



# Nanocosmética à base de produtos naturais aplicada à Psoríase

**Tânia Pina Soares**

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à  
Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em  
Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por:

**Marcelino Carvalho**

**Isabel C.F.R. Ferreira**

**Bragança**

**2013**



*A persistência é o menor caminho do êxito!*

*Charles Chaplin*

## **Agradecimentos**

Agradeço à empresa LABIALFARMA (Laboratório de Produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos) pela oportunidade de executar toda a parte prática desta dissertação e pela disponibilidade prestada.

A toda a equipa do Departamento de Investigação e Desenvolvimento Galénico: Dr. Marcelino Carvalho (Orientador), Dr.<sup>a</sup> Melânia Maduro, Dr.<sup>a</sup> Sónia Lopes, Dr.<sup>a</sup> Joana Lopes, Dr.<sup>a</sup> Marta Barbosa, Doutor Helton Santos e Dr.<sup>a</sup> Sílvia Cruz pela ajuda prestada, pelo conhecimento transmitido, pela paciência, compreensão e principalmente pela força e incentivação nos momentos mais difíceis.

À Professora Doutora Isabel Ferreira, pela ajuda e disponibilidade prestada.

Ao meu namorado pela ajuda incansável, pelos momentos de apoio e força. Pela compreensão, disponibilidade e carinho.

Aos meus pais, irmã, cunhado e afilhada pelo carinho, ajuda e incentivo.

A todos os meus amigos que contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

## Resumo

Os produtos à base de plantas são frequentemente usados em dermatologia e, apesar do número de estudos ser reduzido, existe evidência para o uso destes na psoríase, acne, dermatite atópica e outros problemas dermatológicos. Nos dias de hoje, estes produtos à base de plantas são muito requisitados para este objetivo, pois acredita-se que muitas vezes são a única opção para tratar este tipo de problemas.

Este trabalho incidiu sobre a psoríase, uma doença inflamatória de pele, cujas lesões eritemato-escamosas se caracterizam por uma elevada proliferação celular e por padrões anormais de diferenciação dos queratinócitos, além de envolver alterações bioquímicas, imunológicas e vasculares. Foram abordados os aspectos benéficos da utilização de plantas medicinais na psoríase, assim como a sua incorporação em nanocosméticos. A Nanocosmética veicula ativos ou outros ingredientes nanoestruturados nas formulações e apresenta propriedades superiores quanto à sua *performance* em comparação com produtos convencionais.

A forma farmacêutica utilizada foi a nanoemulsão, por apresentar mais benefícios neste estudo. Os óleos de *Calendula officinalis* L. e *Copaifera reticulata* Duncke e o óleo essencial de *Matricaria recutita* L. foram utilizados nas nanoemulsões por possuírem grande poder anti-inflamatório importante no tratamento da psoríase.

Ao longo do trabalho, foram desenvolvidas várias formulações de nanoemulsões (com diferentes percentagens de fase aquosa e oleosa), com o objetivo de alcançar uma nanoemulsão estável, com as características desejadas a nível organolético e de tamanho de partícula. As nanoemulsões foram desenvolvidas na Indústria Farmacêutica Labialfarma (Laboratório de Produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos), mais precisamente no Departamento de Investigação e Desenvolvimento Galénico, do qual faço parte. Toda a investigação, testes de estabilidade e medições de nanopartículas necessários para o desenvolvimento desta dissertação foram também realizados na Labialfarma.

As nanoemulsões que apresentaram melhores resultados de estabilidade, coincidiram com as formulações com melhores características organoléticas e menor tamanho de partícula.

## Abstract

Herbal and phytotherapeutical products are often used in dermatology, and, despite the reduced number of published studies, there is evidence for their use in psoriasis, acne, atopic dermatitis and other dermatological problems. In our days, some of these herbal products are highly required for this purpose, being often the only option to treat this disease.

This dissertation focused on psoriasis, an inflammatory skin disease in which the erythematous-squamous lesions are characterized by a high cellular proliferation and by abnormal patterns of keratinocyte's differentiation, in addition to biochemical, immunological and vascular abnormalities. Benefits of the use of medicinal plants in psoriasis, as well as their incorporation in nanocosmetics were assessed. The nanocosmetics industry provides active principles or other nanostructured ingredients to the formulations, and shows superior properties, in terms of performance, compared to conventional products.

Nanoemulsion was the pharmaceutical form used due to the higher benefits to the present study. The oils of *Calendula officinalis* L. and *Copaifera reticulata* Duncke, and the essential oil of *Matricaria recutita* L. were used in the nanoemulsions as they hold great anti-inflammatory power, significant in the treatment of psoriasis.

Throughout the work, various formulations of nanoemulsions (with different percentages of water and oil phase) were developed, in order to achieve stable nanoemulsions, with the desired organoleptic characteristics and particle size levels. The nanoemulsions were developed at the pharmaceutical industry Labialfarma, (Laboratory of Pharmaceutical and Nutraceutical Products), more specifically at the Department of Research and Galenic Development, to which I belong. All the investigation, stability tests, and measurement of nanoparticles required for the development of this dissertation, were also performed at Labialfarma.

Nanoemulsions that presented higher stability results, matched with the formulations with better organoleptic characteristics and smaller particle size.

**Índice**

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	ii
Abstract.....	iii
Índice de figuras .....	vi
Índice de tabelas .....	vii
Abreviaturas.....	viii
I. Introdução.....	1
1.1. Psoríase.....	1
1.1.1. Imunopatogénese da psoríase .....	3
1.1.2. Tipos de psoríase .....	6
<i>Psoríase em placas ou psoríase vulgar</i> .....	6
<i>Psoríase gutata</i> .....	7
<i>Psoríase inversa</i> .....	7
<i>Psoríase eritrodérmica</i> .....	8
<i>Psoríase com pústulas</i> .....	8
<i>Psoríase numular</i> .....	8
<i>Artrite psoriática (Reumatismo psoriásico)</i> .....	9
1.1.3. Formas mais graves da psoríase .....	9
1.2. A pele e absorção cutânea .....	10
<i>Estrutura e funções da pele</i> .....	10
<i>Fatores que determinam a absorção cutânea</i> .....	12
<i>Grau de Penetração dos produtos tópicos</i> .....	13
1.3. Nanotecnologia.....	13
1.3.1. O uso de nanomateriais na indústria cosmética.....	14
1.4. Vantagens da nanocosmética aplicada à psoríase.....	17
1.5. Produtos Naturais .....	18
1.5.1. Óleos essenciais e suas atividades biológicas .....	19
1.5.2. Plantas medicinais utilizadas na Psoríase.....	20
1.5.3. <i>Calendula officinalis</i> L. ....	21
1.5.4. <i>Copaifera reticulata</i> Duncke .....	21
1.5.5. <i>Matricaria recutita</i> L.....	23
1.5.6. Vitamina E.....	23
II. Material e Métodos .....	26

2.1. Materiais .....	26
2.1.1. Fase oleosa.....	26
2.1.2. Tensioativo .....	26
2.1.3. Fase aquosa.....	26
2.1.4. Soluções controlo do espetrofotómetro de correlação fotónica .....	26
2.2. Métodos .....	27
2.2.1. Obtenção das nanoemulsões.....	27
2.2.2 Caracterização das amostras.....	30
2.2.2.1. Determinação do pH.....	30
2.2.3. Análise das variáveis envolvidas na obtenção das nanoemulsões.....	33
2.2.4. Testes de estabilidade .....	34
<i>Fatores que influenciam a estabilidade da nanoemulsão .....</i>	<i>34</i>
III. Resultados e discussão .....	38
3.1. Obtenção das nanoemulsões.....	38
3.2. Avaliação das variáveis que influenciam as características das amostras.....	39
3.2.1. Avaliação e influência do pH nas formulações .....	39
3.2.2. Temperatura de emulsificação.....	41
3.2.3. Quantidade de tensioativo utilizado .....	41
3.3. Avaliação dos testes de estabilidade.....	42
3.3.1. Avaliação macroscópica e microscópica.....	43
3.3.2. Análise macroscópica após teste de centrifugação e stresse térmico .....	43
3.3.3. Teste de estabilidade acelerada .....	45
IV. Conclusões e perspetivas.....	46
V. Bibliografia .....	48
VI. Anexos.....	53
Formulação 6 .....	53
Formulação 8 .....	54
Formulação 3 .....	55
Formulação 1 .....	56
Formulação 4 .....	57
Formulação 5 .....	58

**Índice de figuras**

<b>Figura 1:</b> Imunopatogénese da Psoríase	5
<b>Figura 2:</b> Psoríase gutata	7
<b>Figura 3:</b> Constituição da pele	12
<b>Figura 4:</b> Emulsão O/A	27
<b>Figura 5:</b> Nanoemulsões	38

## **Índice de tabelas**

<b>Tabela 1.</b> Plantas medicinais utilizadas na Psoríase	20
<b>Tabela 2.</b> Quantidade dos componentes utilizados nas Nanoemulsões	28
<b>Tabela 3.</b> Avaliação do pH, vinte e quatro horas após manipulação	39
<b>Tabela 4.</b> Tamanho de partícula após vinte e quatro horas de manipulação	40
<b>Tabela 5.</b> Avaliação organolética após vinte e quatro horas de manipulação	43
<b>Tabela 6.</b> Teste de Centrifugação e Stress Térmico	44
<b>Tabela 7.</b> Estabilidade das nanoemulsões após 10 dias	55
<b>Tabela 8.</b> Formulações com melhores resultados	46

**Abreviaturas**

HLA	<i>Human Leucocyte Antigen</i>
DR7	Antigénio considerado fator de risco
CD	Células dendríticas
SII	Sistema imune inato
IL	Sistema imune adquirido
SIA	Interleucina
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor</i>
CL	Célula de Langerhans
CLA	<i>Lymphocyte associated antigen</i>
LT	Linfócitos T
CLA	<i>Lymphocyte associated antigen</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function associated antigen</i>
APC	Célula apresentadora de antigénio profissional
iNOS	Produção de óxido nítrico
UV	Ultra-violeta
O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
ECF	Espectroscopia de correlação de fotões
TFM	Fotomultiplicador
SDP	<i>Size Distribution Processor</i>
EHL	Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

## I. Introdução

### 1.1. Psoríase

A psoríase é uma das doenças inflamatórias da pele mais frequentes do mundo. (1).

É a mais frequente das doenças crônicas da pele, afeta a pele, unhas e membranas mucosas e caracteriza-se por lesões eritemato-escamativas com padrões e distribuição corporal variáveis. A psoríase é uma condição genética causada por um grupo de genes (e não apenas por um único gene). É desencadeada por fatores ambientais que podem ser externos, como as alterações meteorológicas das estações do ano ou pela fricção das roupas na pele, ou internos, como as doenças infecciosas e determinados tipos de medicação. Para além destes fatores ambientais, que conferem uma tendência crescente ao desenvolvimento da psoríase, podem também surgir reações imunitárias cutâneas específicas, que causam inflamação. As placas psoriáticas são originadas pelas células epidérmicas que são substituídas mais rapidamente que o habitual. Na pele psoriática, este processo pode levar aproximadamente uma semana, comparativamente à pele normal onde demora 1 mês. A psoríase pode surgir em qualquer idade, mas as primeiras erupções aparecem com maior frequência entre os 10 e os 30 anos de idade. É uma condição vitalícia e imprevisível, com ciclos sucessivos de remissão e de recidiva. Apesar da psoríase só muito raramente colocar a vida em perigo, tem um impacto significativo na qualidade de vida. Devido ao fato de ser uma doença crónica, que está relacionada com um aspeto físico desfavorável, pode muitas vezes levar à diminuição da autoestima, à incapacidade de bem-estar e, com o tempo, à depressão. As pessoas com psoríase têm muitas vezes dificuldades na comunicação interpessoal, particularmente quando as suas lesões são visíveis, como nos casos da psoríase da face, do couro cabeludo e das mãos. As primeiras erupções da psoríase, e os episódios recorrentes, estão muitas vezes relacionados com traumas psicológicos que originam fortes emoções. Na psoríase, o stresse aumenta a probabilidade de novas erupções, o que significa que as pessoas podem ver-se facilmente encurraladas num ciclo vicioso. Os fatores adicionais que determinam a severidade da psoríase incluem a

suscetibilidade ao tratamento e a dimensão da área coberta pelas lesões. A forma mais frequente da psoríase é a psoríase em placas ou vulgar.

