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta, as nanoemulsões foram diluídas com água Mili-Q na proporção de 1:25. A leitura do pH foi realizada diretamente nas nanoemulsões, sem diluição, em peagômetro digital (Gehaka®, PG1800).

Os resultados estão expressos como a média \pm o desvio padrão.

4.2.13 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do software GraphPad Prism 7® com nível de significância de 95%.

Foi realizado o teste ANOVA One-way e pós-teste Tukey, para a determinação do EHLr, escolha do melhor par de tensoativos e do diagrama de fases pseudoternário.

Para o estudo de estabilidade foi realizado o teste ANOVA Two-way e pós-teste Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da solubilidade do óleo de *A. vulgare*

O óleo de *A. vulgare* foi adicionado juntamente com os respectivos solventes em tubos de ensaio conforme descrito na 5ª edição da Farmacopéia Brasileira (ANVISA, 2010). Após 24 horas da realização da análise, pôde-se verificar que o *A. vulgare* apresentou maior solubilidade nos solventes clorofórmio, diclorometano e palmitato de isopropila, como descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Teste de solubilidade do óleo de tucumã

Solvente	Solubilidade
Metanol	Praticamente insolúvel
Glicerina	Praticamente insolúvel
Etanol Absoluto	Muito pouco solúvel
Propilenoglicol	Muito pouco solúvel
DMSO	Pouco solúvel
Acetona	Facilmente solúvel
Miristato de Isopropila	Facilmente solúvel
Clorofórmio	Muito solúvel
Diclorometano	Muito solúvel
Palmitato de Isopropila	Muito solúvel

Por se tratar de um óleo fixo, rico em diversas substâncias químicas, com característica apolar, era esperado que a solubilidade do óleo de *A. vulgare* só ocorresse em solventes com baixa polaridade, como o clorofórmio e o diclorometano. Ainda, por serem solventes orgânicos clorados e, conseqüentemente, com elevada toxicidade, seu uso em produtos cosméticos é proibido (ANVISA, 2016). Sendo assim, o palmitato de isopropila, um éster de cadeia ramificada, foi escolhido como o solvente ideal pois, além de possuir a mesma solubilidade aparente do clorofórmio e diclorometano, apresenta baixa toxicidade, sendo considerado um solvente seguro para produtos de uso tópico (MERCK, 2015).

A análise da solubilidade do óleo de *A. vulgare* é de fundamental importância para a realização dos testes *in vitro* de avaliação da atividade antioxidante e de inibição da enzima tirosinase, pois é necessária a solubilização do óleo em solventes orgânicos para que as análises sejam realizadas.

5.2 Quantificação de carotenoides totais expressos em β -caroteno por espectrofotometria

A quantificação de carotenoides totais, expressos em β -caroteno, no óleo de *A. vulgare* foi realizada pela metodologia descrita por Zeraik; Yariwake, 2008, com modificações. A curva analítica do padrão de β -caroteno é ilustrada na Figura 33.

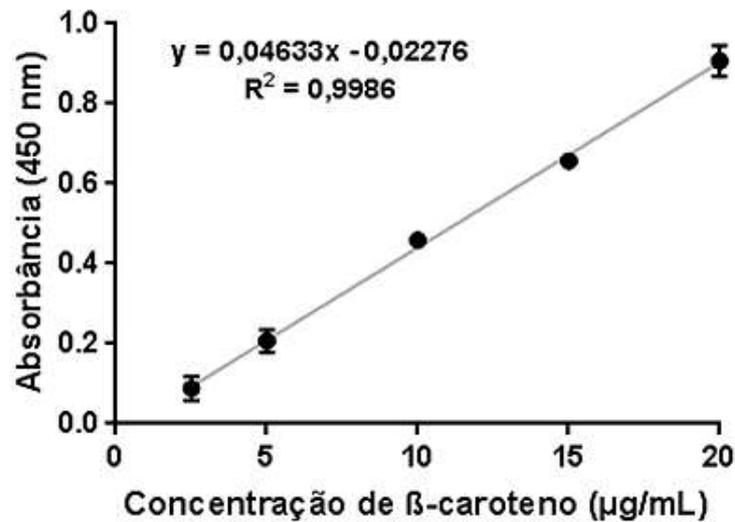


Figura 33. Curva analítica do padrão β -caroteno (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).

Após a realização dos cálculos, foi determinado o teor de 272,67 mg de β -caroteno por grama de óleo fixo de *A. vulgare*.

Ferreira e colaboradores, em 2008, determinaram o teor de β -caroteno, por espectrofotometria, no óleo de *A. vulgare* obtido por prensagem a frio, após a desidratação dos frutos em estufa, e obtiveram o valor de 21800 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ (FERREIRA et al., 2008), o que representa um teor mais de 1000 vezes inferior ao obtido no presente trabalho.

Em 2015, Santos et al., publicaram um estudo demonstrando que o teor de β -caroteno no óleo de *A. vulgare*, obtido por extração em aparato Soxhlet, utilizando éter dietílico como líquido extrator, foi de 567,08 $\text{g}/1000\text{g}$. A quantificação foi realizada em CLAE (SANTOS et al., 2015a). Por serem metodologias diferentes, tanto da extração quanto da quantificação, podem ser esperados resultados diferentes.

Outro estudo, realizado em 2012, também utilizando CLAE para a quantificação do teor de β -caroteno, apresentou o valor de 986,8 $\mu\text{g/g}$ (BONY et al., 2012a). O óleo

analisado foi obtido por extração em aparato Soxhlet utilizando hexano como líquido extrator.

As diferenças de teor encontradas nos diversos estudos são esperadas, visto que os óleos analisados foram obtidos de diferentes formas, além de os frutos de *A. vulgare* serem provenientes de várias regiões do Brasil como Ferreira et al. (2008) e Santos et al. (2015a), que coletaram os frutos no estado do Amapá, enquanto Bony et al. (2012a) coletou o material na Guiana Francesa e o óleo utilizado no presente estudo é proveniente do Pará (FERREIRA, et al., 2008; BONY et al., 2012a; SANTOS et al., 2015a).

Sabe-se que diferenças geográficas e formas extrativas, além de diversos outros fatores ambientais e genéticos, influenciam diretamente na composição dos metabólitos secundários produzidos por espécies vegetais sendo, portanto, necessária a análise química sempre que ocorra uma nova coleta de frutos e produção de óleo (OLIVEIRA et al., 2003; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

5.3 Avaliação do perfil de decomposição térmica do óleo de *A. vulgare*

A curva TG-DSC (Figura 34) mostrou que o óleo fixo de frutos de *A. vulgare* apresenta estabilidade térmica até 145° C. Acima dessa temperatura, a decomposição térmica ocorre em três etapas consecutivas de degradação exotérmica, com perda de massa em atmosfera de ar, o que sugere que a perda de massa ocorre por combustão devido à redução de massa ocorrer em meio oxidante (IONASHIRO, 2005; PARDAULI et al., 2017; PEREIRA et al., 2019). A primeira etapa de perda de massa ocorre entre 145-322° C ($\Delta m_1 = 34,89\%$), atribuída ao início da decomposição térmica da amostra e referente ao pico exotérmico em 285° C (1). A segunda perda de massa entre 22-414°

C ($\Delta m_1 = 43,78\%$), relativa aos picos exotérmicos em 355°C (2) e 375°C (3), e a terceira perda de massa entre $414\text{-}577^\circ\text{C}$ ($\Delta m_1 = 21,33\%$), relativa ao pico exotérmico em 500°C (4), são atribuídas à degradação oxidativa da matéria orgânica, formada na primeira etapa, apresentando 100% de perda de massa, ao final da análise. O perfil de degradação apresentado pelo óleo está em acordo com os demais dados descritos na literatura para a espécie vegetal e para espécies do mesmo gênero (LIMA et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2015; PARDAULI et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

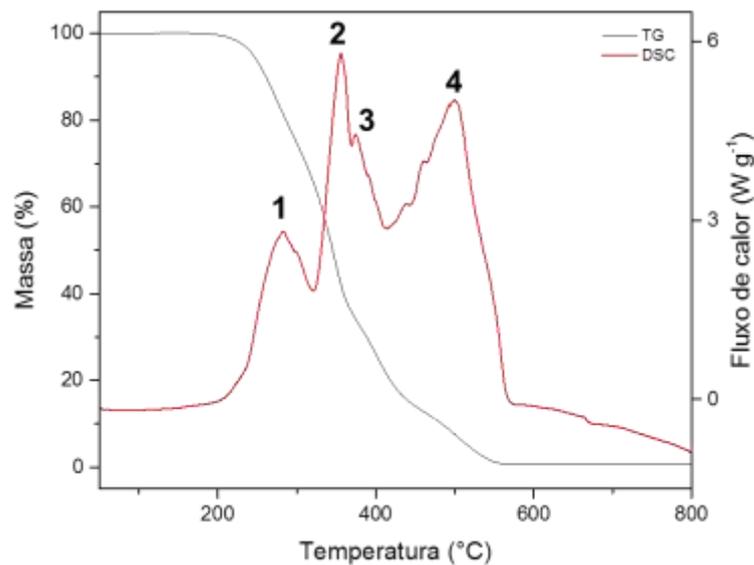


Figura 34. Gráfico das curvas TG e DSC (Própria autora, obtido no *software* do equipamento).

O espectro FTIR relativo aos gases desprendidos durante o processo de decomposição do óleo é mostrado na Figura 35.

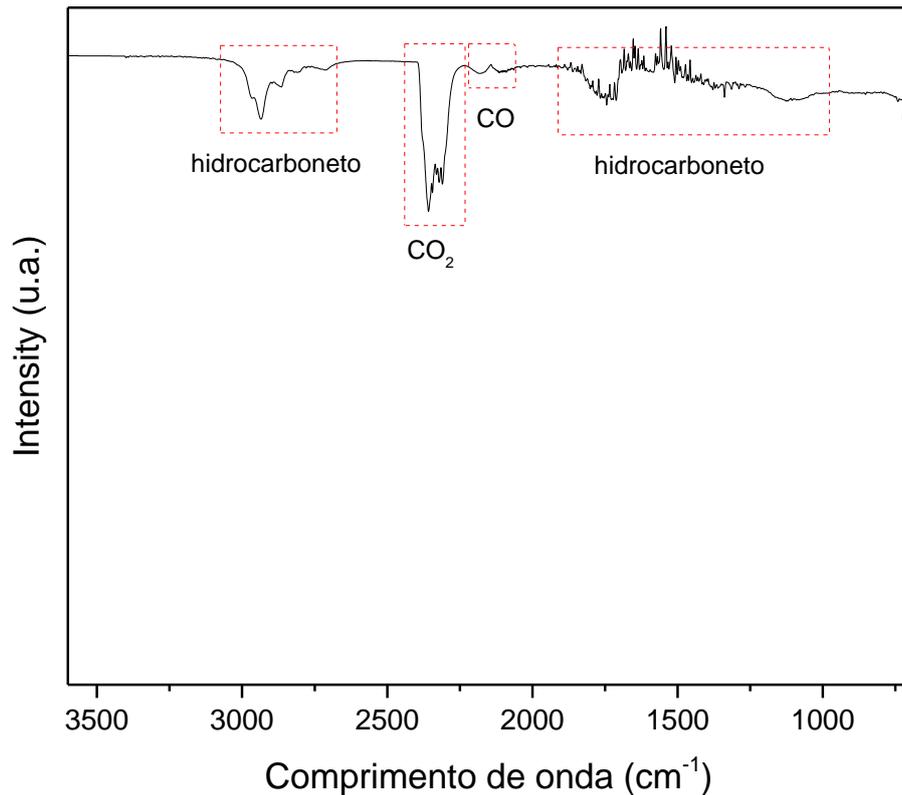


Figura 35. Espectro de FTIR dos gases desprendidos (Própria autora, obtido no *software* do equipamento).

O espectro de FTIR apresenta na primeira etapa da decomposição produtos gasosos, álcoois de cadeia longa, provavelmente oriundos da decomposição dos ácidos graxos, que geram produtos intermediários com hidroxilas ligadas a hidrocarbonetos, sendo sugeridas diversas substâncias pela base de dados do equipamento. Esse resultado está de acordo com os trabalhos descritos anteriormente na literatura (LIMA et al., 2008; ALEXANDRE et al., 2015; PARDAULI et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

5.4 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do óleo de *A. vulgare*

5.4.1 Inibição do radical DPPH[•]

A capacidade antioxidante do óleo de *A. vulgare* foi analisada pela metodologia de inibição do radical DPPH[•]. A curva analítica do radical DPPH[•] é ilustrada na Figura 36.

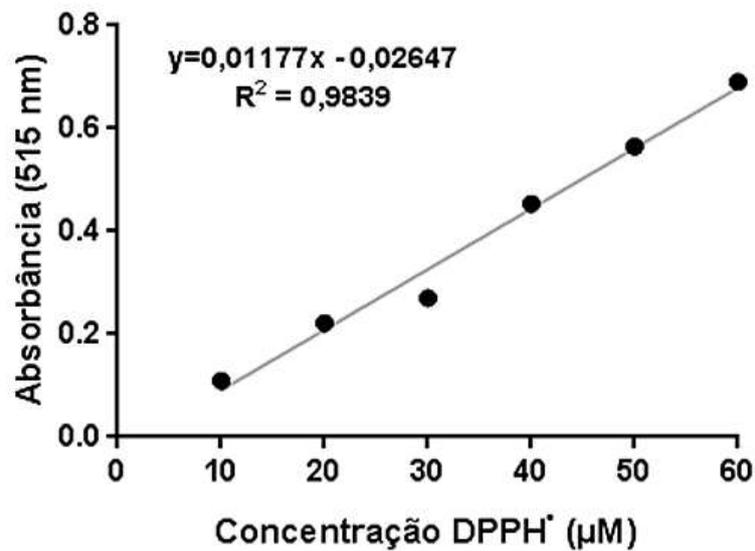


Figura 36. Curva analítica do radical DPPH[•] (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7)

A curva de inibição do radical DPPH[•] pelo óleo de *A. vulgare* é ilustrada na Figura 37.