O número, dimensão e extensão das lesões são variáveis entre os pacientes e conforme a evolução da doença. A psoríase vulgar pode ser classificada em dois tipos: psoríase tipo I ou de início precoce, que se inicia antes de 40 anos, e apresenta tendência à disseminação, maior número de recorrências, maior frequência de história familiar de psoríase e de associação com HLA-Cw6 (Human Leucocyte Antigen Cw6) e DR7 (outro antigénio considerado fator de risco e geralmente associado a Cw6). Quando comparada à psoríase tipo II ou de início tardio, que pode surgir durante ou após a quinta década de vida. <sup>(2,3)</sup>

Esta doença é constituída por uma disposição determinada geneticamente da pele com a inflamação crónica, caracterizada por um aumento da produção de epitélio, que aparece como resposta a certos impactos externos ou internos. <sup>(4,5)</sup> O fato de ser geneticamente determinada não implica que a hereditariedade de pais para filhos seja obrigatória. Contudo, verifica-se uma maior probabilidade de aparecimento da doença em pessoas que tenham familiares portadores da mesma.

Nenhuma forma de psoríase é contagiosa.

Esta doença não ataca os órgãos internos, mas pode ser acompanhada por queixas articulares (artrite psoriática). Por outro lado, as doenças de órgãos internos podem provocar psoríase e agravar a psoríase existente. <sup>(4,6,7)</sup> Uma vez que existem múltiplas doenças cutâneas que também se manifestam por lesões vermelhas e descamativas, eventualmente afetando as localizações típicas da psoríase, o diagnóstico deve ser sempre estabelecido atrás da observação clínica por parte de um dermatologista. Em alguns casos poderá ser necessária a confirmação com uma biópsia da pele. <sup>(8)</sup>

### 1.1.1. Imunopatogénese da psoríase

A imunopatogénese da psoríase é complexa e envolve alterações do sistema imunológico inato (queratinócitos, células dendríticas - CD, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células endoteliais) e adquirido (linfócitos T).<sup>(9)</sup> As células do sistema imune inato (SII) ativadas produzem fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, que atuam sobre as células do sistema imune adquirido (SIA) e vice-versa.<sup>(9-13)</sup>

Inicialmente ocorre uma ativação das células do SII (células dendríticas e queratinócitos). Vários fatores ambientais, infeções, medicamentos e stresse emocional são considerados desencadeantes da doença. O trauma mecânico, por exemplo, pode ativar os queratinócitos, visto que estes passam a libertar citocinas (IL-1 e o TNF- $\alpha$ ) e proteínas de choque térmico. Estas substâncias ativam as células dendríticas (células de Langerhans -CL - e CD residentes) na epiderme e na derme. A ligação de antígenos de agentes infecciosos aos recetores Toll-Like, nas células dendríticas e nos queratinócitos, também pode levar à ativação destas células. As células dendríticas e os queratinócitos ativados produzem inúmeras quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento.<sup>(9,13)</sup>

Uma vez ativada, as células dendríticas processam um antígeno (ambiental ou endógeno, ainda não definido), e migra para o linfonodo regional onde o apresenta aos linfócitos T (LT). Para que a ativação do LT ocorra, é necessária a ligação do antígeno (acoplado à molécula do complexo de histocompatibilidade principal na membrana da CD) ao recetor de membrana do LT, além da ligação de proteínas da membrana plasmática da CD (ICAM-1; LFA-3; CD80/CD86) às proteínas da membrana do LT (respetivamente LFA-1; CD2 e CD28.<sup>(11)</sup> Portanto, para a ativação linfocitária ocorrer deve ser estabelecida uma "sinapse imunológica" entre proteínas da membrana da célula apresentadora de antígeno (APC) e do LT.

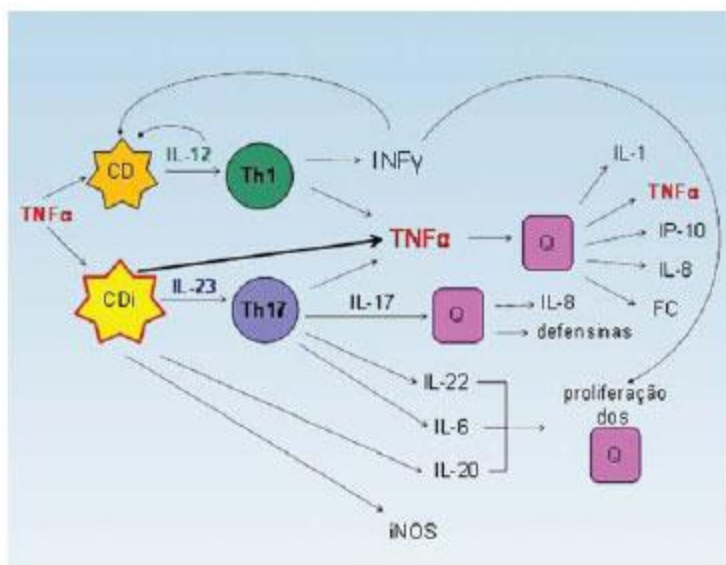
Os LT ativados dos doentes com psoríase diferenciam-se, preferencialmente, em LTCD4+ tipo1 (LTh1; produtores de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2) e tipo 17 (LTh17; produtores de IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-22) e LTCD8+ tipo 1 (LTc1; produtores de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , perforinas e granzima B).<sup>(6-10)</sup>

Os LT ativados migram para a pele através da ligação de moléculas de adesão expressas na sua membrana plasmática (CLA e LFA-1) às moléculas de adesão presentes na membrana da célula endotelial cutânea ativada (E-selectina e ICAM-1). Os LTc1 concentram-se na epiderme e os LTh na derme.<sup>(9,11)</sup>

Na derme os LTh encontram-se e interagem com as CD e com os macrófagos, formando novas "sinapses imunológicas". A interação entre essas células leva à produção de inúmeras citocinas, que mantêm e amplificam o processo inflamatório. (11,13)

As CD e os macrófagos ativados produzem IL12 e IL-23. A IL-12 favorece a proliferação dos LTh1 e a IL-23 dos LTh 17. (12,13) A proliferação dos Th17 e Th1, na psoríase, é também atribuída à diminuição de LT reguladores (responsáveis pela supressão da ativação desses linfócitos). (9,13,14)

Na psoríase as CD dérmicas mais abundantes são do tipo mielóide (CD11c+). (9,13) Estas células funcionam como APC para os LT e também como células inflamatórias (CDi), grandes produtoras de IL-20, de sintetase indutora da produção de óxido nítrico (iNOS), bem como de IL-23 e TNF- $\alpha$ . A IL-20 estimula a proliferação dos queratinócitos e o óxido nítrico a vasodilatação. A IL-23 favorece a proliferação dos LTh17 e consequente produção de IL-22 e IL-6 (que estimulam a proliferação dos queratinócitos), além de IL-17 e TNF- $\alpha$ . A IL-17 estimula o queratinócito a produzir defensivas (proteínas que impedem a infecção das lesões) e IL-8. O TNF- $\alpha$  estimula no queratinócito a produção de IL-8 e IP-10 (proteínas quimiotáticas para neutrófilos e LT respectivamente), de IL-1 e do próprio TNF- $\alpha$ , além de fatores de crescimento que favorecem a angiogénese. Assim, as citocinas Th17 estimulam os queratinócitos a proliferar e a produzir inúmeras proteínas inflamatórias (**Figura 1**). (9,12,15,16)



**Figura 1:** Principais proteínas produzidas pelas Células Dendríticas (CD) e Células Dendríticas Mielóides do tipo inflamatório (CDi), linfócitos T auxiliares tipo 1 (Th1), linfócitos T auxiliares tipo 17 (Th17) e queratinócitos (Q) na psoríase. FC: fatores de crescimento; iNOS: sintetase indutora da produção de óxido nítrico <sup>(12)</sup>

A proliferação dos LTh1, induzida pela IL-12, leva à produção de TNF- $\alpha$  e INF- $\gamma$ . O INF- $\gamma$  também estimula a produção de IL-12, IL-8, IP-10, IL-23, defensinas e iNOS pelos queratinócitos e CD. <sup>(15,16)</sup>

Interferões, TNFs e IL-20 são ativadores de fatores de transcrição (STAT-1, STAT-3 e fator nuclear  $\kappa$ B) os quais, por sua vez, na psoríase, controlam vários grupos de genes que codificam diversos mediadores inflamatórios. <sup>(9,13,17)</sup>

Vale a pena ressaltar que a IL-6, o TNF- $\alpha$  e a IL-17 são citocinas envolvidas na patogenia da aterosclerose, o que justifica a maior incidência de doenças cardiovasculares e da síndrome metabólica nos doentes com psoríase. <sup>(10,18)</sup>

Concluindo, o conhecimento das principais interações entre o SII e o SIA é essencial para a melhor compreensão da imunopatogênese da psoríase, bem como dos mecanismos de ação dos medicamentos imunossupressores e biológicos empregados no seu tratamento.

### 1.1.2. Tipos de psoríase

Existem diversos tipos de psoríase, que podem ser classificados de acordo com o seu aspeto clínico.

#### *Psoríase em placas ou psoríase vulgar*

A psoríase vulgar é o termo clínico para a psoríase em placas. Vulgar significa "comum" e a psoríase vulgar é a forma mais predominante de psoríase, afetando 95% das pessoas com psoríase. <sup>(19)</sup> Manifesta-se por placas redondas ou ovais, de tamanhos variados e bem delimitados, de cor avermelhada, com escamas secas e aderentes, do tipo prateadas ou acinzentadas <sup>(20)</sup>

O número, dimensão e extensão das lesões é variável de doente para doente depende das diferentes fases de evolução da doença em cada doente. Surgem sobretudo nos cotovelos, joelhos, região lombar e couro cabeludo, embora possam afetar qualquer área do corpo, cobrindo, nos casos mais graves, extensas áreas do tronco e membros.

Em contraste com o seu aspeto exuberante, estas lesões são muitas vezes assintomáticas. As lesões são claramente demarcadas e podem estar rodeadas por um anel nítido. <sup>(19)</sup>

As placas variam em tamanho e número e podem ser finas ou espessas.

As placas são normalmente simétricas na parte exterior dos braços e pernas, aparecendo especialmente em ambos os cotovelos e/ou joelhos, mas qualquer parte do corpo pode ser afetada. <sup>(19)</sup>

A psoríase em placas é acompanhada por comichão em 60% a 70% dos casos. <sup>(19)</sup>

*Psoríase gutata*

**Figura 2:** Psoríase gutata.<sup>(19)</sup>

É menos frequente que a anterior e afeta sobretudo crianças e jovens, por vezes na sequência de uma infeção estreptocócica ou viral do trato respiratório superior, amigdalite, gripe, varíola, trauma físico, stresse emocional ou administração de fármacos antimaláricos.<sup>(20)</sup>

Aparece geralmente de forma súbita, com lesões de menores dimensões (forma de gota) que ocupam áreas extensas do tronco e membros (**Figura 2**).