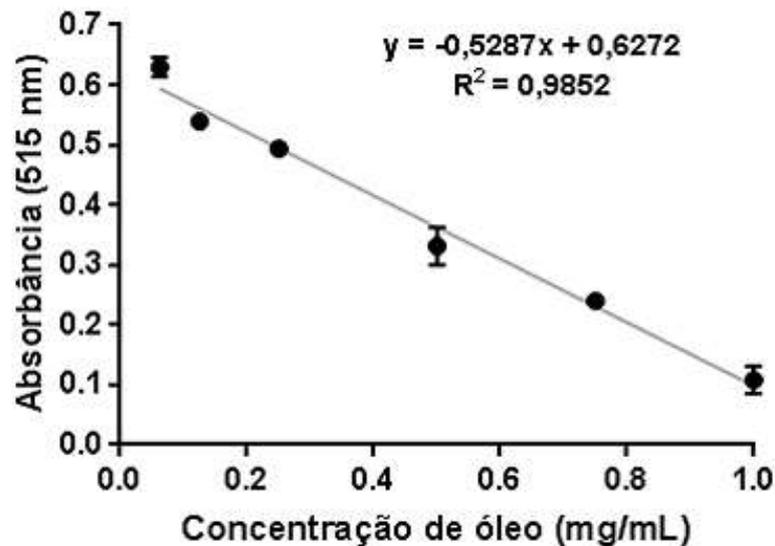


Figura 37. Curva de inibição do radical DPPH[•] pelo óleo de *A. vulgare* (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).

Esta metodologia se trata de uma reação colorimétrica, na qual há a redução da absorbância, a 515 nm, conforme ocorre a captura do radical pelo óleo de *A. vulgare* (RUFINO et al., 2007).

Para avaliar a capacidade antioxidante do óleo de *A. vulgare*, frente ao radical DPPH[•], foi calculado o valor de EC₅₀, determinado como a quantidade de óleo necessária para inibir 50% dos radicais livres presentes na solução. Quanto menor o valor de EC₅₀, maior a capacidade antioxidante, pois são necessárias menores quantidades de amostra para reduzir em 50% o radical livre DPPH[•].

O valor de EC₅₀ foi calculado substituindo em y, na equação da reta da curva de inibição do DPPH[•], o valor da absorbância encontrada para 30 µM de DPPH[•]. O valor de EC₅₀, frente ao radical DPPH[•], foi determinado como 0,676 mg/mL.

Santos e colaboradores determinaram o valor de EC₅₀ como 3343 g/g de DPPH[•] (SANTOS et al., 2015). Fazendo a conversão do resultado obtido por Santos et al. (2015), para fins de comparação, obtendo o valor de 0,0544 g/g de DPPH[•], um resultado surpreendente devido à enorme diferença de atividade antioxidante, visto que

para inibir 50% do radical DPPH[•] livre na solução, foi necessária uma concentração de óleo fixo de *A. vulgare* em torno de 61 vezes menor do que a encontrada por Santos e colaboradores.

Nascimento et al. em 2019, determinaram o valor de EC₅₀, do óleo de *A. vulgare*, frente ao radical DPPH[•] como 8,59 µg/mL, uma concentração 78 vezes menor do que a determinada no presente trabalho, para inibir 50% do radical (NASCIMENTO et al., 2019).

Sabe-se que fatores ambientais, como época do ano de coleta, horário em que foi realizada a coleta do material vegetal, índice pluviométrico, presença de parasitas e de animais herbívoros, influenciam diretamente na produção dos metabólitos secundários dos vegetais. Sendo assim, essa variação na atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] pode ser devido a diferenças na composição química do óleo fixo de frutos de tucumã (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

5.4.2 Inibição do radical ABTS^{•+}

A capacidade antioxidante do óleo de *A. vulgare* também foi analisada através da metodologia de inibição do radical ABTS^{•+}.

Essa metodologia se trata de uma reação colorimétrica na qual há a redução da absorvância, a 734 nm, conforme ocorre a captura do radical pelo óleo de *A. vulgare* (RUFINO et al., 2007).

A curva analítica do padrão Trolox é ilustrada na Figura 38.

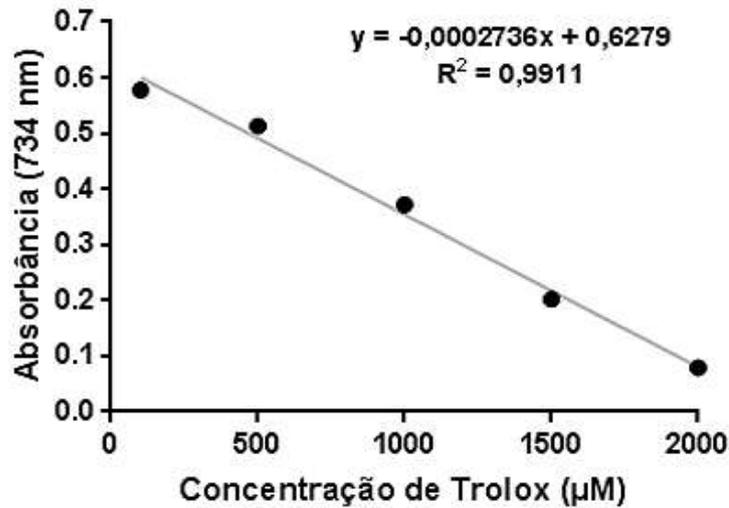


Figura 38. Curva analítica do padrão Trolox (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).

A curva de inibição do radical $ABTS^{•+}$ pelo óleo de *A. vulgare* é ilustrada na Figura 39.

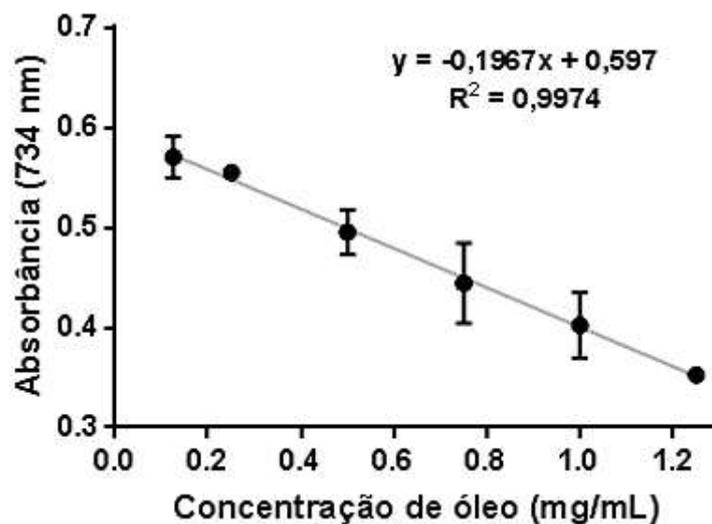


Figura 39. Curva de inibição do radical $ABTS^{•+}$ pelo óleo de *A. vulgare* (Própria autora, criado em GraphPad Prism 7).

Para avaliar a capacidade antioxidante do óleo de *A. vulgare* frente ao radical $ABTS^{•+}$, foi calculado o valor da capacidade antioxidante do equivalente Trolox, ou TEAC.

O valor de TEAC foi calculado substituindo o y, da equação da reta da curva de inibição do radical ABTS^{•+}, o valor da absorbância encontrada para 1000 µM de Trolox e, em seguida, o resultado foi dividido por 1000, obtendo-se, assim, o valor de 908,29 µM Trolox/mg de óleo.

Nascimento e colaboradores (2019) determinaram o valor de TEAC para o óleo de *A. vulgare* como 2,99 µM Trolox/mg. Dessa maneira, a atividade obtida por Nascimento foi superior em 300 vezes (NASCIMENTO et al., 2019).

Os fatores ambientais, assim como para a atividade inibitória do radical DPPH[•], influenciam diretamente sobre a atividade inibitória para o radical ABTS^{•+} (GOBBONETO; LOPES, 2007). Além disso, segundo Silva et al., 2016, as espécies vegetais podem produzir metabólitos secundários que prolongam o ponto final da reação, levando a falsos valores baixos de TEAC (SILVA et al., 2016).

Uma estratégia para solucionar este problema, apresentado por Silva e colaboradores (2016), seria a avaliação da cinética da reação para que, somente após o ponto final da reação, a determinação do valor do TEAC fosse realizada, garantindo, assim, resultados mais precisos.

5.4.3 Sistema β-caroteno/Ácido Linoleico

Após a realização das leituras do controle positivo, das amostras e da solução sistema, foi determinado o percentual de inibição da oxidação. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Percentual de inibição da oxidação

Amostra	Inibição da oxidação (%)
Trolox	82,17
0,500 mg/mL	15,69
1,000 mg/mL	33,95
1,500 mg/mL	47,36

O sistema β -caroteno/Ácido linoleico se trata de um ensaio colorimétrico, que avalia a capacidade da amostra, em teste, de inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, que oxidam o β -caroteno (RUFINO et al., 2006; ALVES et al., 2010). O radical livre é formado após a perda do átomo de hidrogênio, localizado entre duas ligações duplas do ácido linoleico, que gera a perda da conjugação e, conseqüentemente, reduz a absorvância (KONCIC et al., 2010; MRAIHI et al., 2013).

Santos e colaboradores determinaram o percentual de inibição da oxidação pelo óleo de *A. vulgare* como 92%; porém, não citam para qual concentração essa inibição foi calculada (SANTOS et al., 2015).

Sabe-se que a atividade inibitória da oxidação é dependente da concentração de antioxidante presente no meio reacional; ou seja, quanto maior a quantidade de óleo de *A. vulgare* presente na solução contendo o sistema β -caroteno/Ácido linoleico, maior será o percentual de inibição da oxidação (KONCIC et al., 2010; SANTOS et al., 2015).

Segundo Hassimotto et al., um ativo pode ser classificado de acordo com o percentual de inibição da oxidação lipídica em: alta atividade antioxidante, quando o percentual fica acima de 70%; atividade antioxidante intermediária, entre 40% e 70% de inibição e baixa atividade antioxidante, quando o valor de inibição da oxidação encontra-se inferior a 40% (HASSIMOTTO et al., 2005).

Dessa maneira, o óleo de *A. vulgare* apresenta baixa atividade antioxidante quando utilizado nas concentrações de 0,500 e 1,000 mg/mL e atividade antioxidante intermediária quando utilizado na concentração de 1,500 mg/mL, por essa metodologia. Esse resultado corrobora que a inibição da oxidação é dependente da concentração de ativo no meio reacional.

Embora o controle positivo estivesse em uma concentração 133 vezes maior que o óleo de *A. vulgare*, apresentou uma inibição da oxidação somente 1,8 vezes superior ao óleo, sugerindo, assim, que o óleo de *A. vulgare*, quando for utilizado em concentrações mais elevadas, poderá apresentar inibição da oxidação similar ou superior ao Trolox.

5.5 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pelo óleo de *A. vulgare*

Para a avaliação da atividade inibitória da enzima tirosinase foi utilizada a metodologia descrita por Teixeira et al., 2012, com modificações.

Após a realização das leituras do controle positivo (ácido kójico), do controle negativo (acetona) e da amostra (óleo de *A. vulgare*) e o cálculo da respectiva atividade inibitória percentual (AI%), nos tempos de 60 (t_1) e 120 min (t_2), foram obtidos os resultados descritos na Tabela 5.

Tabela 5. Atividade inibitória percentual (AI%) frente à enzima tirosinase pelo óleo de *A. vulgare*.

Amostra	AI t₁ (%)	AI t₂ (%)
ácido kójico	76,53 ^a	62,42 ^a
óleo de <i>A. vulgare</i>	96,94 ^b	99,33 ^b

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA Two-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

O ácido kójico é um ativo amplamente utilizado para o clareamento de melasma na pele, visto que é um potente inibidor competitivo da tirosinase e atua pelo mecanismo de quelação do cobre no sítio ativo da tirosinase e, conseqüentemente, impede a conversão de L-tirosina em L-DOPA, suspendendo o processo de formação da melanina (CHO et al., 2012).

Entretanto, a atividade inibitória apresentada pelo ácido kójico é limitada, sendo necessário seu uso em elevada concentração nos produtos cosméticos, podendo ocasionar irritações na pele, além de seu potencial carcinogênico e por apresentar baixa estabilidade durante o armazenamento (CHO et al., 2012; PILLAIYAR et al., 2017; MUKHERJEE, et al., 2018).

Além disso, o ácido kójico apresenta uma redução de, aproximadamente, 20% na atividade inibitória, após a primeira hora de reação, sugerindo que haja a necessidade de reaplicação do produto para que a atividade se mantenha; contudo, o óleo fixo de *A. vulgare* mostrou-se superior ao ácido kójico, já na primeira hora de reação, atingindo o percentual de inibição da enzima tirosinase de 96,94%. Na segunda hora de reação, enquanto o ácido kójico demonstrou um decaimento, o óleo de *A. vulgare* atingiu quase 100% de inibição da tirosinase, mostrando um potencial substancial frente à atividade despigmentante, por esse mecanismo de ação de inibição competitiva.

Além disso, estudos sugerem que o excesso de radicais livres pode ativar a tirosinase e, conseqüentemente, aumentar a síntese de melanina na pele e o óleo de *A. vulgare* mostrou ter uma importante atividade antioxidante sendo, portanto, um potencial ativo despigmentante da pele, visto que, além de possuir atividade inibitória da tirosinase, apresenta atividade antioxidante (TOMITA et al., 1984; KHAZAELI et al., 2009; SARKAR et al., 2020).

5.6 Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) da fase oleosa e obtenção das nanoemulsões

Para a determinação do EHLr da fase oleosa, contendo óleo de *A. vulgare* (OT) e Isopropyl Palmitate (PIP) foram preparadas formulações com diferentes proporções de tensoativos PPG-5-Ceteth-20 (PAWS) e Sorbitan Oleate (S80), a fim de se obter uma ampla faixa de EHL, demonstrada na Tabela 6.

Tabela 6. Composição percentual das formulações para a determinação do EHLr

COMPOSIÇÃO % (p/p)					
EHL	PAWS	S80	OT	PIP	H₂O
16	10,00	-	5,00	5,00	80,00
15	9,15	0,85	5,00	5,00	80,00
14	8,29	1,71	5,00	5,00	80,00
13	7,44	2,56	5,00	5,00	80,00
12	6,58	3,42	5,00	5,00	80,00
11	5,73	4,27	5,00	5,00	80,00
10	4,87	5,13	5,00	5,00	80,00
9	4,02	5,98	5,00	5,00	80,00
8	3,16	6,84	5,00	5,00	80,00
7	2,31	7,69	5,00	5,00	80,00

A quantidade de óleo de *A. vulgare*, de Isopropyl Palmitate e de água foram mantidas fixas e somente a quantidade de cada tensoativo foi modificada, a fim de se obter os valores de EHL para cada formulação. Foram preparadas dez formulações com diferentes valores de EHL e, conseqüentemente, diferentes aspectos macroscópicos (Figura 40).

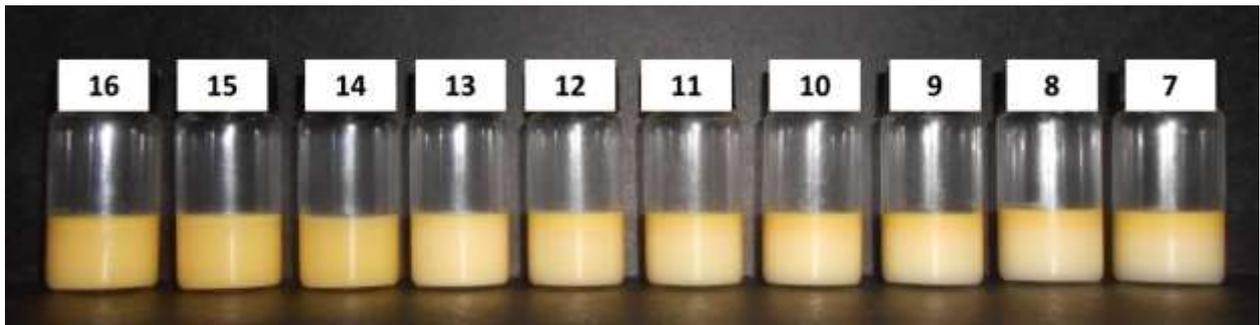


Figura 40. Formulações para a determinação do EHLr da fase oleosa, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após a avaliação macroscópica de estabilidade como formação de cremagem, floculação e separação de fases, somente a formulação com EHL 14 não apresentou nenhum dos parâmetros de instabilidade avaliados. Além disso, apresentou-se homogênea, fluida e com reflexo azulado. Dessa maneira, o valor de EHLr para a fase oleosa da formulação contendo óleo de *A. vulgare* e Isopropyl Palmitate, foi determinado como 14.

A determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) é um índice de afinidade entre o óleo e o tensoativo ($EHL < 10$) ou entre o óleo e a água ($EHL > 10$) (GRIFFIN, 1949) e pode ser utilizado como uma estratégia para obter-se nanoemulsões mais estáveis (TADROS et al., 2004; SOLANS et al., 2005; FERNANDES et al., 2014; DUARTE et al., 2015; AULTON; TAYLOR, 2016; JESUS et al., 2017).

Em geral, misturas de tensoativos tendem a formar nanoemulsões com maior grau de estabilidade do que formulações que utilizam apenas um tensoativo com o valor de EHLr (FRIBERG; JANSSON; CEDERBERG, 1976; McCLEMENTS; RAO, 2011; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Além disso, formulações com EHLr menor que 7 tendem a formar nanoemulsões do tipo água em óleo e formulações com EHLr maior que 7 tendem a se apresentar na forma de óleo em água (TADROS et al., 2004; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Para a determinação do EHLr e da obtenção das nanoemulsões, foi utilizada a metodologia de inversão de fases por composição (PIC ou EPI), que consiste na adição da fase aquosa sobre a fase orgânica, contendo o óleo e os tensoativos, de forma lenta e gradual, sob agitação constante, sem necessidade de aquecimento (MAESTRO et al., 2008; SOLANS; SOLÉ, 2012; KOMAIKO et al., 2015; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Esta adição da fase aquosa, na forma de titulação, leva à transição de fases da formulação que, inicialmente, apresenta-se na forma de A/O, depois uma emulsão múltipla do tipo O/A/O, terminando como uma formulação O/A (MAESTRO et al., 2008; SOLAN; SOLÉ, 2012; KOMAIKO et al., 2015; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Esta alteração na curvatura do tensoativo ocorre em metodologias de baixo aporte energético, que utilizam aquecimento (PIT) ou não (PIC) (FORGIARINI et al., 2000; MAESTRO et al., 2008; SOLAN; SOLÉ, 2012; KOMAIKO et al., 2015; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Para o óleo fixo de frutos de *A. vulgare* só foi encontrado um trabalho descrito na literatura com o objetivo de determinar o EHLr do seu óleo e obter uma nanoemulsão. Foi descrito por Silva e colaboradores que o EHLr do óleo de *A. vulgare* apresentava o valor de 13 e foi obtida uma nanoemulsão com tamanho médio de gotícula de 156,6

nm, utilizando metodologia de alto aporte energético, por meio de homogeneizador Ultra-Turrax (SILVA et al., 2015).

A diferença no valor de EHLr requerido deve-se, possivelmente, à diferença de composição da formulação, visto que a nanoemulsão obtida por Silva e colaboradores não contém Isopropyl Palmitate que, por se tratar de uma substância com caráter graxo, pode ter deslocado o valor de EHLr da formulação. Além disso, o óleo de *A. vulgare* utilizado por Silva et al. (2015), foi extraído da polpa do fruto utilizando solvente orgânico (ciclohexano) em aparato Soxhlet, o que certamente influencia na composição química do óleo de *A. vulgare*, fator que está diretamente ligado ao valor de EHLr do óleo (GRIFFIN, 1949; KUNIEDA et al., 1989; IZQUIERDO et al., 2002; ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002).

5.7 Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação

A determinação do valor de EHLr é uma estratégia para a obtenção de nanoemulsões estáveis; entretanto, essa estratégia possui limitações, descritas inclusive por Griffin, em seu trabalho que apresentou a escala EHL para o mundo (GRIFFIN, 1949; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

A escala do EHL não leva em consideração as interações químicas que ocorrem entre as substâncias presentes na formulação e, dessa maneira, é necessário avaliar o comportamento das formulações quando ocorre a substituição de um tensoativo por outro, no mesmo valor de EHLr, pois o comportamento físico-químico pode ser completamente alterado com a mudança de estrutura física de um dos componentes da formulação (AULTON; TAYLOR, 2016; JESUS et al., 2017; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Nesse contexto, após a determinação do valor de EHLr da fase oleosa foram

avaliados 35 diferentes pares de tensoativos, a fim de se verificar o comportamento das formulações, quando da alteração das estruturas químicas dos tensoativos empregados na formulação para o EHLr 14; ou seja, foi avaliado se a mudança de estrutura dos tensoativos iria promover o aparecimento de instabilidade como a formação de cremagem, floculação ou separação de fases ou proporcionar uma melhoria na estabilidade e no aspecto da formulação. Inicialmente, foram avaliados os pares de tensoativos descritos na Tabela 7. As formulações obtidas estão ilustradas na Figura 41.

Tabela 7. Composição percentual das formulações F1 a F7

COMPOSIÇÃO % (p/p)											
FORM	PAWS	P6MO	T85	P4MO	P6DO	P4DO	S80	S85	ÓLEO	PIP	H ₂ O
F1	3,33	6,67							5,00	5,00	80,00
F2	6,00		4,00						5,00	5,00	80,00
F3	6,00			4,00					5,00	5,00	80,00
F4	6,67				3,33				5,00	5,00	80,00
F5	7,33					2,67			5,00	5,00	80,00
F6	8,59							1,41	5,00	5,00	80,00
F7	8,29						1,71		5,00	5,00	80,00

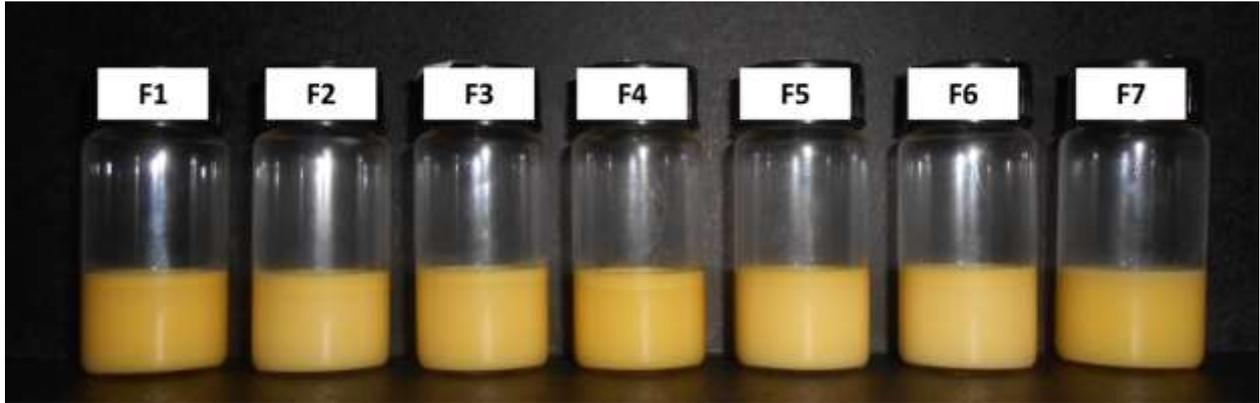


Figura 41. Formulações (F1 a F7) para a determinação do melhor par de tensoativos, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após 24 horas em repouso, apenas a formulação F7 não apresentou, macroscopicamente, os parâmetros de instabilidade avaliados. Em seguida, o PAWS foi substituído pelo T80 e novas formulações foram preparadas. A composição dessas formulações está descrita na Tabela 8 e a Figura 42 ilustra as formulações obtidas.

Tabela 8. Composição percentual das formulações F8 a F14

COMPOSIÇÃO % (p/p)											
FORM	T80	P6MO	T85	P4MO	P6DO	P4DO	S80	S85	ÓLEO	PIP	H ₂ O
F8	5,00	5,00							5,00	5,00	80,00
F9	7,50		2,50						5,00	5,00	80,00
F10	7,50			2,50					5,00	5,00	80,00
F11	8,00				2,00				5,00	5,00	80,00
F12	8,46					1,54			5,00	5,00	80,00
F13	9,07						0,93		5,00	5,00	80,00
F14	9,24							0,76	5,00	5,00	80,00

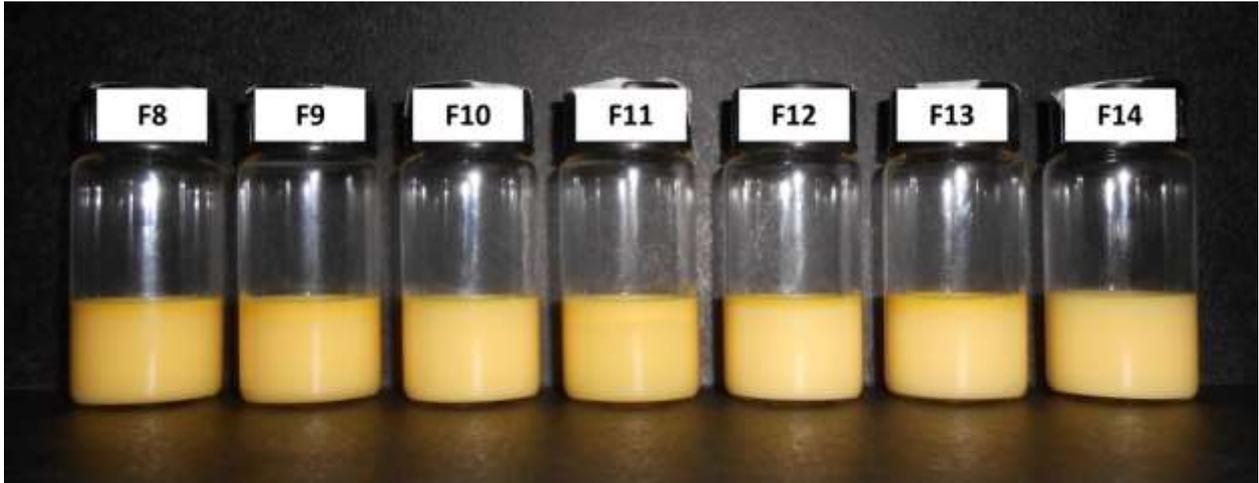


Figura 42. Formulações (F8 a F14) para a determinação do melhor par de tensoativos, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após 24 horas em repouso, todas as formulações apresentaram a formação de cremagem. Em seguida, mais sete formulações foram preparadas com a substituição de T80 por T20. A composição dessas formulações está descrita na Tabela 9 e a Figura 43 ilustra as formulações obtidas.

Tabela 9. Composição percentual das formulações F15 a F21

COMPOSIÇÃO % (p/p)											
FORM	T20	P6MO	T85	P4MO	P6DO	P4DO	S80	S85	ÓLEO	PIP	H ₂ O
F15	2,70	7,30							5,00	5,00	80,00
F16	5,26			4,74					5,00	5,00	80,00
F17	5,26		4,74						5,00	5,00	80,00
F18	5,97				4,03				5,00	5,00	80,00
F19	6,71					3,29			5,00	5,00	80,00
F20	7,82						2,18		5,00	5,00	80,00
F21	8,19							1,81	5,00	5,00	80,00

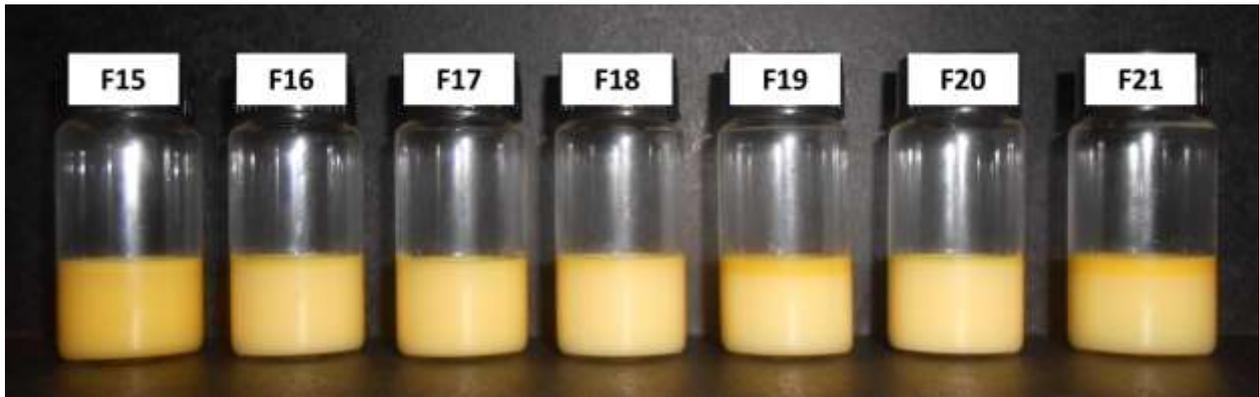


Figura 43. Formulações (F15 a F21) para a determinação do melhor par de tensoativo, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após 24 horas em repouso, todas as formulações contendo T20 apresentaram formação de cremagem.