Pode desaparecer definitivamente após o primeiro episódio ou evoluir para uma psoríase vulgar.<sup>(21)</sup> As lesões pequenas, redondas e disseminadas são típicas da psoríase em gotas ou psoríase gutata. A psoríase gutata é mais predominante em crianças e adultos jovens do que em adultos mais velhos. Este tipo de psoríase tende a ter uma remissão espontânea após várias semanas, podendo reaparecer sob a mesma forma, ou sob a forma da clássica psoríase em placas.<sup>(19)</sup>

*Psoríase inversa*

Apresenta um padrão inverso aos outros tipos de lesões. Localiza-se nas zonas das dobras cutâneas: axilas, virilha, dobra do cotovelo, dobra do joelho. Caracterizam-se por lesões mais húmidas, planas e inflamadas sem escamação e particularmente sujeitas à irritação devido ao atrito e ao suor. Essas lesões são eritematosas, com placas brilhantes sem escama que se podem confundir com intertrigo e infeções por candida e dermatófitos.<sup>(20)</sup>

### *Psoríase eritrodérmica*

Normalmente a psoríase eritrodérmica caracteriza-se por lesões generalizadas, abrangendo extensas áreas do corpo ou sua totalidade. Aparece sobre a pele como uma vermelhidão e escamação fina, frequentemente acompanhada por prurido intenso e dor, podendo ocorrer inchaço. O aspeto da lesão pode ser confundido com o de um indivíduo acometido de queimaduras, função do grau de comprometimento da pele. <sup>(20)</sup>

Este tipo de psoríase é muito grave devido ao risco associado de desenvolvimento de complicações. <sup>(19)</sup>

### *Psoríase com pústulas*

Algumas formas de psoríase caracterizam-se pelo aparecimento de pústulas pequenas “bolhas” cheias de pús. A mais frequente é a pustulose palmo-plantar, na qual estas lesões surgem sobre um fundo avermelhado nas palmas das mãos e plantas dos pés, por vezes com descamação abundante e fissuras dolorosas. Esta forma particular de psoríase é de difícil tratamento, podendo ter uma evolução crónica com surtos de agravamento.

A psoríase pustular afeta menos de 10% dos doentes. Pode surgir como uma complicação da psoríase em placas, como resultado da toma de determinados medicamentos ou da abrupta interrupção destes. <sup>(19)</sup>

### *Psoríase numular*

Ao contrário das manchas em forma de gota da psoríase gutata, a psoríase numular caracteriza-se por placas redondas que têm apenas alguns centímetros de diâmetro. <sup>(19)</sup>

### *Artrite psoriática (Reumatismo psoriásico)*

Vários anos após o aparecimento da psoríase, o doente pode ser afetado pela artrite psoriática.<sup>(19)</sup>

Esta é uma artrite inflamatória crônica com vários graus de manifestações articulares. É tratada separadamente das lesões cutâneas e o curso da doença é imprevisível. A artrite psoriática pertence ao grupo das espondilartropatias. Pode ser distinguida de outros tipos de artrite inflamatória essencialmente através da condição cutânea concomitante.<sup>(19)</sup>

Envolve as articulações periféricas (ancas, ombros, mãos e pés) em 70% dos casos e, por vezes, a coluna vertebral (conhecida como a forma axial da artrite psoriática). A artrite psoriática pode igualmente afetar as enteses, isto é, as regiões onde os tendões estão ligados ao osso, o que poderá explicar a dor nos calcanhares, etc.<sup>(19)</sup>

A condição surge com maior frequência entre os 30 e os 50 anos de idade, afetando tanto mulheres como homens. No entanto, os homens registam uma maior frequência da forma axial da condição, ao passo que as mulheres tendem a sofrer mais das formas periféricas. O número exato de pessoas que sofre de artrite psoriática é desconhecido, mas calcula-se que cerca de 1% da população mundial está afetada. No entanto, a predominância é maior em doentes com psoríase.<sup>(19)</sup>

#### **1.1.3. Formas mais graves da psoríase**

Algumas formas da psoríase são mais graves e particularmente mais resistentes ao tratamento. Estas são a psoríase pustular, a psoríase eritrodérmica e a artrite psoriática. Estas formas devem receber um tratamento médico cuidadoso, em colaboração com os dermatologistas. Psoríase universal quando as lesões estão presente em toda a superfície cutânea. Esta forma de psoríase é bastante rara.

#### 1.1.4. Locais de manifestação

- Psoríase do couro cabeludo
- Psoríase de troncos e membros
- Psoríase palmo-plantar
- Psoríase dos cotovelos e joelhos
- Psoríase facial
- Psoríase das membranas mucosas
- Psoríase da zona lombar inferior
- Psoríase das orelhas
- Psoríase das unhas

### 1.2. A pele e absorção cutânea

#### *Estrutura e funções da pele*

A pele é um órgão multifuncional, de composição complicada, que tem a capacidade de se adaptar às variações do meio ambiente e às necessidades do organismo que protege, cobrindo-o na sua totalidade. Trata-se de um órgão de revestimento complexo e heterogêneo, caracterizado por uma estrutura própria que se apresenta em camadas interdependentes. Anatomicamente, a pele está estratificada em 3 camadas distintas, mas que funcionalmente estão intimamente relacionadas, a epiderme, a derme e do tecido subcutâneo (ou hipoderme) (**Figura 3**).<sup>(21)</sup>

A epiderme é a camada mais superficial, constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Existem quatro tipos de células na epiderme: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, sendo as mais abundantes os queratinócitos. De acordo com o grau de maturação dos queratinócitos, a epiderme pode ser dividida em 5 camadas: camada basal, espinhosa, granulosa, lúcida e córnea. A camada basal é a mais profunda, encontrando-se sobre a membrana basal que separa a derme da epiderme. É nesta camada e na parte mais profunda da seguinte (camada

espinhosa), que ocorre a formação dos queratinócitos. Estes continuam a sua maturação ao longo das camadas seguintes. Na camada córnea os queratinócitos já não são mais do que células mortas e sem núcleo, com o citoplasma repleto de queratina. <sup>(22)</sup>

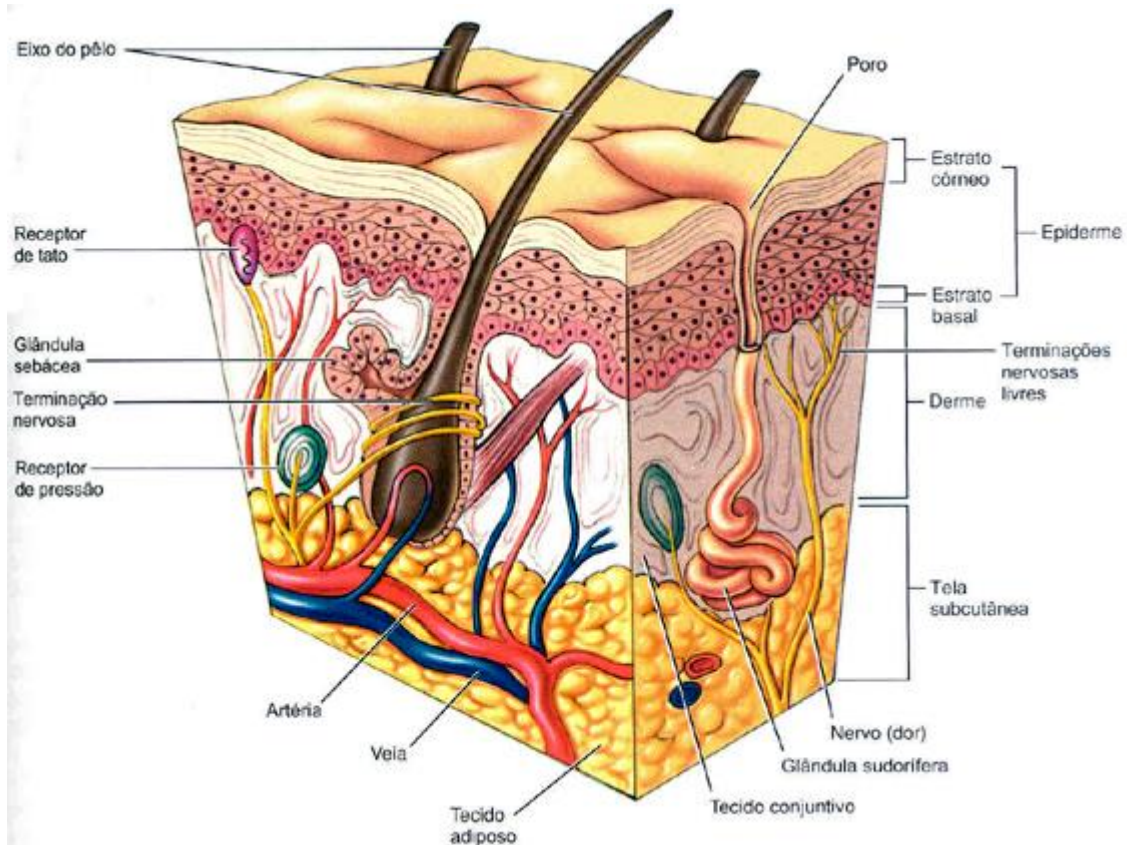
Quanto aos melanócitos, podem encontrar-se na junção da derme com a epiderme ou então entre os queratinócitos da camada basal da epiderme. Os melanócitos sintetizam um pigmento castanho-escuro, a melanina. As células de Langerhans encontram-se por toda a epiderme, entre os queratinócitos. Detetam antigénios, que captam e apresentam aos linfócitos T locais, tendo por isso um importante papel nas reacções imunológicas cutâneas. <sup>(22)</sup>

As células de Merkel são mecano-receptores, responsáveis pela sensibilidade táctil. Localizam-se na parte mais profunda da epiderme, encontrando-se apoiadas na membrana basal. Este tipo de células é exclusivo da pele espessa, presente nas superfícies sujeitas a fricção, por manipulação ou locomoção, como é o caso da pele da palma das mãos e da planta dos pés. Abaixo da epiderme encontra-se a derme. A derme é constituída por tecido conjuntivo, no qual se apoia a epiderme e é responsável pela união entre a pele e o tecido celular subcutâneo (hipoderme). <sup>(22)</sup>

Existem duas camadas distintas na derme: a camada papilar e a reticular. A camada papilar é a mais superficial e apresenta uma organização irregular, com saliências, as papilas dérmicas. A principal função das papilas dérmicas é aumentar a superfície de contacto entre a derme e a epiderme, reforçando a sua ligação. Abaixo da camada papilar localiza-se a camada reticular. Ambas as camadas são ricas em fibras elásticas, responsáveis pela elasticidade da pele. <sup>(22)</sup>

Estão presentes na derme várias estruturas derivadas da epiderme, como é o caso dos folículos pilosos e das glândulas sebáceas e salivares.

Internamente à derme encontra-se a hipoderme, ou tecido celular subcutâneo que, embora já não faça parte da pele, é fundamental na união da derme aos órgãos adjacentes e é responsável pelo deslizamento da pele sobre as estruturas em que se apoia. Outra função da hipoderme é a reserva de energia e protecção contra o frio, como resultado da riqueza em tecido adiposo. <sup>(22)</sup>



**Figura 3:** Constituição da pele <sup>(23)</sup>

### *Fatores que determinam a absorção cutânea*

Para que haja absorção das substâncias cosmetologicamente ativas, é necessário que se verifiquem certas circunstâncias específicas tanto biológicas como físico-químicas, entre as quais podemos destacar as seguintes:

- Estado da pele
- Estado de hidratação da camada córnea
- Características físico-químicas das substâncias cosmetologicamente ativas:
  - Tamanho das moléculas
  - Características de lipossolubilidade (solubilidade dos corpos gordos)

- Estado físico
- Propriedade dos veículos ou excipientes utilizados para a substância específica ou cosmetologicamente ativa:
  - Excipientes emulsionados
  - Excipientes hidrossolúveis ou hidromiscíveis
- Influência dos tensoativos (baixa a tensão superficial da água)
- Influência do pH

### ***Grau de Penetração dos produtos tópicos***

Consoante a profundidade e os tecidos abrangidos podemos considerar os seguintes níveis de penetração:

- Epidérmica – meramente superficial, sem penetração
- Endodérmica – penetração dérmica
- Diadérmica ou sistémica (emulsões O/A – tensoativos) – penetração profunda, com possibilidade de atingir a circulação sanguínea.