Após a avaliação macroscópica, T20 foi substituído por T60 e mais sete formulações foram preparadas. A composição das formulações está descrita na Tabela 10 e a Figura 44 ilustra as formulações obtidas com T60.

Tabela 10. Composição percentual das formulações F22 a F28

FORM	COMPOSIÇÃO % (p/p)										
	T60	P6MO	T85	P4MO	P6DO	P4DO	S80	S85	ÓLEO	PIP	H ₂ O
F22	5,26	4,74							5,00	5,00	80,00
F23	7,69			2,31					5,00	5,00	80,00
F24	7,69		2,31						5,00	5,00	80,00
F25	8,16				1,84				5,00	5,00	80,00
F26	8,59					1,41			5,00	5,00	80,00
F27	9,15						0,85		5,00	5,00	80,00
F28	9,31							0,69	5,00	5,00	80,00

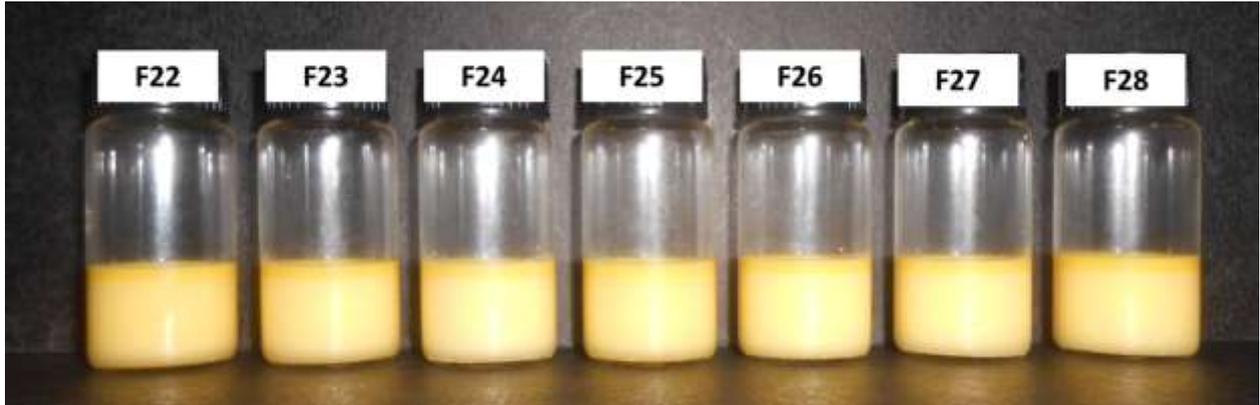


Figura 44. Formulações (F22 a F28) para a determinação do melhor par de tensoativos, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após 24 horas em repouso, todas as formulações apresentaram formação de cremagem. Dessa maneira, o T60 foi substituído por T40 e a composição das formulações obtidas está descrita na Tabela 11 e ilustradas na Figura 45.

Tabela 11. Composição percentual das formulações F29 a F35

COMPOSIÇÃO % (p/p)											
FORM	T40	P6MO	T85	P4MO	P6DO	P4DO	S80	S85	ÓLEO	PIP	H ₂ O
F29	3,85	6,15							5,00	5,00	80,00
F30	6,52		3,48						5,00	5,00	80,00
F31	6,52			3,48					5,00	5,00	80,00
F32	7,14				2,86				5,00	5,00	80,00
F33	7,75					2,25			5,00	5,00	80,00
F34	8,58						1,42		5,00	5,00	80,00
F35	8,84							1,16	5,00	5,00	80,00

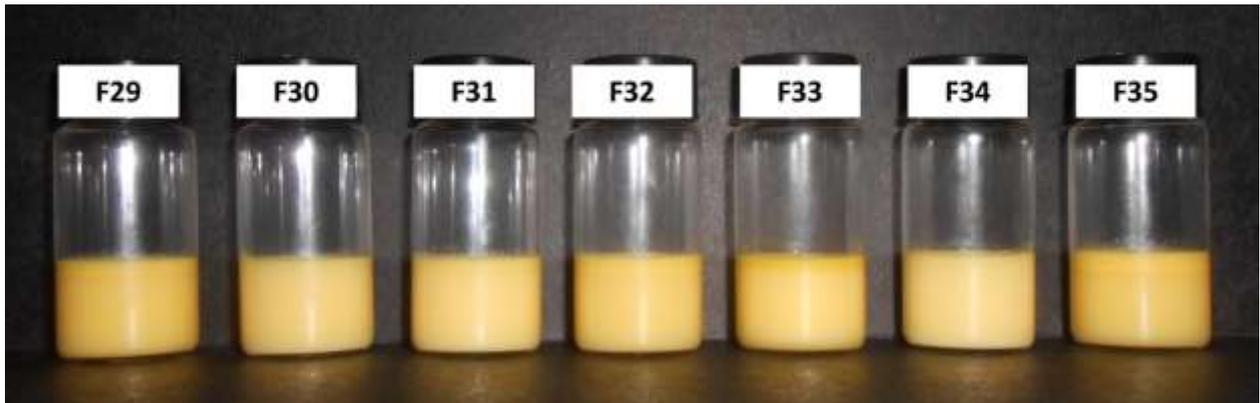


Figura 45. Formulações (F29 a F35) para a determinação do melhor par de tensoativos, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após 24 horas em repouso, apenas a formulação F30, entre as sete preparadas contendo T40, não apresentou a formação de cremagem.

Após a avaliação macroscópica de estabilidade de todas as 35 formulações, as formulações F7 e F30 (Figura 46) não apresentaram nenhum dos parâmetros de instabilidade determinados, após 24 horas em repouso, sendo escolhidas as melhores e seguiram para as etapas posteriores de análise.

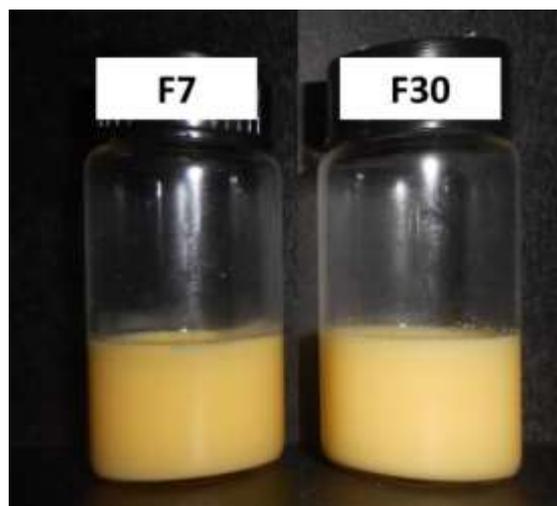


Figura 46. Melhores formulações após 24 horas em repouso (Própria autora).

As formulações obtidas (F7 e F30) apresentam composição diferente e, conseqüentemente, interação química variada devido à estrutura química dos tensoativos utilizados.

A formulação F7 possui, em sua composição, os tensoativos PAWS e S80. PAWS trata-se de uma mistura de álcoois graxos etoxilados, saturada em álcool cetílico etoxilado. A cadeia cetílica é constituída por 16 átomos de carbono (UL PROSPECTOR, 2020), embora apresente, também, álcoois de 14 a 18 átomos de carbono. S80 trata-se de um derivado da reação do sorbitol com ácido oleico, que gera um éster de sorbitano que possui 18 carbonos na cadeia lateral alifática. Ambos os tensoativos têm seu uso indicado para a produção de emulsões do tipo O/A (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

Sabe-se que os tensoativos, quando utilizados em concentração acima da concentração micelar crítica (CMC), formam micelas e que o interior dessas micelas apresenta propriedades similares às das cadeias hidrocarbônicas que constituem os tensoativos (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; AULTON; TAYLOR, 2016). Dessa maneira, o interior das micelas formadas pela mistura do par de tensoativo PAWS e S80 apresentarão propriedades similares às cadeias carbônicas cetílica do PAWS e alifática do S80.

Desta forma, o interior das micelas é capaz de solubilizar os ácidos graxos que constituem, majoritariamente, o óleo de *A. vulgare*, os ácidos palmítico e oleico, visto que o ácido palmítico apresenta uma cadeia carbônica contendo 16 átomos de carbono, como a cadeia cetílica de PAWS, e o ácido oleico apresenta 18 carbonos em sua cadeia carbônica, como S80.

A formulação F30 possui em sua composição os tensoativos T40 e T85. T40 trata-se do palmitato de polioxietileno sorbitano, ou seja, possui uma cadeia carbônica

palmítica, que contém 16 carbonos. T85 é o trioleato de polioxietileno sorbitano, um derivado do ácido oleico e apresenta cadeia carbônica com 18 átomos de carbono (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; MERCK, 2020; UL PROSPECTOR, 2020).

De forma análoga à F7, F30 apresenta o interior das suas micelas com propriedades similares às dos ácidos palmítico e oleico sendo, portanto, capaz de solubilizar o óleo de *A. vulgare*.

Os demais tensoativos utilizados como P6MO, P6DO, P4MO e P4DO, embora tenham, na sua estrutura, derivados do ácido oleico, possuem a cadeia polimérica de etilenoglicol, o que confere maior complexidade à estrutura do tensoativo, além de tornar a estrutura maior, o que pode gerar um impedimento estérico e dificultar a interação química entre os componentes do óleo de *A. vulgare* e a cadeia oleica do tensoativo (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

5.8 Caracterização das nanoemulsões

As formulações F7 e F30 (Tabela 12) foram eleitas as melhores, quanto aos parâmetros de instabilidade macroscópicas avaliados e foram caracterizadas quanto ao tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta.

Tabela 12. Composição percentual das formulações F7 e F30

FORM	COMPOSIÇÃO % (p/p)						
	PAWS	S80	T40	T85	Óleo	PIP	H ₂ O
F7	8,29	1,71	-	-	5,00	5,00	80,00
F30	-	-	6,52	3,84	5,00	5,00	80,00

A caracterização das formulações foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) e foram avaliados o tamanho médio de gotícula, o índice de polidispersão e o potencial zeta, após 24 horas do preparo das formulações.

O espalhamento dinâmico da luz, também conhecido como espectroscopia de correlação de fótons, consiste na emissão de um feixe de luz diretamente na amostra e as oscilações de intensidade-tempo do feixe de luz refletido ou transmitido, são medidas (JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O tamanho das gotículas é determinado a partir das mudanças na frequência do feixe de luz, que incide sobre a amostra, devido ao movimento Browniano das gotículas presentes na suspensão coloidal (JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Além disso, para partículas esféricas em suspensões diluídas, como as nanoemulsões, o raio hidrodinâmico da partícula pode ser calculado, a partir da equação de Stokes-Einstein (GRAPENTIN et al., 2015; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O potencial zeta é utilizado como um parâmetro para avaliação da estabilidade das formulações, frente à floculação, e é determinado observando o movimento das gotículas pela influência da corrente elétrica (AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Quando seu valor se encontra superior a 30 mV, em módulo, indica que as forças repulsivas da dupla camada estão atuando com maior intensidade do que as forças atrativas de Van der Waals; assim, há menor tendência à formação de floculado e, conseqüentemente, menor possibilidade de ocorrer coalescência e quebra da emulsão (FRIBERG; JANSSON; CEDERBERG, 1976; MAHDI et al., 2011; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O índice de polidispersão (PDI) indica a variedade de populações de micelas presentes na formulação; ou seja, quanto maior o valor de PDI, maior a variabilidade populacional. Sabe-se que, em preparações farmacêuticas, é incomum que as

gotículas sejam completamente monodispersas, sendo mais comumente encontrados sistemas polidispersos; entretanto, um sistema com baixo índice de polidispersão é um sistema mais estável e, portanto, um gráfico de dispersão monomodal é o desejável (AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Os resultados obtidos encontram-se descritos na Tabela 13.

Tabela 13. Caracterização das formulações F7 e F30, quanto ao tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
F7	151,0 ± 0,404 ^a	0,273 ± 0,008 ^c	-0,579 ± 0,448 ^e
F30	170,6 ± 1,301 ^b	0,484 ± 0,030 ^d	-16,5 ± 1,31 ^f

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA One-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$

Após a análise estatística dos resultados e avaliação dos gráficos, obtidos no software do equipamento, ambas as formulações desenvolvidas atendiam aos requisitos para serem classificadas como nanoemulsões.

Uma nanoemulsão típica é um sistema cineticamente estável, com tamanho de gotícula de até 200 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial zeta maior que 30 mV em módulo (IZQUIERDO et al., 2004; SOLANS et al., 2005; ANTON et al., 2007; GUTIÉRREZ et al., 2008; MAESTRO et al., 2008; GUTTOFF et al., 2015; KOMAIKO et al., 2015; MUSAZZI et al., 2018 BRUXEL et al., 2012; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Embora ambas as formulações estejam dentro dos parâmetros estabelecidos, para serem classificadas como nanoemulsões, a formulação F7 apresentou menor tamanho médio de gotícula (151,0 nm) e melhor valor de índice de polidispersão

(0,273), sugerindo uma dispersão mais homogênea das gotículas de óleo na fase aquosa.

Tanto F7 quanto F30 apresentaram valores de potencial zeta fora da faixa ideal de estabilidade; porém, esse parâmetro pode ser melhorado quando são realizadas modificações na proporção dos constituintes da formulação dentro do diagrama de fases (JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

Sendo assim, os tensoativos PPG-5-Ceteth-20 e Sorbitan oleate foram determinados como o melhor par de tensoativos para o EHL 14, requerido pela fase oleosa, contendo óleo de *A. vulgare* e Isopropyl Palmitate.

5.9 Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário

A fim de se determinar a região de formação de nanoemulsões, obter formulações mais estáveis, com sensorial agradável e melhorar os valores obtidos de potencial zeta, foi utilizado o diagrama de fases pseudoternário, variando a .composição percentual dos componentes da formulação. Dessa maneira, foram preparadas formulações nos 36 pontos do diagrama. A Figura 47 ilustra as formulações obtidas nos pontos 1 a 15.

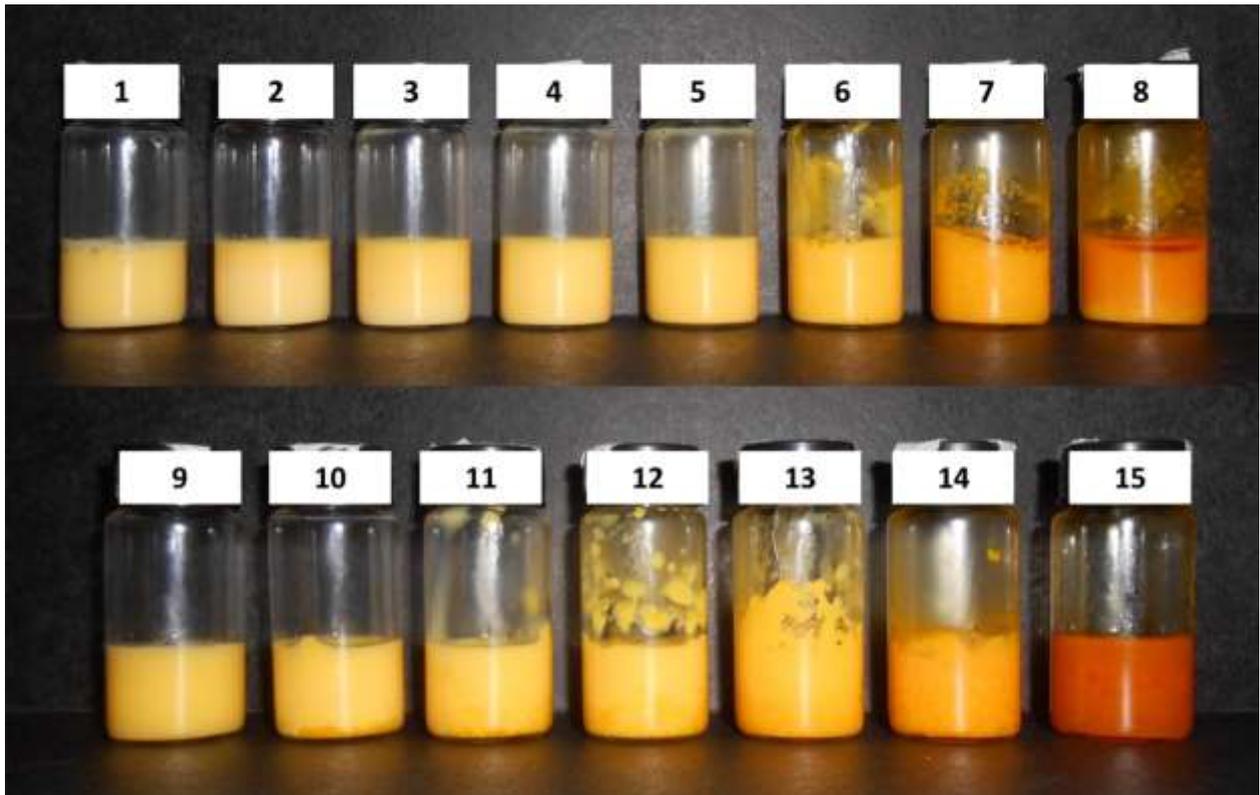


Figura 47. Formulações obtidas nos pontos 1 a 15 do diagrama pseudoternário, após 24 horas em repouso (Própria autora).

A Figura 48 ilustra as formulações obtidas nos pontos 16 a 30.

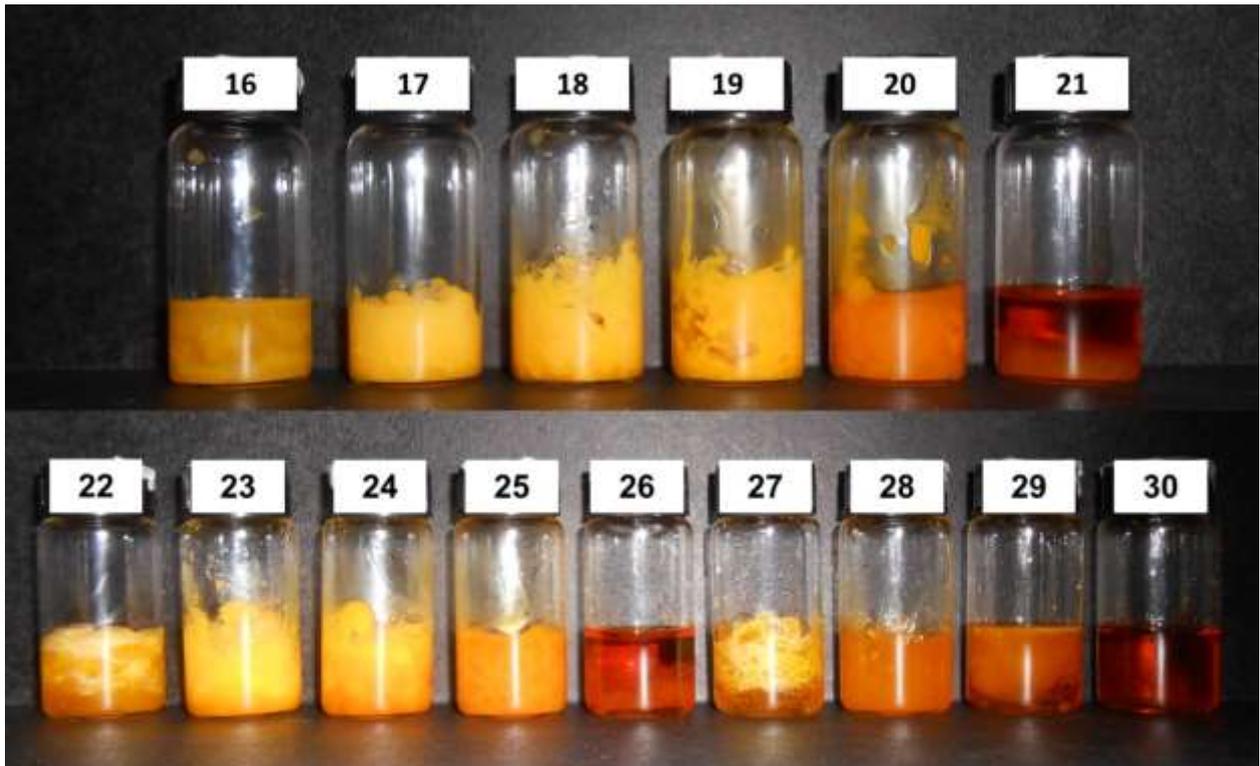


Figura 48. Formulações obtidas nos pontos 16 a 30 do diagrama pseudoternário, após 24 horas em repouso (Própria autora).

A Figura 49 ilustra as formulações obtidas nos pontos 31 a 36 do diagrama.

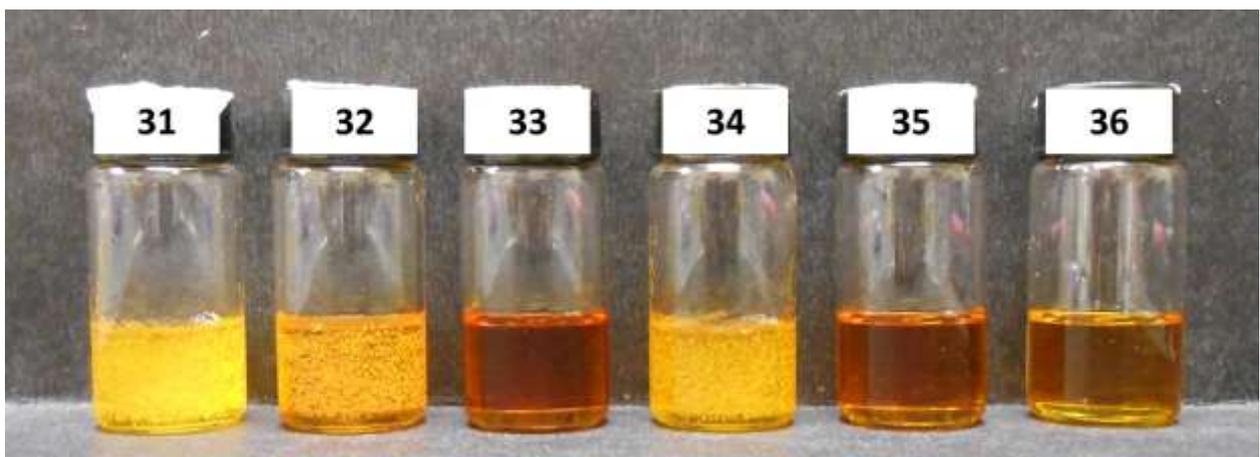


Figura 49. Formulações obtidas nos pontos 31 a 36 do diagrama pseudoternário, após 24 horas em repouso (Própria autora).

Após a avaliação macroscópica das formulações, após 24 horas em repouso, somente as formulações obtidas nos pontos 1 e 9 não apresentaram formação de cremagem, sedimento e/ou separação de fases, além de se mostrarem fluidas e com reflexo azulado. Dessa maneira, a região de nanoemulsão foi determinada conforme ilustrada na Figura 50.

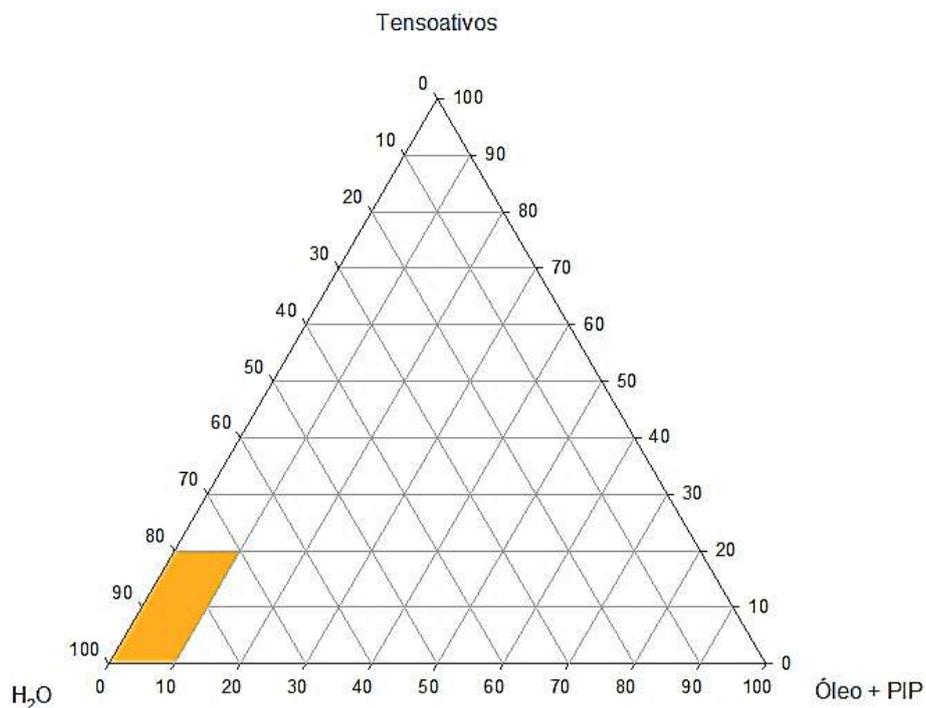


Figura 50. Região de formação de nanoemulsão no diagrama pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).

A região de formação das nanoemulsões encontrada está de acordo com o descrito na literatura, para o método de baixo aporte de energia (FORGIARINI et al., 2000; MAESTRO et al., 2008; SOLANS; SOLÉ, 2012; ROCHA-FILHO et al., 2017). Dessa maneira, qualquer formulação preparada, com composição dentro da faixa determinada, irá gerar uma nanoemulsão, embora nem todas apresentem estabilidade.

Nesse contexto, foram preparadas mais 24 formulações a fim de se melhorar o aspecto sensorial das nanoemulsões e eleger apenas uma como produto final. Foram

utilizados 24 pontos intermediários dentro da região de formação da nanoemulsão (Figura 51).

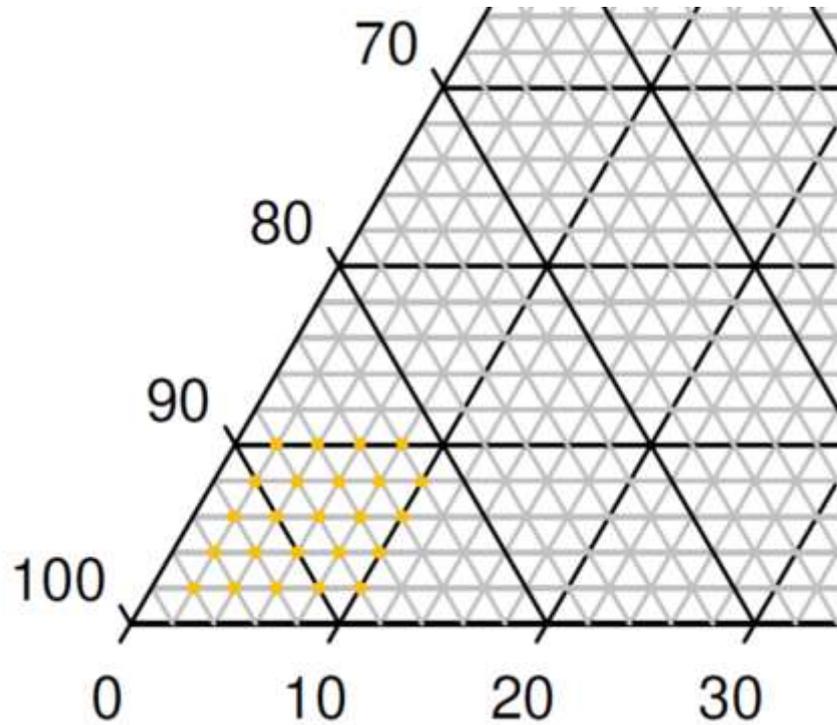


Figura 51. Pontos intermediários do diagrama pseudoternário (Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0).