### **1.3. Nanotecnologia**

A nanotecnologia é a ciência de manipular átomos e moléculas em escala nanométrica - 80.000 vezes menor do que a largura de um cabelo humano. O uso da nanotecnologia têm-se desenvolvido através de várias correntes da ciência, da eletrónica à medicina e já encontrou aplicações na área de cosméticos, adquirindo o nome de nanocosméticos. Esta influência generalizada da nanotecnologia na indústria de cosméticos é devida às propriedades melhoradas obtidas pelas partículas à escala nano, incluindo a cor, a transparência, a solubilidade. A principal característica das nanopartículas é o seu pequeno tamanho. Este pode alterar as suas propriedades físico-químicas quando comparadas com os seus homólogos maiores, pode aumentar a

absorção e a interação com os tecidos biológicos. Devido ao seu tamanho, as nanopartículas podem facilmente entrar na corrente sanguínea através da pele ou por inalação e serem transportadas para os vários órgãos. Com doses mais elevadas e com tempos de residência longos as nanopartículas podem levar à disfunção de órgãos vitais. À medida que o tamanho das partículas diminui, aumenta a sua área de superfície o que conduz a um aumento da reatividade das mesmas. <sup>(24-27)</sup>.

### **1.3.1. O uso de nanomateriais na indústria cosmética**

#### *A Indústria Nanocosmética*

Entre as vantagens da nanotecnologia aplicada ao setor, podem ser destacadas uma maior estabilização de substâncias, uma melhor penetração de ingredientes ativos na pele e no cabelo, a possibilidade de libertação controlada dos ativos e a melhoria da eficácia e do sensorial dos produtos.

Nos últimos anos, tem-se verificado o aumento significativo das publicações científicas e de patentes dedicadas à nanocosmética, e também por isso, tem-se introduzido vários produtos farmacêuticos e cosméticos com nanotecnologia aplicada no mercado internacional e nacional. Entre os vários ativos em cosméticos comercializados por essas empresas destacam-se as vitaminas e derivados, filtros solares, anti-oxidantes, agentes hidratantes, ceramidas e antitranspirantes, veiculados nas formas de cremes, géis, sprays e loções. <sup>(24-27)</sup>

### *Nanoemulsões*

As nanoemulsões são também referidas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, micromulsões instáveis, submicroemulsões, e são uma classe de emulsões cujo tamanho de glóbulos está na escala nanométrica, particularmente em torno de 20-500nm. Podem ter aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200nm, ou leitosa quando o tamanho está entre 200-500 nm.

Diferentes das microemulsões que são sistemas termodinamicamente estáveis, as nanoemulsões são sistemas metastáveis, ou seja, estáveis por um longo período de tempo. A inerente estabilidade das nanoemulsões está diretamente relacionada com a preparação que confere estabilização, quando se empregam tensioativos não-iônicos e/ou polímeros; e ao diminuto tamanho dos glóbulos, cujo movimento browniano diminui a atuação da força da gravidade, prevenindo assim fenômenos de instabilidade. (24-27,28)

Apesar de já conhecidas, as nanoemulsões só recentemente atraíram a atenção dos fabricantes de cosméticos. Esse desinteresse pode ter ocorrido porque a preparação das nanoemulsões, em muitos casos, exige a aplicação de técnicas especiais, como homogeneizadores de alta pressão e ultra-sons, estes equipamentos apenas recentemente tornaram-se acessíveis. Além disso, as nanoemulsões são mais caras de produzir porque exigem equipamentos especializados. Havia também falta de conhecimento do mecanismo de produção de gotículas de dimensões da ordem dos submicrómetros e do papel dos tensioativos e co-tensioativos, que também colaboraram para deter o desenvolvimento das nanoemulsões; além da falta de demonstração dos benefícios do uso de nanoemulsões, em comparação com os sistemas clássicos de macroemulsões. Em termos fundamentais, a dificuldade de conhecimento da química interfacial envolvida na produção das nanoemulsões também retardou o progresso destas. Finalmente havia o receio de enveredar por novos sistemas sem uma plena avaliação de custo/benefício, o que inibiu o uso de nanoemulsões em aplicações de cuidado íntimo. Apesar dessas dificuldades, várias empresas lançaram nanoemulsões no mercado e, nos próximos anos, os benefícios poderão ser avaliados. A aceitação das nanoemulsões nos cosméticos depende da percepção e da aceitação do consumidor. Com a chegada dos novos instrumentos homogeneizadores de alta pressão e com o aumento da concorrência

entre os fabricantes, o custo de produção das nanoemulsões deverá cair, aproximando-se do custo das tradicionais macroemulsões.<sup>(24-27)</sup>

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessário fornecimento de energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta ou baixa energia de emulsificação.<sup>(28)</sup>

Os métodos que utilizam alta energia de emulsificação são baseados na geração de energia mecânica através de alta tensão de cisalhamento, como os homogeneizadores de alta pressão, os microfluidizadores, ou pela utilização de ultra-sons. A alta energia mecânica imposta ao sistema gera forças capazes de deformar e quebrar as gotículas da fase interna em glóbulos menores. Estas técnicas permitem um melhor controle da granulometria e uma ampla escolha de constituintes.

Contudo os equipamentos são caros, o que requer um alto investimento por parte das empresas, e torna limitada a viabilidade comercial destes processos.<sup>(28)</sup>

Os métodos que utilizam baixa energia de emulsificação fazem uso das propriedades físico-químicas do sistema, e utilizam a inversão espontânea da curvatura do tensoativo para a obtenção de glóbulos de tamanho reduzido.<sup>(28)</sup>

Para os tensoativos não iônicos isto pode ser conseguido pela mudança na temperatura do sistema forçando uma transição de uma emulsão A/O a altas temperaturas para uma emulsão O/A a baixas temperaturas (inversão de fase transicional). Durante o arrefecimento do sistema passa por um ponto de curvatura zero e mínima tensão interfacial, o que predispõe a formação de gotículas finamente dispersas. Pela técnica de inversão de fases pela temperatura são formadas emulsões com um tamanho de partícula muito pequeno que apresentam uma ótima estabilidade.<sup>(28)</sup>

Além da temperatura, parâmetros como a concentração de eletrólitos ou mudanças no valor de pH podem interferir na afinidade do tensoativo pela fase aquosa ou pela oleosa. Outro importante fator a ser considerado é o grau de etoxilação dos tensoativos não iônicos, pois quanto maior for o grau de etoxilação (e consequentemente elevados valores de EHL), maior será a temperatura de inversão de fases.<sup>(28)</sup>

A transição espontânea no raio da curvatura também pode ser obtida alterando a fração volumétrica, através de um método conhecido como EPI (Emulsion Phase Inversion). Aqui, através da adição de água na fase oleosa, formam-se glóbulos de água

nesta fase contínua (microemulsão bicontínua A/O). Aumentando o volume da fração de água ocorre uma mudança espontânea na curvatura das moléculas de tensoativo (inversão de fases catastrófica) causando inversão de emulsão A/O para O/A. Este método de emulsificação ocorre a uma temperatura constante, sem a necessidade de aquecimento da amostra a uma determinada temperatura. <sup>(28)</sup>

#### 1.4. Vantagens da nanocosmética aplicada à psoríase

Estudos científicos têm mostrado que as nanopartículas podem penetrar na pele, especialmente se a pele estiver frágil, é uma via direta para a penetração de partículas de tamanho máximo até 7000 nm. A presença de eczema, acne e de feridas podem aumentar a absorção de nanopartículas na corrente sanguínea e podem levar a outras complicações. Um estudo preliminar constatou que a penetração de nanopartículas era mais profunda na pele afetada pela psoríase do que na pele não afetada. Recentemente, os suportes de base estão a ser modificados de modo a aumentar a penetração da pele, incorporando certos promotores de penetração tanto física como química, e também através da preparação de novos sistemas vesiculares com penetração da pele crescente, como os *ethosomes* e os *transferosomes*. <sup>(28)</sup>

Com a redução do tamanho das partículas à escala nanométrica, várias vantagens são obtidas na forma cosmética, como por exemplo:

- É o sistema preferencial para libertação eficiente dos ativos na pele, pois possui uma área superficial grande permitindo rápida absorção; <sup>(28)</sup>
- O diminuto tamanho dos glóbulos, associado ao movimento browniano característico, diminui a atuação da força da gravidade, evitando processos de instabilidade como a sedimentação e a *creaming*; <sup>(28)</sup>
- Ao contrário das microemulsões que requerem concentração de tensoativo geralmente superior a 20%, as nanoemulsões podem ser obtidas usando concentrações na faixa de 3,0-10,0%. <sup>(28)</sup>
- O pequeno tamanho dos glóbulos das nanoemulsões garante uma aplicação tópica e uma distribuição uniforme do produto sobre a pele. <sup>(28)</sup>

- O pequeno tamanho dos glóbulos permite ainda a penetração das nanoemulsões através de rugosidades da superfície da pele facilitando a penetração de ativos. (28)

### **1.5. Produtos Naturais**

Os avanços das pesquisas em biotecnologia e as transformações recentes no perfil dos mercados de consumo têm propiciado novas oportunidades para diversos segmentos industriais contemporâneos e uma das inovações representativas desses processos está associada ao desenvolvimento de produtos cosméticos derivados de ativos naturais da biodiversidade. (29,30)

Os modernos métodos de isolamento e de elucidação estrutural têm vindo identificar cada vez mais os constituintes das plantas. Quando estes estudos são acompanhados de testes capazes de colocar em evidência as respectivas ações farmacológicas, pode relacionar-se, para um dado composto ou para um dado extrato, a sua respetiva atividade biológica. Este tem sido o caminho usado pela indústria farmacêutica quando pretende obter um constituinte ativo de uma planta já usada na terapêutica, com vista a poder transformar esse constituinte em medicamentos. (31)

### 1.5.1. Óleos essenciais e suas atividades biológicas

Os óleos essenciais devem a sua atividade biológica particularmente à natureza química e percentagem dos seus constituintes. Este fato explica e contribuí para diversos tipos de utilização. Na farmácia e na indústria farmacêutica muitos óleos essenciais vão ser usados como medicamentos, tanto para uso interno como para uso externo, ou incluídos como corretores do aroma e do sabor em medicamentos. Efetivamente, produtos medicamentosos contendo óleos essenciais são empregues nos cuidados primários de saúde, ou diretamente na aromaterapia.

Muitas atividades biológicas dos óleos essenciais decorrem da sua interação com funções e mecanismos da fisiologia humana (ou animal). Algumas dessas atividades fundamentam utilizações com fins medicinais, quer por administração direta de óleos essenciais, quer pela sua inclusão em formulações medicamentosas, e , por isso, usualmente designadas como atividades farmacológicas. Em rigor, são ações farmacodinâmicas uma vez que, apesar de conhecida a biodisponibilidade e a farmacocinética de muitos terpenos voláteis, não é possível falar destes parâmetros, pois nos óleos essenciais estamos em presença de misturas complexas de inúmeros constituintes. <sup>(31)</sup>

#### *Atividades biológicas:*

- Atividade antimicrobiana e antifúngica
- Atividade sobre o aparelho digestivo
- Atividade sobre o aparelho respiratório
- Atividade analgésica e anti-inflamatória
- Atividade rubefaciente e analgésica
- Atividade protetora e regeneradora da pele

### 1.5.2. Plantas medicinais utilizadas na Psoríase

O estudo de plantas medicinais vem sendo um dos melhores caminhos para a descoberta de novos produtos. Para o tratamento da psoríase existem cada vez mais estudos de plantas medicinais a serem utilizadas em aplicação tópica.