A figura 52 ilustra as formulações obtidas nos pontos N1 a N15.



Figura 52. Formulações obtidas nos pontos intermediários N1 a N15 do diagrama pseudoternário, após 24 horas em repouso (Própria autora).

As formulações obtidas nos pontos N16 a N24 estão ilustradas na figura 53.



Figura 53. Formulações obtidas nos pontos intermediários N16 a N24 do diagrama pseudoternário, após 24 h em repouso (Própria autora).

Após a análise macroscópica, após 24 horas de repouso, as formulações que não apresentaram sinais de instabilidade, como formação de cremagem, foram

analisadas quanto ao tamanho de gotícula, PDI e potencial zeta. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Caracterização das melhores nanoemulsões do diagrama.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
N1	167,3 ± 3,027 ^a	0,265 ± 0,013 ^h	-26,5 ± 0,208 ^m
N6	190,9 ± 2,658 ^b	0,393 ± 0,021 ⁱ	-19,6 ± 0,321 ⁿ
N11	92,04 ± 0,844 ^c	0,532 ± 0,006 ^j	-18,9 ± 0,265 ^{n,o}
N12	158,4 ± 1,311 ^{a,e}	0,374 ± 0,006 ⁱ	-18,1 ± 0,0577 ^{n,o}
N16	36,90 ± 0,890 ^d	0,736 ± 0,027 ^k	-24,5 ± 2,63 ^m
N17	174,1 ± 2,946 ^{a,f}	0,295 ± 0,008 ^h	-20,7 ± 0,493 ^o
N21	22,32 ± 0,365 ^g	0,453 ± 0,012 ^l	-17,4 ± 0,300 ⁿ

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA One-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

Após a análise dos resultados, a formulação N17 foi escolhida como produto final, embora não apresente diferença estatística significativa com N1 no tamanho e PDI, e um potencial zeta um pouco mais distante do valor de estabilidade máxima, 30 mV, em módulo. Possui um percentual maior de óleo em sua formulação; entretanto, seu gráfico de distribuição de tamanho, por intensidade percentual, apresentou-se com maior homogeneidade (Figura 54).

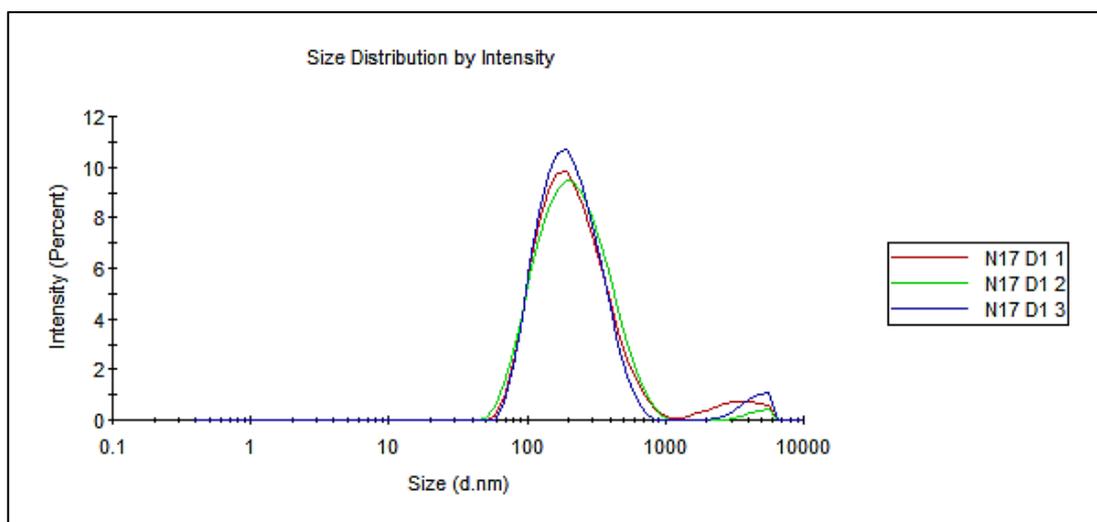


Figura 54. Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula por intensidade percentual da formulação N17 (Fonte: Zetasizer Software).

As demais formulações analisadas apresentaram valores de PDI fora do limite determinado como ideal (0,300) sendo, portanto, descartadas. A formulação escolhida como produto final foi renomeada como NE-TCM.

5.10 Avaliação da atividade inibitória *in vitro* da tirosinase pela nanoemulsão obtida

Para a avaliação da atividade inibitória da enzima tirosinase, pela nanoemulsão, foi utilizada a formulação NE-TCM, diluída em acetona, de maneira que a concentração de óleo de *A. vulgare*, contida na solução, fosse igual à utilizada no ensaio de inibição da tirosinase apenas com o óleo puro (350 µg/mL).

A absorbância da nanoemulsão foi lida por 5 horas, a cada 1 hora. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 15.

Tabela 15. Atividade inibitória percentual (AI%) frente à enzima tirosinase por NE-TCM

Amostra	AI T₁ (%)	AI T₂ (%)	AI T₃ (%)	AI T₄ (%)	AI T₅ (%)
NE-TCM	-39,22	-21,48	-5,64	1,51	1,89

Segundo a lei de Beer, a absorvância é diretamente proporcional à concentração de uma espécie absorvente; porém, essa definição só é válida para soluções diluídas que apresentam absorvância entre 0,2 e 0,9 (SKOOG et al., 2006).

Embora a concentração de óleo de *A. vulgare* estivesse igual à utilizada no ensaio com o óleo livre (350 µg/mL), na solução de acetona contendo NE-TCM, estão presentes os demais componentes da formulação que podem ter influenciado para o aumento da absorvância (1,3) e, conseqüentemente, interferindo no resultado da análise.

Dessa maneira, é necessário que outras concentrações de NE-TCM sejam testadas, para que a análise da atividade inibitória da tirosinase seja realizada e avaliada de forma confiável, dentro dos parâmetros estabelecidos pela lei de Beer.

5.11 Avaliação da estabilidade da nanoemulsão obtida

Após a determinação da melhor nanoemulsão, foi iniciado o estudo de estabilidade, a fim de avaliar a influência do tempo sobre o tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta e pH.

A Tabela 16 apresenta os valores do tamanho médio de gotícula \pm o desvio padrão, durante 90 dias de análise, para as três condições de estresse.

Tabela 16. Tamanho médio de gotícula \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	Tamanho (nm)		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
1	177,7 \pm 1,494 ^a	160,7 \pm 1,334 ^c	173,1 \pm 2,378 ^h
7	171,1 \pm 2,363 ^{a,b}	172,9 \pm 2,119 ^{c,d}	177,5 \pm 3,197 ^h
14	168,2 \pm 1,706 ^{a,b}	171,9 \pm 1,972 ^{c,e}	174,4 \pm 1,822 ^h
21	168,4 \pm 1,816 ^{a,b}	166,4 \pm 2,160 ^{c,f}	178,6 \pm 4,849 ^h
30	163,7 \pm 1,838 ^b	175,1 \pm 4,450 ^{d,e,f}	177,2 \pm 4,091 ^h
45	164,3 \pm 2,497 ^{a,b}	182,1 \pm 3,494 ^{d,e}	185,7 \pm 4,393 ^h
60	169,3 \pm 3,339 ^{a,b}	205,0 \pm 2,545 ^g	175,8 \pm 1,733 ^h
75	165,0 \pm 2,619 ^{a,b}	176,6 \pm 1,396 ^{d,e,f}	176,9 \pm 2,189 ^h
90	164,9 \pm 3,239 ^{a,b}	204,4 \pm 3,265 ^g	179,0 \pm 2,289 ^h

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA Two-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

A Tabela 17 apresenta os valores da média do PDI \pm o desvio padrão, durante 90 dias de análise, para as três condições de estresse.

Tabela 17. Valor médio de PDI \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	PDI		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
1	0,331 \pm 0,017 ^a	0,261 \pm 0,007 ^b	0,334 \pm 0,028 ^g
7	0,315 \pm 0,033 ^a	0,342 \pm 0,005 ^{b,c}	0,339 \pm 0,035 ^g
14	0,304 \pm 0,019 ^a	0,294 \pm 0,019 ^{b,d}	0,377 \pm 0,021 ^g
21	0,317 \pm 0,034 ^a	0,279 \pm 0,008 ^b	0,355 \pm 0,029 ^g
30	0,328 \pm 0,017 ^a	0,332 \pm 0,017 ^{b,e,f}	0,338 \pm 0,037 ^g
45	0,356 \pm 0,030 ^a	0,376 \pm 0,019 ^{c,d,e}	0,373 \pm 0,019 ^g
60	0,354 \pm 0,477 ^a	0,401 \pm 0,515 ^{c,f}	0,334 \pm 0,032 ^g
75	0,351 \pm 0,032 ^a	0,375 \pm 0,013 ^{c,d,f}	0,340 \pm 0,034 ^g
90	0,355 \pm 0,042 ^a	0,379 \pm 0,033 ^{c,f}	0,385 \pm 0,011 ^g

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA Two-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

A Tabela 18 apresenta os valores da média do potencial zeta, em módulo, \pm o desvio padrão, durante 90 dias de análise, para as três condições de estresse.

Tabela 18. Valor médio de potencial zeta \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	Potencial zeta (mV)		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
1	17,3 \pm 0,506 ^a	16,0 \pm 0,437 ^g	18,8 \pm 0,341 ^h
7	18,7 \pm 0,195 ^a	17,8 \pm 0,177 ^g	17,6 \pm 0,035 ^h
14	16,1 \pm 0,202 ^{a,b}	18,3 \pm 0,318 ^g	17,6 \pm 0,549 ^h
21	15,8 \pm 0,516 ^{a,c}	16,3 \pm 0,406 ^g	18,3 \pm 0,560 ^h
30	16,4 \pm 0,711 ^{a,d}	17,6 \pm 0,294 ^g	19,9 \pm 0,369 ^{h,i}
45	15,4 \pm 0,352 ^{a,e}	17,0 \pm 0,294 ^g	23,6 \pm 0,625 ^j
60	15,1 \pm 0,477 ^{a,f}	16,2 \pm 0,515 ^g	18,3 \pm 0,718 ^h
75	14,4 \pm 0,282 ^{b,c,d,e,f}	16,0 \pm 0,154 ^g	22,7 \pm 0,538 ^{i,j}
90	12,8 \pm 0,412 ^{e,f}	16,7 \pm 0,710 ^g	21,1 \pm 0,321 ^{h,j}

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA Two-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

A Tabela 19 apresenta a variação da média dos valores de pH \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise, para as três condições de estresse.

Tabela 19. Valor médio de pH \pm desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	pH		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
1	3,82 \pm 0,061 ^a	3,86 \pm 0,130 ^f	3,92 \pm 0,076 ^g
7	3,69 \pm 0,066 ^{a,b}	3,85 \pm 0,068 ^f	3,95 \pm 0,132 ^{g,h}
14	3,76 \pm 0,056 ^{a,b}	3,90 \pm 0,076 ^f	3,96 \pm 0,040 ^{g,h}
21	3,63 \pm 0,067 ^{b,c,d}	3,90 \pm 0,053 ^f	3,94 \pm 0,035 ^{g,h}
30	3,70 \pm 0,110 ^{a,c,e}	3,89 \pm 0,055 ^f	3,97 \pm 0,050 ^{g,h}
45	3,73 \pm 0,029 ^{a,c,e}	3,98 \pm 0,053 ^f	4,05 \pm 0,031 ^{g,h}
60	3,59 \pm 0,051 ^{b,d,e}	3,85 \pm 0,075 ^f	4,05 \pm 0,050 ^{g,h}
75	3,69 \pm 0,015 ^{a,c,e}	3,96 \pm 0,051 ^f	4,10 \pm 0,035 ^h
90	3,51 \pm 0,049 ^d	3,84 \pm 0,015 ^f	4,06 \pm 0,032 ^{g,h}

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA Two-way, pós teste Tukey. $p < 0,05$.

As tabelas apresentadas mostram que não ocorreu variação superior a 10% no tamanho de gotícula durante 90 dias de análise, para as condições de estresse de armazenamento na estufa e no ambiente. Para a condição geladeira, a partir do 45º dia de análise, ocorreu variação superior a 10%; porém essa diferença não foi estatisticamente significativa.

Entretanto, o PDI sofreu uma variação superior a 10%, a partir do dia 7, para a condição de estresse de armazenamento na geladeira e, a partir do dia 14, para a condição de armazenamento no ambiente; porém, para a condição de estresse de armazenamento na geladeira, a variação só foi estatisticamente significativa a partir do dia 45º e, para a condição de estresse de armazenamento no ambiente, não foi estatisticamente significativa para nenhum dia de análise. Esses resultados mostram

que, embora novas populações de gotículas tenham se formado, não ocasionaram mudanças estatísticas significativas, para a condição de estresse de armazenamento no ambiente e, portanto, NE-TCM foi considerada estável durante todo o tempo de análise.

Para a condição de estresse de armazenamento na geladeira, a variação do PDI a partir do dia 45^o, provavelmente se deve ao processo de amadurecimento de Ostwald. Esse processo ocorre quando as gotículas menores reduzem e as gotículas maiores se fundem e aumentam de tamanho devido à difusão, das moléculas da fase dispersa, para a fase contínua (SOLANS et al., 2005; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018). Além disso, o óleo de *A. vulgare* quando submetido à baixa temperatura, muda de estado físico, apresentando-se na forma de uma manteiga. Dessa maneira, era esperado que o óleo apresentasse o mesmo comportamento, quando nanoemulsionado, e esta mudança no estado físico do óleo pode contribuir para o rompimento das gotículas e, conseqüentemente, favorecer o amadurecimento de Ostwald.

O potencial zeta não apresentou variação superior a 10% para a condição de estresse de armazenamento na estufa, durante os 90 dias de análise; porém, apresentou variação estatística significativa a partir do dia 75^o. Para a condição de estresse de armazenamento na geladeira, o potencial zeta apresentou variação superior a 10% nos dias 7^o e 14^o, mas estas variações não foram significativas estatisticamente. E, para a condição de armazenamento no ambiente, a formulação manteve-se estável, em relação ao potencial zeta, até o dia 45^o e essa variação foi estatisticamente significativa, além de ter sido superior a 10%. O potencial zeta é utilizado como um parâmetro para avaliação da estabilidade das formulações frente à floculação: quanto mais próximo ou superior ao valor de 30 mV, em módulo, mais as

forças repulsivas da dupla camada estão atuando, do que as forças atrativas de Van der Waals, o que sugere maior estabilidade (FRIBERG; JANSSON; CEDERBERG, 1976; MAHDI et al., 2011; AULTON; TAYLOR, 2016; JAFARI; McCLEMENTS, 2018).

O pH manteve-se estável durante os 90 dias de análise, para todas as condições de estresse de armazenamento analisadas.

O valor médio de pH de 3,8 pode promover um peeling químico na pele (YOKOMIZO et al., 2013), auxiliando na redução do melasma sendo, portanto, um ponto positivo para o produto, visto que o óleo de *A. vulgare*, o ativo da nanoemulsão, apresenta atividades inibidora da tirosinase e antioxidante. Dessa forma, o baixo valor do pH da nanoemulsão poderia promover um incremento de atividade e melhor resultado para a redução do melasma na pele (RENDON et al., 2006; RIGOPOULOS et al., 2007; SALEM et al., 2009; GUERRA et al., 2013; YOKOMIZO et al., 2013).

6 CONCLUSÕES

Após a realização de todos os ensaios, pôde-se concluir que foi possível quantificar o teor de β -caroteno no óleo fixo de frutos, sendo encontrada a concentração de 272,67 mg de β -caroteno por grama de óleo fixo de *A. vulgare*.

O perfil de decomposição térmica mostrou que o óleo mantém-se estável até 145° C e, somente a partir desta temperatura, inicia-se o processo de degradação térmica.

O óleo apresenta atividades antioxidante frente aos radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, inibidora da oxidação lipídica do sistema β -caroteno/ácido linoleico e atividade inibidora da enzima tirosinase superior à do ácido kójico.

Foi possível determinar o valor de EHLr para a fase oleosa como 14 e avaliar a influência de diferentes pares de tensoativos, sendo o par PPG-5-Ceteth-20 e Sorbitan Oleate escolhido como o melhor. Além disso, após a determinação da região de nanoemulsão, foi possível obter uma nanoemulsão com tamanho médio de gotícula de 174,1 nm, índice de polidispersão de 0,295 e potencial zeta de 20,7 mV, em módulo.

Também foi possível avaliar a estabilidade da nanoemulsão, que se mostrou estável à temperatura ambiente e na estufa, sofrendo alteração no PDI e potencial zeta apenas na condição de estresse em geladeira.

Dessa maneira, o óleo de *A. vulgare* possui um grande potencial como ativo na redução do melasma na pele. Além disso, a nanoemulsão NE-TCM apresenta um potencial no uso como nanocosmético verde, visto que sua produção utiliza métodos de baixo aporte de energia, sem aquecimento e sem uso de solventes orgânicos.

REFERÊNCIAS:

AHMED, K; LI, Y.; McCLEMENTS, D. J.; XIAO, H. Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, p. 799–807, 2012.

ALEXANDRE, E. C. F.; SILVEIRA, E. V.; CASTRO, C. F.; SALES, J. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; VIANA, L. H.; BARBOSA, L. C. A. Synthesis, characterization and study of the thermal behavior of methylic and ethylic biodiesel produced from tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) seed oil. **Fuel**, v. 161, p. 233–238, 2015.

ALVES; C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 185–199, 2008.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**: volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada – **RDC Nº 83**, 17/06/2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2859796/RDC_83_2016_.pdf/940b7b9d-9806-429e-ae11-f8ea0a375bd3>. Acesso em: 02 maio. 2020

Astrocaryum in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15674>>. Acesso em: 03 fev. 2020

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química**: questionando a vida moderna e o meio ambiente. 3ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; SAGRILLO, M. R.; COSSETIN, L. F.; SILVA, A. S.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. Tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) ameliorates hepatic antioxidant defense system in alloxan-induced diabetic mice. **Journal of Food Biochemistry**, v. 42, n. 2, e12468, 2018. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12468>.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F. S.; GRANDO, T. H.; COSSETIN, L. F.; SAGRILLO, M. R.; NASCIMENTO, K.; SILVA, A. S.; MACHADO, A. K.; CRUZ, I. B. M.; STEFANI, L. M.; KLEIN, B.; WAGNER, R.; MONTEIRO, S. G. Antihyperglycemic, antioxidant activities of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) in alloxan-induced diabetic mice, and identification of fatty acid profile by gas chromatograph: New natural source to treat hyperglycemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 270, p. 51-58, 2017a.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; DOLESKIA, P. H.; GRANDO, T. H.; SAGRILLO, M. R.; SILVA, A. S.; LEAL, D. B. R.; MONTEIRO, S. G. Treatment with tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) for diabetic mice prevents changes in seric enzymes of the

purinergic system: Improvement of immune system. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 374–379, 2017c.

BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; GRANDO, T. H.; SAGRILLO, M. R.; SILVA, A. S.; STEFANI, L. M.; MONTEIRO, S. G. The use of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) in alloxan-induced diabetic mice: effects on behavior, oxidant/antioxidant status, and enzymes involved in brain neurotransmission. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 436, p. 159–166, 2017b.

BARRETO, S. M. A. G.; MAIA, M. S.; BENICÁ, A. M.; ASSIS, H. R. B. S.; LEITE-SILVA, V. R.; ROCHA-FILHO, P. A.; NEGREIROS, M. M. F.; ROCHA, H. A. O.; OSTROSKY, E. A.; LOPES, P. S.; SALES, V. S. F.; GIORDANI, R. B.; FERRARI, M. Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of *Agave sisalana* as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of ananoemulsion to improve skin moisturizing. **Industrial Crops & Products**, v. 108, p. 470-479, 2017.

BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S.; LEITE-SILVA, V. R.; WALTERS, K. A. **Cosmetic Formulation: principles and practice**. Florida: CRC Press, 2019.

BERNARD, P.; BERTHON, J. Y. Resveratrol: an original mechanism on tyrosinase inhibition. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, p. 219-226, 2000.

BERNARDI, D. S.; PEREIRA, T. A.; MACIEL, N. R.; BORTOLOTO, J.; VIEIRA, G. S.; OLIVEIRA, G. C.; ROCHA-FILHO, P. A. Formation and stability of oil-in-water

nanoemulsions containing rice bran oil: in vitro and in vivo assessments. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, Article number 44, 2011. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-9-44>.

Biodiversity Heritage Library. Disponível em:
<<https://biodiversitylibrary.org/page/281982>>. Acesso em: 31 Jan. 2020.

BISBY, R. H.; BROOKE, R.; NAVARATNAM, S. Effect of antioxidant oxidation potential in the oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1002–1007, 2008.

BONIFACIO, B. V.; SILVA, P. B. S.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJN.S52634>.

BONY, E.; BOUDARD, F.; BRAT, P.; DUSSOSSOY, E.; PORTET, K.; POUCHERET, P.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: Chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation. **Fitoterapia**, v. 83, p. 33–43, 2012a.

BONY, E.; BOUDARD, F.; DUSSOSSOY, E.; PORTET, K.; BRAT, P.; POUCHERET, P.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Chemical Composition and Anti-inflammatory Properties of the Unsaponifiable Fraction from Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) Pulp Oil in Activated

J774 Macrophages and in a Mice Model of Endotoxic Shock. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, p. 384–392, 2012b.

BORA, P. S.; NARAIN, N.; ROCHA, R. V. M.; MONTEIRO, A. C. O.; De, R. Caracterización de las fracciones protéicas y lipídicas de pulpa y semillas de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **CYTA – Journal of Food**, v. 3, p. 111-116, 2001.

BRUXEL, F.; LAUX, M.; WILD, L. B.; FRAGA, M.; KOESTER, L. S.; TEIXEIRA, H. F. Nanoemulsões como sistema de liberação parenteral de fármacos. **Química. Nova**, v. 35, p. 1827-1840, 2012.

CHANG, T. S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. **Materials**, v. 5, p. 1661-1685, 2012.

CHO, J. C.; RHO, H. S.; JOO, Y. H.; LEE, C. S.; LEE, J.; AHN, S. M.; KIM, J. E.; SHIN, S. S.; PARK, Y. H.; SUH, K. D.; PARK, S. N. Depigmenting activities of kojic acid derivatives without tyrosinase inhibitory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 4159–4162, 2012.

DAVIDOV-PARDO, G.; McCLEMENTS, D. J. Nutraceutical delivery systems: Resveratrol encapsulation in grape seed oil nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. **Food Chemistry**, v. 167, p. 205–212, 2015.

DUARTE, J. L.; AMADO, J. R. R.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A.; FERREIRA, A. M.; SOUTO, R. N. P.; FALCÃO, D. Q.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P.

Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil.

Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 25, p. 189–192, 2015.

FERNANDES, C. P.; ALMEIDA, F. B.; SILVEIRA, A. N.; GONZALEZ, M. S.; MELLO, C. B.; FEDER, D.; APOLINÁRIO, R.; SANTOS, M. G.; CARVALHO, J. C. T.; TIETBOHL, L. A. C.; ROCHA, L.; FALCÃO, D. Q. Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, Article number: 22, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-22>.

FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2008.

FRIES, A. T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos “anti-idade”. **Infarma**, v. 24, p. 35-39, 2011.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. Pharmabooks, 2ª ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011.

FORGIARINI, J.; ESQUENA, J.; GONZALEZ, C.; SOLANS, C. Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 115, p. 36-39, 2000.

FRIBERG, S., JANSSON, P. O., CEDERBERG, E. Surfactant association structure and emulsion stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 55, p. 614-623, 1976.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, M. C.; SANTOS, V. M. R.; TAYLOR, J. G.; PERASOLI, F. B.; SANTOS, O. D. H.; RABELO, A. C. S. JUNIOR, J. V. R.; COSTA, D. C.; CAZATI, T. Preparation and characterization of a quercetin-tetraethyl ether-based photoprotective nanoemulsion. **Química Nova**, v. 42, p. 365-370, 2019.

GRAPENTIN, C.; BARNERT, S.; SCHUBERT, R. Monitoring the Stability of Perfluorocarbon Nanoemulsions by Cryo-TEM Image Analysis and Dynamic Light Scattering. **Plos One**, v. 22, 2015.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents by “HLB”. **Journal of the society of cosmetics chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GUERRA, F. M. R. M.; KRINSK, G. G.; CAMPIOTTO, L. G.; GUIMARÃES, K. M. F. Aplicabilidade dos peelings químicos em tratamentos faciais – estudo de revisão. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 4, p.33-36, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLES, C.; MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 13, p. 245–251, 2008.

GUTTOFF, M.; SABERI, A. H.; McCLEMENTS, D. J. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. **Food Chemistry**, v. 171, p. 117–122, 2015.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

IONASHIRO, M. **Giolito- Fundamentos da Termogravimetria, Análise Térmica Diferencial e Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: GIZ, 2005.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, p. 81-96, 2008.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; FENG, J.; GARCIA-CELMA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 20, p. 6594-6598, 2004.

JAFARI, S. M.; McCLEMENTS, D. J. **Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization**. London, UK: Academic Press, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811838-2.09994-X>.

JESUS, F. L. M.; ALMEIDA, F. B.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; KELMANN, R. G.; CARVALHO, J. C. T.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M.; SOLANS, C.; FERNANDES, C. P. Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, Article ID 6756793, 8p., 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6756793>.

JIANG, J.; AKINSEYE, O.; TOVAR-GARZA, A.; PANDYAM, A. G. The effect of melasma on self-esteem: A pilot study. **International Journal of Women's Dermatology**, v. 4, p. 38–42, 2018.

JOBIM, M. L.; SANTOS, R. C. V.; ALVES, C. F. S.; OLIVEIRA, R. M.; MOSTARDEIRO, C. P.; SAGRILLO, M. R.; FILHO, O. C. S.; GARCIA, L. F. M.; MANICA-CATTANI, M. F.; RIBEIRO, E. E.; CRUZ, I. B. M. Antimicrobial activity of amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological Research**, v. 169, p. 314– 323, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHAZAELI, P.; GOLDOOZIAN, R. SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 31, p. 375–381, 2009.

KOMAIKO, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015.

KONCIC, M. Z.; KREMER, D.; KARLOVIC, K.; KOSALEC, I. Evaluation of antioxidant activities and phenolic content of *Berberis vulgaris* L. and *Berberis croatica* Horvat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2176–2180, 2010.

LAI, X.; WICHERS, H. J.; SOLER-LOPEZ, M.; DIJKSTRA, B. W. Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins. **Chemistry - A European Journal**, v. 24, n. 1, p. 47-55, 2018. <https://doi.org/10.1002/chem.201704410>.

LIMA, J. R. O.; SILVA, R. B.; MOURA, E. M.; MOURA, C. V. R. Biodiesel of tucum oil, synthesized by methanolic and ethanolic routes. **Fuel**, v. 87, p. 1718–1723, 2008.

LIMA, R. R.; TRASSATO, L. C.; COELHO, V. **Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): Principais características e potencialidade agroindustrial**. Belém, PA: EMBRAPA-CPATU, 1986. (EMBRAPA-CPATU. Boletim de pesquisa, 75). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/380965>.

LUNZ, A. M.; OLIVEIRA, M. S. P.; LEMOS, W. P.; LAZZARI, S. M. N.; ZONTA-DE-CARVALHO, R. C.; MONTEIRO, O. C. Q. **Primeiro Relato do Pulgão *Cerataphis brasiliensis* (Hempel) (Hemiptera: Aphididae) Atacando Mudas de Duas Espécies de Tucumanzeiro (*Astrocaryum* spp.): Descrição e Controle**. Belém, PA: Embrapa

Amazônia Oriental, 2010. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 223).
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/884002>.

MAESTRO, A.; SOLÉ, I. GONZÁLEZ, C. SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 327, p. 433–439, 2008.

MAMBRIM, M. C. T; ARELLANO, D. B. Caracterización de aceites de frutos de palmeiras de la región amazónica del Brasil. **Grasas y Aceites**, v. 48, p. 154-158, 1997.