Na **Tabela 1**, apresentam-se alguns exemplos de plantas medicinais cujo estudo para aplicação tópica na psoríase é bastante recente e promissor.

**Tabela 1.** Plantas medicinais utilizadas na Psoríase.

Planta medicinal	Princípios ativos	Parte da planta	Ação farmacológica	Forma Farmacêutica
<i>Wrightia tinctoria</i> R.Br	Triterpenóides Flavonóides	Folhas Casca	Analgésica, anti- inflamatória	Creme Emulsão
<i>Capsicum frutescens</i> L.	Capsaicina	Fruto	Anti- inflamatória	Creme
<i>Glycyrrhiza glabra</i> L.	Ácido glicirretínico	Raíz	Anti- inflamatória	Creme ou maceração
<i>Vanillosmopsis arborea</i> Baker	$\alpha$ -Bisabolol	Óleo essencial	Anti- inflamatória	Emulsão Creme
<i>Polygonum tinctorium</i> Ait.  <i>Isatistinctoria</i> L.  <i>Indigofera tinctoria</i> L.  <i>Strobilanthes formosanus</i> S.Moore <i>Baphicacanthus cusia</i> (Nees) Bremek.	Alcalóides bis- indólicos Indigotina e Indirubina	Folhas	Anti- inflamatória	Pomada ( <i>Indigo naturalis</i> )

Para além das plantas mencionadas, *Calendula officinalis* L., *Copaifera reticulata* Duncke e *Matricaria recutita* L. têm um grande potencial para o tratamento da psoríase. A morfologia das três últimas plantas mencionadas, bem como as suas propriedades farmacológicas e partes utilizadas estão descritas nas secções seguintes.

### **1.5.3. *Calendula officinalis* L.**

*Calendula officinalis* L., da família das Asteráceas (Compostas), nativa de Europa Meridional e do Egito, é muito cultivada nas zonas temperadas de todo o mundo e como tal surgem, por vezes, subespontâneas nos Açores e frequentemente em Portugal Continental. É conhecida também por boas-noites, calêndula, calêndula-hortense, maravilhas-bastardas e maravilhas-dos-jardins.

A Farmacopeia Portuguesa indica como parte da planta utilizada as flores inteiramente abertas, separadas do receptáculo e secas, inteiras ou cortadas, das formas cultivadas, dobradas de *C. officinalis* <sup>(31)</sup>. Os Capítulos florais secos contêm vários terpenóides, entre os quais saponósidos de núcleo triterpénico (2-10%) e álcoois triterpénicos, flavonóides (quercetina, isoquercetina e rutina), hidroxycumarinas (escopoletina, umbeliferona e esculetina), 0,2% de óleo essencial (mono e sequiterpenos) e polissacáridos hidrossolúveis (15%). Além dos capítulos florais, as folhas também apresentam carotenóides e lípidos. Os triterpenóides apresentam ação anti-inflamatória e anti-edematosa. <sup>(32)</sup>

### **1.5.4. *Copaifera reticulata* Duncke**

O óleo de Copaíba é uma óleo-resina que se forma e acumula em canais e bolsas no tronco de muitas espécies do género *Copaifera* (*Copaifera officinalis* L., *C. langsdorffii* Desf., *C. reticulata* Duncke, *C. guyanensis* Desf. e outras), da família das Fabáceas (Leguminosas), espécies arbóreas muito parecidas e que ocorrem no Brasil,

Venezuela, Guianas e Colômbia. É, no entanto, na Amazônia que estas espécies encontram o melhor habitat, sendo o Brasil, um dos maiores produtores.

O bálsamo, também designado vulgarmente por copaíba, copaíba-verdadeira, bálsamo-da-amazônia, óleo de copaíba, é obtido artesanalmente à custa de furos no tronco e recolhido à custa de tubos, orifícios que depois são fechados utilizando um pedaço de madeira. Presentemente, também é obtido como subproduto da indústria madeireira ao ser aproveitado o óleo que escoia durante a serragem da madeira destas árvores. O óleo, depois de filtrado é de coloração amarelo-pálida a pardo-esverdeada, sabor amargo e odor balsâmico. A parte volátil possui  $\beta$ -cariofileno (50 a 52%), outros sesquiterpenos (principalmente  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -elemento,  $\beta$ -selineno e muuroleno) e monoterpenos ( $\alpha$ -pineno); na parte fixa, a resina, predominam os ácidos diterpênicos, dos quais o existente em maior quantidade é o copálico. <sup>(31)</sup>

Vários dos compostos já isolados ou detetados nos óleos de copaíba já tiveram propriedades farmacológicas, descritas na literatura. Entre os sesquiterpenos, algumas propriedades como anti-úlceras, anti-viral e anti-rinovírus são descritas para o ar-curcumeno e o  $\beta$ -bisaboleno, este último também descrito como abortivo. O bisabolol é conhecido por conferir as propriedades anti-inflamatória e analgésica, o  $\beta$ -elemeno é descrito como anticâncer (cervico) e cariofileno e  $\delta$ -cadineno como anti-cariogênicos, sendo este último também bactericida (CMI 800  $\mu\text{g/ml}$ ).

Entre estes, entretanto, os que foram mais estudados e se mostraram ativos num maior número de ensaios foram o cariofileno e seu óxido. O cariofileno é descrito na literatura como: anti-edêmico, fagorrepelente, anti-inflamatório ( $\text{CI}_{50}=100 \mu\text{M}$ ), antitumoral, bactericida, insetífugo e anti-alérgico. Algumas destas atividades são também conferidas ao óxido, além de inseticida. O ácido caurenóico (D2) é descrito na literatura como tripanossomicida, atividade conferida também a óleos de copaíba que não contêm este diterpeno. <sup>(33)</sup>

É utilizado como anti-inflamatório, anti-séptico em feridas, eczemas, na psoríase e urticária, anti-inflamatório das vias urinárias, em afecções pulmonares (tosses e bronquites, gripes e resfriados), cicatrizante de pequenas irritações do couro cabeludo, antiasmático, expectorante, na pneumonia, sinusite, disenteria, incontinência urinária, cistite e leucorréia, como analgésico, antiúlceras, e como antitumoral. O óleo de copaíba é utilizado também pelas indústrias de cosméticos e de vernizes como agente fixador. <sup>(43)</sup>

### 1.5.5. *Matricaria recutita* L.

A camomila vulgar [*Matricaria recutita* L. Sin. *M. chamomilla* L. Sin. *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert], da família das Asteráceas (Compostas), também é conhecida por camomila, camomila-alemã, camomila-dos-alemães, macela, macela-vulgar, mançanilha, marcela, margaça-das-boticas e matricária, com origem na Europa mediterrânica e Médio Oriente.

A Farmacopeia Portuguesa inscreve o óleo essencial de camomila definindo-o como um óleo essencial azul, obtido por arrastamento com vapor de água, a partir dos capítulos ou das sumidades floridas, recentes ou secos.

No óleo essencial predominam os sesquiterpenos (de 55 a 70%) com farnesenos, azulenos (camazuleno e guaiazuleno),  $\alpha$ -bisabolol, óxidos de bisabolol e de bisabolona, os espiroéteres (cis- e trans-enin-bicicloéteres), espatulol, monoterpenos, lactonas sesquiterpénicas (matricina, matricarina), que durante o processo da destilação se transformam em azulenos.

Tanto o  $\alpha$ -bisabolol como o camazuleno contribuem primariamente para a actividade anti-inflamatória, ao inibir a síntese de leucotrienos, assim como a peroxidação lipídica.

O óleo essencial possui, também, efeitos suavizantes, calmantes e antissépticos, úteis na despigmentação de manchas senis, feridas pequenas, queimaduras e picadas de insetos, e em pele seca, psoríase e acne.<sup>(32)</sup>

### 1.5.6. Vitamina E

A vitamina E é um conjunto de moléculas com actividade biológica e encontra-se sob a forma de tocoferóis e tocotrienóis. É uma vitamina lipossolúvel, com uma importante função antioxidante. É um potente sequestrador dos radicais peróxido, prevenindo a peroxidação lipídica dos ácidos gordos polinsaturados da camada fosfolipídica das membranas biológicas e das lipoproteínas plasmáticas.

As principais fontes de vitamina E são os óleos vegetais, os grãos de cereais integrais, nozes, frutos, vegetais e algumas carnes. A vitamina E está presente, entre

outros locais, na pele. Tal como acontece com os carotenóides, a vitamina E é secretada pelas glândulas sebáceas. Consequentemente, os locais de maior produção de sebo vão ter maior concentração de vitamina E. A presença de vitamina E no sebo vai proteger os lípidos cutâneos da ação dos radicais livres. <sup>(22)</sup>

São reconhecidas à vitamina E propriedades fotoprotetoras, não só devido à sua ação antioxidante como também à sua capacidade de absorção da radiação UV. <sup>(22)</sup>

Assim sendo:

- Funcionam como antioxidante (sobretudo a isoforma  $\alpha$  –tocoferol)
- Captam radicais livres
- Inibem a peroxidação lipídica cutânea
- Melhoram a microcirculação cutânea
- Aliviam e acalmam a irritação pelo sol
- Aumentam eficiência de protetores solares

## 1.6. Objetivos

- Compreender a patologia da psoríase bem como todos os fatores que contribuem para o seu aparecimento.
- Avaliar a potencialidade dos produtos naturais benéficos para a psoríase.
- Avaliar o melhor método para a obtenção de uma nanoemulsão.
- Avaliar os fatores que influenciam a estabilidade da nanoemulsão.
- Desenvolvimento e investigação de formulações teóricas.
- Desenvolvimento da nanoemulsão através de produtos naturais aplicados à psoríase.
- Avaliação da estabilidade das nanoemulsões.

O trabalho foi desenvolvido na Indústria Farmacêutica Labialfarma, Empresa Farmacêutica vocacionada para o desenvolvimento e fabrico de produtos e formas farmacêuticas inovadoras. É uma empresa que fabrica exclusivamente para Terceiros; o tipo de serviço prestado varia de acordo com a especificidade do produto e do cliente; fabrica medicamentos, suplementos alimentares, dispositivos médicos, nutracêuticos, cosméticos e biocidas.

## II. Material e Métodos

### 2.1. Materiais

#### 2.1.1. Fase oleosa

A fase oleosa utilizada foi o óleo de copaíba (*Copaifera reticulata* Duncke) e o óleo de calêndula (*Calendula officinalis* L.). Nesta fase também estão incluídas a essência de camomila (*Matricaria recutita* L.) e a vitamina E, fornecidos pela empresa Labialfarma (Laboratório de produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos).

#### 2.1.2. Tensioativo

Como tensioativo foi utilizado o Tween 80 Sorbitano, mono-(9Z)-9-octadecenoato, poli (oxi-1,2-etanodiilo), com EHL 15, fornecido pela empresa Labialfarma (Laboratório de produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos).

#### 2.1.3. Fase aquosa

A fase aquosa utilizada foi água purificada fornecida pela Empresa Labialfarma (Laboratório de produtos Farmacêuticos e Nutracêuticos), que teve um tratamento por membranas de osmose inversa e posteriormente um tratamento final com leitos de troca iônica e lâmpada UV.

#### 2.1.4. Soluções controle do espectrofotômetro de correlação fotônica

Soluções controle: PCS control L50, L100, L200, L300, L500.

## 2.2. Métodos

### 2.2.1. Obtenção das nanoemulsões

Nanoemulsões são sistemas dispersos constituídos por duas fases imiscíveis (oleosa e aquosa), onde a fase dispersa ou interna é finamente dividida e distribuída noutra fase contínua ou externa. Existem emulsões do tipo óleo em água (O/A: fase externa aquosa) e água em óleo (A/O: fase externa oleosa) (Figura 4).

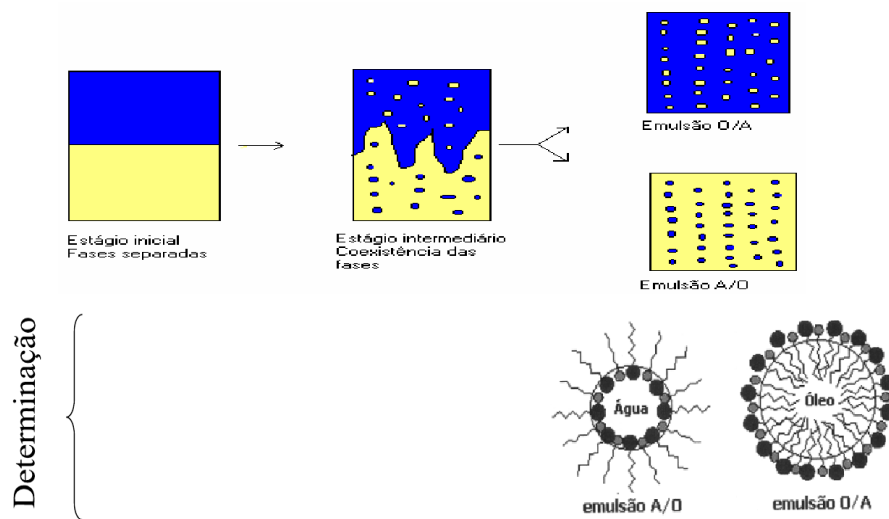


Figura 4- Emulsão O/A <sup>(35)</sup>

A estabilidade da emulsão é garantida com o uso de agentes emulsificantes, geralmente substâncias tensoativas.<sup>(34)</sup>

As quantidades utilizadas nas nanoemulsões estão descritas na (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Quantidade dos componentes utilizados nas Nanoemulsões

Fórmulas	Fase oleosa				Tensioativo Tween 80	Fase aquosa Água Purificada	% O e A % Óleo % Água
	Óleo de Copaíba	Óleo de Calêndula	Essência de Camomila	Vitamina E			
Fórmula 1	9,9%	---	---	---	5,0%	85,0%	O: 9,9% A:85,0%
Fórmula 2	4,7%	2,0%	---	---	8,0%	85,3%	O:6,7% A:85,3%
Fórmula 3	9,9%	5,0%	---	0,1%	8,0%	77,0%	O:15,0% A:77,0%
Fórmula 4	9,9%	4,8%	0,2%	0,1%	10,0%	75,0%	O:15,0% A:75,0%
Fórmula 5	8,7%	3,0%	0,2%	0,1%	8,0%	80,0%	O:12,0% A:80,0%
Fórmula 6	4,7%	2,0%	0,2%	0,1%	8,0%	85,0%	O:7,0% A:85%
Fórmula 7	6,7%	3,0%	0,2%	0,1%	5,0%	85,0%	O:10,0% A:95,0%
Fórmula 8	5,0%	2,0%	0,2%	0,1%	8,0%	84,7%	O:7,3% A:84,7%

O método utilizado na realização das nanoemulsões foi o de alta energia de emulsificação.

A fase aquosa e a fase oleosa foram aquecidas separadamente até aproximadamente 63°C. O tensioativo foi previamente aquecido e adicionado à fase oleosa. Quando ambas as fases atingiram a mesma temperatura, a fase oleosa foi adicionada à fase aquosa.

Para promover a emulsificação utilizou-se o IKA®T25 Digital Ultra-Turrax®, com rotação entre os 13.000 rpm e os 14.000 rpm.

Durante a execução da nanoemulsão, foi avaliada a temperatura desta, até atingir os 45°C; o tempo que cada nanoemulsão demorou a atingir os 45°C foi idêntico, não sendo por isso um fator crítico para o desenvolvimento. Aos 45°C, colocou-se a nanoemulsão nos ultra-sons para promover o arrefecimento da mesma através da redução progressiva do diâmetro de gotícula. Aos 25°C a nanoemulsão foi retirada do aparelho de ultra-sons para assim serem avaliados todos os parâmetros nomeadamente, características organoléticas, pH, viscosidade, e serem realizados todos os estudos de estabilidade.

A utilização de diferentes percentagens nas formulações visou verificar a estabilidade das mesmas, variando a quantidade da fase oleosa, fase aquosa e tensoativo. Foi realizado um estudo prévio das quantidades adequadas para os óleos /tensoativo em estudo, sendo assim a tentativa-erro menor.

Para verificar o comportamento do óleo de copaíba, a primeira formulação continha apenas, na fase oleosa, óleo de copaíba, com quantidade mínima de tensoativo e quantidade de água suficiente para perfazer o volume.

Com o objetivo de aumentar o poder anti-inflamatório da nanoemulsão, o óleo de calêndula foi utilizado nas formulações seguintes, bem como a vitamina E (antioxidante). As concentrações utilizadas de tensoativo variaram nestas formulações entre os 8,0% e os 10,0% consoante as percentagens da fase oleosa.

Para reforçar o poder anti-inflamatório, foi utilizada a essência de camomila a partir da formulação 4.

Após a realização da formulação 4, com 10% de tensoativo, o objetivo das formulações seguintes foi testar a quantidade de tensoativo, a 5% e a 8%, para identificar possíveis diferenças organoléticas e posteriores alterações de tamanho de gotícula. Assim sendo, todas as formulações têm percentagens diferentes de componentes com o intuito de avaliar todos os parâmetros envolvidos. Como o mínimo e o máximo das concentrações de cada componente foi estudado previamente, as variações das percentagens não são drásticas, facilitando assim o desenvolvimento das nanoemulsões bem como a interpretação dos resultados.

## 2.2.2 Caracterização das amostras

### 2.2.2.1. Determinação do pH

O pH foi analisado por leitura direta no potenciómetro Methohm 691 pHMeter, previamente calibrado com tampão pH 4,0 e 7,0.

### 2.2.2.2. Medidor de nanoparticulas

*N5 Submicron Particle Size Analyzer* (Espectrofotómetro de correlação fotónica). O N5 determina o tamanho das partículas por medição da taxa de difusão das partículas através de um fluido. A taxa de difusão depende de 3 fatores: da temperatura do fluido, da viscosidade do fluido e do tamanho de partícula. Se a temperatura e a viscosidade forem conhecidas, o tamanho de partícula pode ser determinado. Os princípios de medição são o movimento browniano e a espectroscopia de correlação de fotões.<sup>(36)</sup>

#### *Procedimento:*

- a. Ligar o espectrofotómetro de correlação fotónica cerca de 30 minutos antes da realização da determinação.
- b. Antes de iniciar a determinação do tamanho de partícula da amostra, efetuar o procedimento descrito de seguida, a fim de testar a operação do aparelho. Este controlo é realizado recorrendo a uma solução controlo adequada (PCS control L50, L100, L200, L300 ou L500).
  - b.a. Selecionar a solução controlo mais adequada, consoante a gama de tamanho de partícula teoricamente prevista para a solução amostra (formulação a estudar).
  - b.b. Para diluir a solução controlo selecionada, colocar duas gotas\* de solução controlo num balão volumétrico de 25 ml e aferir com água purificada. Fechar o balão e agitar para homogeneizar.

\*Não é necessária uma quantidade exata, uma vez que a intensidade da solução será verificada em b.d.

**b.c.** Transferir cerca de 10 ml de solução controlo diluída para uma seringa e acoplar à sua extremidade um filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Fazer passar a solução pelo filtro, transferindo a solução controlo filtrada para a cuvete.

**b.d.** Efetuar, no *software* do aparelho, a verificação da intensidade da solução controlo, observando se esta se encontra dentro dos limites especificados no *software*.

**b.d.a.** Caso a intensidade verificada seja menor que a especificada, proceder à preparação de uma solução controlo mais concentrada, até se obter uma intensidade dentro dos limites especificados.

**b.d.b.** Caso a intensidade verificada seja maior que a especificada, proceder à preparação de uma solução controlo menos concentrada, até se obter uma intensidade dentro dos limites especificados.

**b.e.** Verificada a intensidade da solução controlo, fixar os valores dos parâmetros especificados pelo fabricante para a solução controlo utilizada e fazer correr a solução controlo.

**b.f.** Obtidos os resultados, averiguar se estes estão de acordo com os limites referidos nas instruções do fabricante.

**b.f.a.** Se o erro de linha de base for maior que 0,1% repetir a corrida da solução controlo.

**b.f.b.** Se após 3 corridas o erro de linha de base ainda for superior a 0,1% preparar uma nova amostra com solução controlo.

**c.** Retirar a cuvete do espectrofotómetro e proceder à sua lavagem.

**c.a.** Proceder à diluição da formulação em estudo e realizar os passos anteriormente explicados.

### *Movimento browniano*

O movimento provocado pela agitação térmica, ou seja, a colisão aleatória de partículas em solução com moléculas de solvente, é chamado de *movimento browniano*.

Essas colisões originam um movimento aleatório que leva a que as partículas

suspensas se difundam através da solução. Para uma solução com uma dada viscosidade, a uma temperatura constante, a taxa de difusão ou o coeficiente de difusão (D) é inversamente proporcional ao tamanho de partícula, de acordo com a equação de Stokes-Einstein<sup>(36)</sup>:

$$D = \frac{KBT}{3\pi\eta d}$$

KB= Constante *Boltzmann* ( $1,38 \times 10^{-16}$  erg/°K)

T= Temperatura (°K)

$\eta$  = Viscosidade do diluente (poise)

d = Diâmetro esférico equivalente (cm)

#### *Espectroscopia de correlação de fótons (ECF)*

As partículas que são submetidas a movimento browniano são detetadas e analisadas iluminando as partículas com um laser e medindo a luz dispersa com um tubo fotomultiplicador (TFM). A luz difundida pelas partículas em qualquer instante é acumulada e forma um padrão de interferência. A intensidade de luz detetada pelo TFM depende deste padrão de interferência, o qual por sua vez depende do padrão das partículas no feixe laser. Como as partículas se movimentam aleatoriamente através da solução, as suas posições em relação a uma alteração causam um padrão de interferência em constante alteração e também variação da intensidade da luz no detetador.<sup>(36)</sup>

### *Análise de dados*

O N5 oferece duas formas de análise de dados: unimodal e SDP (*Size Distribution Processor*). Uma vez que um ACF (*Autocorrelation Function*) é calculado, pode ser analisado para se obter o tamanho de partícula ponderada em intensidade média e desvio padrão por análise unimodal, ou a distribuição do tamanho de partícula por meio de análise de SDP. A análise pode apresentar resultados em termos do tamanho de partículas ou do peso molecular.<sup>(36)</sup>

### *Especificações Técnicas N5<sup>(36)</sup>*

Tecnologia: Espectroscopia de correlação de fótons

Preparação da amostra: Suspensão de líquido, solventes aquosos ou orgânicos

Extensão global da análise: 0,003 micrómetros a 3 micrómetros

Modos de análise: Unimodal

Resolução: 31 caixas de tamanho

Reprodutibilidade: Normalmente melhor que 3% CV (amostra dependente)

Fonte de luz: 25mW de Laser Hélio -Néon (632,8 nm)

Sistema de detecção: 6 fibras ópticas localizadas nos seguintes ângulos geométricos: 14,9°, 20,6°, 30,4°, 40,2°, 50,4° e 90° - selecionáveis pelo utilizador.

## **2.2.3. Análise das variáveis envolvidas na obtenção das nanoemulsões**

### **2.2.3.1. Temperatura de emulsificação**

A temperatura de emulsificação utilizada foi entre os 62°C e os 65°C, sendo esta a gama de temperaturas recomendada na literatura por ser a mais estável, e a que levou a melhores resultados em várias dissertações desenvolvidas na área da nanocosmética, utilizando o método de alta energia de emulsificação.