MANCINI, A. J. Skin. **Pediatrics**, v. 113, p. 1114-1119, 2004.

MATOS, K. A. N.; LIMA, D. P.; BARBOSA, A. P. P.; MERCADANTE, A. Z.; CHSTÉ, R. C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. **Food Chemistry**, v. 272, p. 216–221, 2019.

McCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 285–330, 2011.

MERCK. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt>. Acesso em: 05 Dez. 2020.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G.; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 623-635, 2009.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211-219, 2004.

MORAIS, L. R. B.; GUTJAHR, E. **Química de oleaginosas**: valorização da biodiversidade amazônica. Belém: Edição do Autor, 2012.

MRAIHI, F.; JOURNI, M.; CHÉRIF, J. K.; SOKMEN, M.; SOKMEN, A.; TRABELSI-AYADI, M. Phenolic Contents and Antioxidant Potential of Crataegus Fruits Grown in Tunisia as Determined by DPPH, FRAP, and β -Carotene/Linoleic Acid Assay. **Journal of Chemistry**, v. 2013, Article ID 378264, 6 p. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/378264>.

MUKHERJEE, P. K.; BISWAS, R.; SHARMA, A.; BANERJEE, S.; BISWAS, S.; KATIYAR, C. K. Validation of medicinal herbs for anti-tyrosinase potential. **Journal of Herbal Medicine**, v. 14, p. 1–16, 2018.

MUSAZZI, U. M.; FRANZÉ, S.; MINGHETTI, P.; CASIRAGHI, A. Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? **Drug Delivery and Translation Research**, v. 8, p. 414–421, 2018.

MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE. Ed. 2003-2020. National Inventory of Natural Heritage. Disponível em: <https://inpn.mnhn.fr>. Acesso em: 31 Jan. 2020.

NASCIMENTO, K.; COPETTI, P. M.; FERNANDES, A.; KLEIN, B.; FOGAÇA, A.; ZEPKA, L. Q.; WAGNER, R.; OURIQUE, A. F.; SAGRILLO, M. R.; SLVA, J. E. P. Phytochemical analysis and evaluation of the antioxidant and antiproliferative effects of Tucumã oil nanocapsules in breast adenocarcinoma cells (MCF-7). **Natural Product Research**, 2019. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1648460>.

NORMAH, H.; HANAPI, M. J. Antioxidant capacity of the green leafy vegetable using oxygen radical antioxidant capacity (ORAC), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assays. **Science Heritage Journal**, v. 3, p. 01-07, 2019.

OBOH, F. O. J.; ODERINDE, R. A. Analysis of the pulp and pulp oil of the Tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart) fruit. **Food Chemistry**, v. 30, p. 277-287, 1988.

OLIVEIRA, M. S. P.; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém, Pará, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 17, p. 343-353, 2003.

OLIVEIRA, N. P.; OLIVEIRA, M. S. P.; MOURA, E. F. Variabilidade e divergência genética entre genótipos de tucumanzeiro-do-pará (*Astrocaryum vulgare* Mart.) promissores para a produção de frutos por marcadores RAPD. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, p. 216-226, 2012.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241–249, 2002.

OSTERTAG, F.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, p. 95–102, 2012.

PARDAUIL, J. J. R.; MOLFETTA, F. A.; BRAGA, M.; SOUZA, L. K. C.; FILHO, G. N. R.; ZAMIAN, J. R.; COSTA, C. E. F. Characterization, thermal properties and phase transitions of amazonian vegetable oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 127, p. 1221–1229, 2017.

PEREIRA, E.; FERREIRA, M. C.; SAMPAIO, K. A.; GRIMALDI, R.; MEIRELLES, A. J. A.; MAXIMO, G. J. Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. **Food Chemistry**, v. 278, p. 208–215, 2019.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; NAMASIVAYAM, V. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.32, p. 403-425, 2017.

PILLAIYAR, T.; NAMASIVAYAM, V.; MANICKAM, M.; JUNG, S. H. Inhibitors of melanogenesis: an updated review. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, p. 7395–7418, 2018.

POLLO, C. F.; MIOT, L. D. B.; MENEGUIN, S.; MIOT, H. A. Factors associated with quality of life in facial melasma: a cross-sectional study. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, p. 313–316, 2018.

QIAN, C.; McCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1000–1008, 2011.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, p. 755-760, 2006.

RAO, J.; McCLEMENTS, D. J.. Stabilization of Phase Inversion Temperature Nanoemulsions by Surfactant Displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 7059–7066, 2010.

RENDON, M.; BERNEBURG, M.; ARELLANO, I.; PICARDO, M. Treatment of melasma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 54, p. 272-281, 2006.

RIGOPOULOS, D.; GREGORIOU, S.; KATSAMBAS, A. Hyperpigmentation and melasma. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 6, p. 195–202, 2007.

ROCHA-FILHO, P. A.; FERRARI, M.; MARUNO, M.; SOUZA, O.; GUMIERO, V. *In vitro* and *in vivo* evaluation of nanoemulsion containing vegetable extracts. **Cosmetics**, v. 32, p. 1-13, 2017.

RODRIGUES, A. M. C.; DARNET, S.; SILVA, L. H. M. Fatty Acid Profiles and Tocopherol Contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucuma (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) Fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2000-2004, 2010.

ROJAS-GARBANZO, C.; PÉREZ, A. M. BUSTOS-CARMONA, J.; VAILLANT, F. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-DAD during the process of peach palm (*Bactris gasipaes* H.B.K.) flour. **Food Research International**, v. 44, p. 2377–2384, 2011.

ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and Quantification of Carotenoids, By HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5062-5072, 2007.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; FILHO, J. M.; MOREIRA, A. V. B. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas no Sistema β -caroteno/Ácido Linoléico**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. (Comunicado Técnico, 126). ISSN: 1679-6535.
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT-2010/11963/1/cot-126.pdf>.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007a. (Comunicado Técnico, 128). ISSN: 1679-6535.

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Fortaleza, CE: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007b. (Comunicado Técnico, 127) ISSN:1679-6535.

https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10224/1/Cot_127.pdf

SABERIA, A. H.; FANG, Y.; McCLEMENTS, D. J. Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 411, p. 105–113, 2013.

SAINI, R. K.; NILE, S. H.; PARK, S. W. Carotenoids from Fruits and Vegetables: Chemistry, Analysis, Occurrence, Bioavailability and Biological Activities. **Food Research International**, v. 76, p. 735-750, 2015.

SALEM, A.; GAMIL, H.; RAMADAN, A.; HARRAS, M.; AMER, A. Melasma: Treatment evaluation. **Journal of Cosmetic and Laser Therapy**, v. 11, p.146–150, 2009.

SANTOS, M. F. G.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; SILVA, S. M.; SILVEIRA, M. R. S. Quality characteristics of fruits and oils of palms native to the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, p. 1-6, 2017.

SANTOS, M. F. G.; ALVES, R. E.; ROCA, M. Carotenoid composition in oils obtained from palm fruits from the Brazilian Amazon. **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 3, e86, 2015a. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.1062142>.

SANTOS, M. F. G.; ALVES, R. E.; RUÍZ-MÉNDEZ, M. V. Minor components in oils obtained from Amazonian palm fruits. **Grasas Y Aceites**, v. 64, n. 5, p., 531-536, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.048913>.

SANTOS, M. F. G.; MAMEDE, R. V. S.; RUFINO, M. S. M.; BRITO, E. S.; ALVES, E. Amazonian Native Palm Fruits as Sources of Antioxidant Bioactive Compounds. **Antioxidants**, v. 4, p. 591-602, 2015b. <https://doi.org/10.3390/antiox4030591>

SARKAR, R.; ARORA, P.; GARG, V. K.; SONTALIA, S.; GOKHALE, N. Melasma update. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 5, p. 426-435, 2014.

SARKAR, R.; BANSAL, A.; AILAWADI, P. Future therapies in melasma: What lies ahead? **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 86, p. 8-17, 2020.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; VELASCO, M. V. R.; MENEZES, C. M. S.; FERREIRA, E. I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 153-166, 2007.

SERRA, J. L.; RODRIGUES, A. M. C.; FREITAS, R. A.; MEIRELLES, A. J. A.; DARNETE, S. H.; SILVA, L. H. M. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. **Food Research International**, v. 116, p. 12–19, 2019.

SHANLEY, P. **Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica**. Belém: Imazon, 2005.

SILVA, C. N. S.; HYACIENTH, D. C.; FERREIRA, A. M.; VILHENA, J. C. E.; FLORENTINO, A. C.; CRUZ, R. A. S.; BÉREAU, D.; ROBINSON, J. C.; CARVALHO, J. C. T.; FERNANDES, C. P. Development of Nanoemulsions with Tucumã (*Astrocaryum vulgare*) Fruits Oil. **Journal of Nanomedicine Research**, v. 2, n. 2, 00024, 2015.

DOI:<http://dx.doi.org/10.15406/jnmr.2015.02.00024>.

SILVA, L. C. N.; FILHO, C. M. B.; PAULA, R. A.; SILVA, C. S. S.; SOUZA, L. I. O.; SILVA, M. V.; CORREIA, M. T. S.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro cell-based assays for evaluation of antioxidant potential of plant-derived products. **Free Radical Research**, v. 50, p. 801-812, 2016.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson Learning, 2006.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; CELMA, M. J. G. Nanoemulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102– 10, 2005.

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

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC: Livros Técnicos e Científicos, 2001.

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

TEIXEIRA, R. S.; ROCHA, P. R.; POLONINI, H. C.; BRANDÃO, M. A. F.; CHAVES, M. G. A. M.; RAPOSO, N. R. B. Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acid constituents of Amazonian native flora oils. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 3, p. 399-404, 2012.

THE PLANT List. **Version 1.1**. Published on the Internet. 2003. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org>>. Acesso em: 31 Jan. 2020.

TOMITA, Y.; HARIU, A.; KATO, C.; SEIJI, M. Radical production during tyrosinase reaction, dopa-melanin formation and photoirradiation of dopa-melanin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 82, p. 573-576, 1984.

UL PROSPECTOR. Disponível em: <<http://www.ulprospector.com>>. Acesso em: 05 Dez. 2020.

VACHIRAMON, V.; SUCHONWANIT, P.; THADANIPON, K. Melasma in men. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v. 11, p. 151–157, 2012.

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

YIN, L. J.; CHU, B. S.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of b-carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1617–1622, 2009.

YOKOMIZO, V. M. F.; BENEMOND, T. M. H.; CHISAKI, C.; BENEMOND, P. H. Peelings químicos: revisão e aplicação prática. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 5, p. 58-68, 2013.

ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Extração de β -caroteno de cenouras: uma proposta para disciplinas experimentais de química. **Química Nova**, v. 31, p. 1259-1262, 2008.

ANEXO I



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A6A557B

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A6A557B**
 Usuário: **Vera Isaac**
 CPF/CNPJ: **020.009.538-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Astrocaryum vulgare

Título da Atividade: **Uso cosmético do óleo de tucumã**

Equipe

Vera Isaac	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP
Fernanda Borges De Almeida	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP
Beatriz Emanuele da Silva	Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP

Data do Cadastro: **02/09/2019 09:48:07**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **23:53** de **10/12/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO II

AmazonOil
The Rain Forest Company

Preserving the future
Amazon Oil Industry

CERTIFICADO DE ANÁLISE (COA)

ÓLEO VIRGEM DE TUCUMA

Nome científico: <i>Astrocaryum vulgare</i>	Código do produto: 255
Origem da matéria prima: Floresta Amazônica / Brasil	Número do lote: AMO 255-001/0318
Parte utilizada da planta: polpa da fruta	Data de fabricação: 19/03/2018
Processo produtivo: prensado a frio	Número de análise: 028/2018
Conservantes: ausente	Validade: 18 meses
Extração com solvente: ausente	Rastreabilidade: garantida
Origem das espécies vegetais: extrativista	

ITEM	UNIDADE	ESPECIFICAÇÕES	MÉTODO	RESULTADOS
COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA				
Aparência (25° C)	----	Líquido	Visual	De acordo
Cor	----	Vermelho intenso	AOCS 1a 64 - 82	De acordo
Índice de acidez	% peso	< 20	AOCS CD3D-63	16.8
Índice de peróxido	10 meq O ₂ /kg	< 10	AOCS CD8 - 53	3.4
Índice de iodo	gI ₂ /100g	70 - 80	AOCS TG2A - 64	80
Índice de saponificação	mgKOH/g	180 - 200	AOCS CD3 - 25	190
Matéria insaponificável	%	1,8	AOCS CA 6A - 40	De acordo
Ponto de fusão	°C	?	AOCS CJ 1 -94	De acordo
MICROBIOLOGIA				
Bactérias totais	Ufc/ml	<100	NF ISO 4833	Ausente
Fungos e leveduras	Ufc/ml	<100	NF V 08-036	Ausente
RESULTADOS: (X) APROVADO () REPROVADO				

Luiz Roberto Barbosa Morais

Luiz Roberto Barbosa Morais
Eng. Químico responsável – CRQ/PA CRQ 06300126 / 6ª Região

SEGURANÇA: produto inofensivo, apenas para fins cosméticos. Não apto para consumo humano.

ARMAZENAMENTO: deve ser mantido em sua embalagem original fechada, em local ventilado, evitando exposição ao sol, chuva e temperaturas elevadas.

ROMERA INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PERFUME LTDA-ME
Passagem Az de Ouro, 19, Bairro Levilândia, Ananindeua - Pará - Brasil, CEP: 67015-760
Fone: 55 91 3089 2266
amazonoil@amazonoil.com.br
www.amazonoil.com.br

AmazonOil
The Rain Forest Company

Preserving the future
Amazon Oil Industry

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS		
Ácido palmítico	% peso	23 - 28
Ácido esteárico	% peso	2 - 3
Ácido oleico	% peso	60 - 68
Ácido vacênico	% peso	1 - 2
Ácido linoleico	% peso	1 - 3
Ácido linolênico	% peso	2 - 4
Saturado	%	27
Insaturado	%	73

ROMERA INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PERFUME LTDA-ME
Passagem Az de Ouro, 19. Bairro Levilândia. Ananindeua - Pará - Brasil, CEP: 67015-760
Fone: 55 91 3089 2266
amazonoil@amazonoil.com.br
www.amazonoil.com.br