### **2.2.3.3. Influência da velocidade de agitação sobre o tamanho dos glóbulos**

As nanoemulsões foram preparadas a uma velocidade de agitação constante de 14.000 rpm. Antes de iniciar a preparação das nanoemulsões, foi realizado um estudo prévio da literatura existente, com a finalidade de obter os melhores resultados sem se ter de fazer vários testes de velocidades. Como tal, após pesquisa bibliográfica intensiva, concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos com velocidades entre os 13.000 e os 14.000 rpm, para o método escolhido (alta energia de emulsificação) e para a fase oleosa em estudo.

### **2.2.3.4. Quantidade de tensoativo utilizado**

Foram preparadas formulações com 5,0; 8,0 e 10% (p/p) de tensoativo. As amostras foram submetidas à análise macroscópica após vinte e quatro horas da manipulação.

## **2.2.4. Testes de estabilidade**

### *Fatores que influenciam a estabilidade da nanoemulsão*

As suspensões coloidais normalmente não possuem tendência à separação de fases, até alguns meses após a preparação, pois o processo de sedimentação é lento para partículas submicrométricas, sendo minimizado pelo *movimento browniano*. No entanto, com o passar do tempo, pode ocorrer a aglomeração das partículas e, conseqüentemente, o *creaming*. Vários fatores influenciam a estabilidade das suspensões coloidais como, por exemplo, a adsorção de moléculas ativas à superfície das nanopartículas e a presença de tensoativos adsorvidos. Além disso, a avaliação da

estabilidade química dos polímeros formadores dos colóides, sob diferentes condições de armazenamento, é de fundamental importância. O tamanho de partícula, o potencial zeta, a distribuição da massa molar do polímero, o teor de fármaco e o pH são geralmente os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das suspensões coloidais poliméricas. A aplicabilidade industrial de nanopartículas dispersas em meio aquoso pode ser limitada, devido aos problemas de baixa estabilidade físico-química, em períodos de armazenamento prolongados. As principais limitações são a agregação das partículas, a estabilidade química do polímero, do fármaco ou de outras matérias-primas e, ainda, a liberação prematura da substância ativa. <sup>(37)</sup>

- *Floculação*: As gotículas aderem umas às outras formando agregados que se comportam como se fossem gotículas maiores;
- *Creaming*: Os óleos, ao terem uma densidade inferior à da água, podem subir à superfície formando uma “nata” superficial (as gotículas podem não coalescer);
- *Quebra*: Quando combinados, os fenômenos de coalescência e de “creaming” podem originar a “quebra” da emulsão (regeneração das duas fases imiscíveis);
- *Ostwald ripening*: Este processo ocorre em nanoemulsões polidispersas devido à diferença de solubilidade entre s diversos tamanhos de glóbulos, que ocasiona a migração de glóbulos pequenos para o interior dos grandes glóbulos, aumentando a granulometria do sistema, e por final a separação de fases; <sup>(58)</sup>
- *Determinação do valor de pH*;
- *Viscosidade da nanoemulsão*;
- *Temperatura utilizada para a preparação da nanoemulsão*;
- *Agitação utilizada para a preparação da nanoemulsão*.

#### 2.2.4.1. Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica foi realizada logo após a execução da amostra.

Em todos os testes de estabilidade, foram analisados fatores como: separação de fases, *creaming* e diferença de cor. Para caracterizar as amostras utilizou-se a seguinte nomenclatura:

N: Normal; CS: *Creaming* Simples; CI: *Creaming* intenso; SF: Separação de Fases; AC: Alteração de Cor

#### **2.2.4.2. Avaliação microscópica**

Para avaliar microscopicamente a amostra foi colocada uma gota de cada formulação na lâmina de vidro e de seguida coberta por uma lamela. A amostra foi analisada no microscópio Olympus Bx-40. Foram analisados aspetos como homogeneidade da dispersão e características organoléticas, de modo a identificar possíveis processos de instabilidade como *creaming* e/ou separação de fases.

#### **2.2.4.3. Stresse térmico**

Foram colocadas 5,0 g de cada formulação em tubos de ensaio de vidro e submetidas ao aquecimento em banho-maria (VWR – Ultrasonic Cleaner) na faixa de temperatura de  $40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$  a  $80^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ . A cada 30 min foi aumentada a temperatura  $5^{\circ}\text{C}$ . As nanoemulsões foram macroscopicamente analisadas quanto à ocorrência de *creaming* e separação de fases, após cada aumento de temperatura.

#### **2.2.4.4. Teste de centrifugação**

As formulações desenvolvidas foram submetidas ao teste de centrifugação. Este teste fornece informação antecipada de instabilidade do sistema tais como grau de floculação, sendo que esta pode progredir para a coalescência. Foram colocados 5,0 g de cada formulação num frasco de vidro, a 3.000 rpm durante 30 min na centrifugadora (Digicen, marca Orto Alresa), à temperatura ambiente.

As amostras foram analisadas macroscopicamente quanto à formação de separação de fases e *creaming*.

#### **2.2.4.5. Teste de estabilidade acelerada**

As nanoemulsões que passaram nos testes referidos anteriormente foram colocadas em câmaras de estabilidade (Fitoclima S600 e D1200), acondicionadas em frascos de vidro e submetidas à temperatura e humidade T:  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; H:  $60\% \pm 5\%$  e T:  $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ; H:  $75\% \pm 5\%$ , durante 30 dias. As análises foram realizadas nos tempos, 10, 20 e 30 dias. Os parâmetros analisados foram: separação de fase, *creaming*, pH e tamanho de partícula.

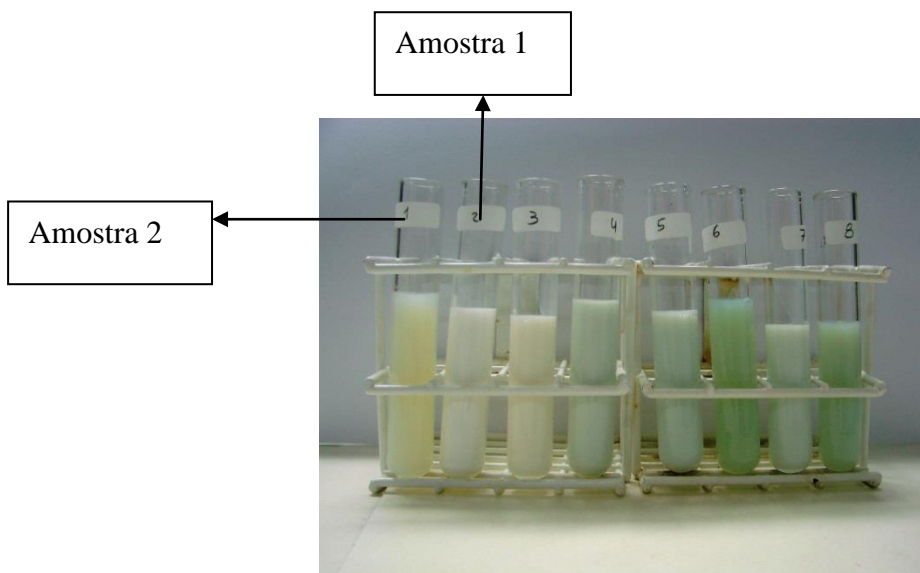
### III. Resultados e discussão

#### 3.1. Obtenção das nanoemulsões

O método de alta energia de emulsificação é um método eficiente na preparação de nanoemulsões O/A, embora seja mais difícil de conseguir bons resultados do que com o método de baixa energia.

As formulações foram avaliadas quanto às características organolépticas após vinte e quatro horas de execução, bem como quanto à homogeneidade dos glóbulos.

Todas as formulações apresentavam boas características, tendo-se então prosseguindo para a realização dos testes de estabilidade (Figura 5).



**Figura 5.** Nanoemulsões desenvolvidas

### 3.2. Avaliação das variáveis que influenciam as características das amostras

#### 3.2.1. Avaliação e influência do pH nas formulações

O acompanhamento do valor do pH é importante para determinar a estabilidade das emulsões, porque as alterações de pH indicam a ocorrência de reações químicas que podem comprometer a qualidade do produto final.

As formulações destinadas ao uso tópico devem possuir valores de pH próximos aos da pele (4,0 e 7,0), a fim de evitar alterações fisiológicas que possam comprometer a sua integridade. <sup>(28)</sup>

Sendo o pH da pele, um valor de referência, os resultados obtidos em todas as formulações estão dentro das especificações (**Tabela 3**), sendo o valor mais baixo (4,31) o da fórmula 2 que contém 4,7% de óleo de Copaíba, 2% de óleo de Calêndula, 8,0% de tensioativo e 85,3% de água purificada. O valor mais alto de pH (5,80) corresponde à formulação 3 que contém 9,9% de óleo de Copaíba, 5,0% de óleo de Calêndula, 0,1 % de vitamina E, 8,0% de tensioativo e 77,0% de água purificada.

**Tabela 3.** Avaliação do pH após 24h de manipulação.

<b>Formulações</b>	<b>pH</b>
Fórmula 1	4,66
Fórmula 2	4,31
Fórmula 3	5,80
Fórmula 4	5,70
Fórmula 5	5,39
Fórmula 6	5,55
Fórmula 7	5,28
Fórmula 8	5,56

O pH das nanoemulsões colocadas em estabilidade foi medido 10 dias após esse processo e, até à data, não foram detetadas diferenças significativas. No entanto, a avaliação do pH após 10, 20 e 30 dias, poderá permitir tirar conclusões mais plausíveis.

### 3.2.2. Avaliação do tamanho de partícula nas formulações

O tamanho de partícula foi avaliado no N5 Submicron Particle Size Analyzer (Espectrofotômetro de correlação fotônica), que determina o tamanho das partículas por medição da taxa de difusão das partículas através de um fluido.

A granulometria é um parâmetro importante na avaliação de sistemas nanoemulsionados, devido ao fato do tamanho das partículas ser o principal fator responsável pelo efeito promotor da permeação de componentes ativos nas camadas da pele. Além do tamanho das partículas, é fundamental conhecermos o índice de polidispersividade, uma vez que estes fatores somados exercem influência na estabilidade destes sistemas.

Todas as formulações apresentaram tamanho de partícula inferior a 500 nm (**Tabela 4**), valor indicado como máximo para a denominação de nanoemulsão, o que significa que o método utilizado, bem como o todo o procedimento na execução das nanoemulsões foi exequível e bem-sucedido.

**Tabela 4.** Tamanho de partícula após 24h de manipulação.

Formulações	Tamanho de partícula (nm)	Índice de polidispersividade
Fórmula 1	221.7	0.219
Fórmula 3	191.3	0.270
Fórmula 4	192.8	0.285
Fórmula 5	149.5	0.283
Fórmula 6	61.9	0.462
Fórmula 8	98.5	0.451

As nanoemulsões com menor quantidade de óleo apresentaram tamanho de partícula menor (Formulações 6 e 8).

As formulações com fase oleosa compreendida entre os 9,9% e 15,0% apresentaram tamanho de partícula superior, em comparação com as restantes formulações, o que explica a influência desta fase no desenvolvimento das nanoemulsões.

As nanoemulsões 2 e 7 ainda se encontram em estudo, embora não sejam formulações problemáticas, uma vez que as características organolépticas e a quantidade de fase oleosa/tensioativo são iguais a outras formulações testadas.

Relativamente à comparação entre as características organolépticas e ao tamanho de partícula, conclui-se que quanto mais translúcida é a nanoemulsão menor é o tamanho de partícula.

### **3.2.2. Temperatura de emulsificação**

Como já referido anteriormente no ponto 2.2.3.1 a temperatura de emulsificação utilizada foi entre os 62°C e os 65°C, sendo esta a gama de temperaturas recomendada na literatura por ser a mais estável, e a que levou a melhores resultados em várias dissertações desenvolvidas na área da nanocosmética, utilizando o método de alta energia de emulsificação.

Como tal, todas as nanoemulsões foram produzidas à mesma temperatura com exceção de duas formulações que após 24h apresentaram uma leve separação de fases. Nestas formulações, a temperatura utilizada foi de 45°C, demonstrando assim que os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

### **3.2.3. Quantidade de tensioativo utilizado**

A estabilidade das emulsões depende intrinsecamente da interação interfásica estabelecida pelo agente emulsivo, com as fases imiscíveis que a constituem. A escolha, proporção e a característica do tensioativo a ser utilizado na preparação da emulsão desejada, podem-se prever através da verificação dos valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) das substâncias envolvidas, o que permite prever o tipo de comportamento esperado do composto a utilizar frente a substâncias polares ou apolares. Os tensioativos devem apresentar valor de EHL equivalente ao da fase dispersa, para poder mantê-la estabilizada frente à fase dispersante. Para determinar o valor de EHL, pode-se recorrer a dados em literatura ou equações baseadas na fórmula

molecular do composto. Quando o EHL de uma substância é desconhecido ou a literatura cita uma ampla faixa de valor, torna-se útil ensaiar a preparação das emulsões com o óleo cujo EHL deve ser determinado, utilizando-se para isso tensioativos de EHL conhecidos. Com a notificação do EHL do óleo, pode-se facilmente verificar os emulgentes ideais com o mesmo valor de EHL. <sup>(39)</sup>

Assim, todas as formulações tiveram como tensioativo o Tween 80 com EHL 15, por ser o mais recomendado para o tipo de nanoemulsão (O/A) e para a fase oleosa estudada.

Como a combinação de óleos foi inovadora, a quantidade de tensioativo variou consoante a quantidade de óleos na fase oleosa. Verificou-se que a formulação com 8,0% de tensioativo e 7% de componentes na fase oleosa, obteve os melhores resultados a nível organolético (nanoemulsão azulada e translúcida) e de tamanho de partícula.

### **3.3. Avaliação dos testes de estabilidade**

Variáveis relacionadas com a formulação, o processo de fabrico, o material de acondicionamento e com as condições ambientais e de transporte, assim como o fato do componente da formulação ser ativo ou não, podem influenciar a estabilidade do produto. As alterações no produto podem ser extrínsecas, ou seja, relacionadas com fatores externos aos quais o produto está exposto (tempo, temperatura, luz, oxigénio, humidade, material de acondicionamento, microrganismos e vibração). Podem também ser intrínsecas, e estarem relacionadas com a natureza das formulações ou, sobretudo, com a interação dos ingredientes entre si e/ou com o material de acondicionamento. Estas últimas podem-se dividir em incompatibilidades físicas e incompatibilidades químicas (por exemplo, devido ao pH, ocorrência de reações de oxidação-redução, reações de hidrólise, etc). <sup>(40)</sup> A avaliação da qualidade farmacêutica dos produtos dermatológicos é de fundamental importância, principalmente em termos de estabilidade físico-química. <sup>(41)</sup>

### 3.3.1. Avaliação macroscópica e microscópica

A amostra deve ser analisada, em relação ao padrão, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases, de precipitação ou de turvação, deve ser um sinal indicativo de estabilidade da amostra ensaiada.

Em relação à avaliação microscópica, as nanoemulsões apresentaram-se homogêneas, não se tendo formado regiões de anisotropia. Portanto, não foi possível observar a presença de cristais líquidos (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Avaliação organolética após 24h de manipulação.

Formulações	Avaliação macroscópica	Avaliação Organolética
Fórmula 1	N	Nanoemulsão branca, opaca e leitosa
Fórmula 2	N	Nanoemulsão branca, opaca e translúcida
Fórmula 3	N	Nanoemulsão branca, opaca e leitosa
Fórmula 4	N	Nanoemulsão branca, opaca e leitosa
Fórmula 5	N	Nanoemulsão branca, opaca e leitosa
Fórmula 6	N	Nanoemulsão azulada e translúcida
Fórmula 7	N	Nanoemulsão branca, opaca e leitosa
Fórmula 8	N	Nanoemulsão azulada e translúcida

N: Normal; CS: *Creaming* Simples; CI: *Creaming* intenso; SF: Separação de Fases; AC: Alteração de Cor

### 3.3.2. Análise macroscópica após teste de centrifugação e stresse térmico

A centrifugação promove stresse na amostra, simulando um aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto

e coalescência. <sup>(40)</sup> Em nanoemulsões, a força da gravidade é superada pelo *efeito browniano* das partículas, e dificilmente são provocados efeitos relevantes de instabilidade no sistema. Contudo, em formulações que apresentam um alto índice de polidispersividade, a centrifugação acelera o processo de *creaming*, uma vez que as partículas maiores tendem a migrar para a superfície.

Assim, o efeito da gravidade a longo prazo sobre as formulações pode ser estimado utilizando velocidades de centrifugação moderadas.

Todas as formulações com percentagem de óleo entre 9,9% e 15,0% apresentaram alterações nos testes de centrifugação, coincidindo com as formulações que apresentaram um tamanho de partícula maior (**Tabela 6**).

**Tabela 6.** Teste de centrifugação e stresse térmico.

Formulações	Centrifugação (Stresse mecânico)	Stresse Térmico								
		40°	45°	50°	55°	60°	65°	70°	75°	80°
<b>Fórmula 1</b>	CI	N	N	N	N	N	N	N	N	N
<b>Fórmula 2</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N/AC
<b>Fórmula 3</b>	CI	N	N	N	N	N	N	N	CS	CS
<b>Fórmula 4</b>	CS	N	N	N	N	N	CS	CI	CI	CI
<b>Fórmula 5</b>	CS	N	N	N	N	N	N	N	CS	CS
<b>Fórmula 6</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N/AC
<b>Fórmula 7</b>	CS	N	N	N	N	N	N	N	N	CS
<b>Fórmula 8</b>	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N

N: Normal; CS: *Creaming* Simples; CI: *Creaming* intenso; SF: Separação de Fases; AC: Alteração de Cor

A ocorrência de *creaming* numa emulsão é aceitável do ponto de vista farmacêutico ou cosmético, desde que seja passível de ser reconstituída por agitação moderada. No entanto, descartaram-se essas emulsões porque a separação de fases torna o produto pouco estético e distante do padrão de qualidade estimado pelo consumidor.

### 3.3.3. Teste de estabilidade acelerada

Este teste tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, o seu tempo de vida útil e a compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento.

Recomenda-se que as amostras para avaliação da estabilidade sejam acondicionadas em frascos de vidro neutro, transparentes, com uma tampa que garanta uma boa estanquicidade, evitando assim perda de gases ou vapor para o meio. A quantidade de produto deve ser suficiente para as avaliações que sejam necessárias. Se houver incompatibilidade conhecida entre os componentes da formulação e o vidro, o formulador deve selecionar outro material de acondicionamento. A utilização de outros materiais fica a critério do formulador, dependendo dos seus conhecimentos sobre a formulação e sobre os materiais de acondicionamento. Deve-se evitar a incorporação de ar no produto, durante a introdução no recipiente de teste. Não se deve completar o volume total da embalagem deixando um espaço vazio (*head space*), de aproximadamente um terço da capacidade do frasco, para serem possíveis trocas gasosas.

Pode-se utilizar, em paralelo ao vidro neutro, o material de acondicionamento final, antecipando-se, assim, a avaliação da compatibilidade entre a formulação e a embalagem.<sup>(40)</sup>

As formulações que passaram nos testes de estabilidade anteriores foram colocadas em estabilidade acelerada. Após 10 dias as nanoemulsões não apresentaram alterações organolépticas (**Tabela 7**), continuando o estudo durante 20 dias.

**Tabela 7.** Estabilidade das nanoemulsões após 10 dias.

Formulações	Antes de colocar em estabilidade	T: 25°C ± 2°C; H: 60% ± 5%	T: 40°C ± 2°C; H: 75% ± 5%
<b>Fórmula 2</b>	N	N	N
<b>Fórmula 6</b>	N	N	N
<b>Fórmula 8</b>	N	N	N

N: Normal; CS: *Creaming* Simples; CI: *Creaming* intenso; SF: Separação de Fases; AC: Alteração de Cor

#### IV. Conclusões e perspectivas

A partir dos estudos realizados e dos resultados obtidos pode-se concluir que o método escolhido para a realização das nanoemulsões foi o mais adequado e eficiente, uma vez que todos os resultados de tamanho de partícula estão conformes.

O tensioativo e a quantidade de fase oleosa usados foram dois fatores muito importantes, uma vez que influenciaram o tamanho de partícula e os parâmetros organoléticos. Apesar disso, todas as nanoemulsões apresentaram resultados muito satisfatórios nas primeiras 24h após a manipulação.

A escolha do tensioativo e as quantidades testadas, tiveram como base a bibliografia disponível, o que facilitou o desenvolvimento das nanoemulsões.

A velocidade de agitação tal como a temperatura de emulsificação também foram avaliadas e estudadas antes da realização das formulações, e os resultados obtidos foram ao encontro do previsto na literatura; a temperatura de emulsificação foi aproximadamente 63°C, a temperatura final de emulsificação ficou nos 45°C e a velocidade de agitação usada foi de aproximadamente 14.000 rpm.

Os estudos de estabilidade permitiram avaliar o comportamento das nanoemulsões a longo prazo. Através de vários testes de estabilidade, conclui-se que as formulações que apresentaram melhores resultados foram as formulações 2, 6 e 8 (**Tabela 8**).

**Tabela 8.** Formulações com melhores resultados.

Fórmulas	Fase oleosa				Tensioativo	Fase aquosa
	Óleo de Copaíba	Óleo de Calendula	Essência de Camomila	Vitamina E		
					Tween 80	Água Purificada
Fórmula 2	4,7%	2,0%	---	---	8,0%	85,3%
Fórmula 6	4,7%	2,0%	0,2%	0,1%	8,0%	85,0%
Fórmula 8	5,0%	2,0%	0,2%	0,1%	8,0%	84,7%

Os óleos utilizados nas formulações são considerados, pela literatura, bons anti-inflamatórios; porém, este efeito terá de ser avaliado mais ao pormenor, tal como as possíveis interações do produto com a pele.

Para estudos posteriores, a estabilidade do produto é um fator importante e como tal, testes como o do Ciclo de temperatura (consiste em submeter as amostras à temperatura de  $45 \pm 2^\circ \text{C}$ , durante 24h e depois à temperatura de  $4 \pm 2^\circ \text{C}$  por outras 24h, completando assim um ciclo)<sup>(38)</sup> são importantes e interessantes para o estudo.

Outros parâmetros, como o comportamento reológico das formulações e o potencial zeta têm grande interesse para o desenvolvimento das nanoemulsões.

A avaliação da aplicabilidade do produto em doentes com psoríase é de enorme importância, uma vez que as formulações realizadas têm todas as condições para prosseguirem com a avaliação. Assim, a realização de ensaios clínicos é de extrema importância neste estudo, para comprovar a eficácia do produto e verificar possíveis interações com a pele.

## V. Bibliografia

1. Davidson A, Diamond B. (2001). Autoimmune diseases. *N Engl J Med.*, 345: 340-50.
2. Christophers E. (2001). Psoriasis - epidemiology and clinical spectrum. *Clin Exp Dermatol.*, 26: 314-20.
3. Kormeili T, Lowe NJ, Yamauchi PS. (2004). Psoriasis: immunopathogenesis and evolving immunomodulators and systemic therapies. U.S. experiences. *Br J Dermatol.*, 151: 3-15.
4. Bowcock AM, Cookson WOCM. (2004). The genetics of psoriasis, psoriatic arthritis and atopic dermatitis. *Hum Mol Genet.*, 13:43-55.
5. Campalani E, Barker JNWN. (2005). Current Genomics. *Atual Genomics*, Benthan Science Publishers, 6: 52-60.
6. Traub M, Marshall K. (2007). Psoriasis – Pathophysiology, conventional, and alternative approaches to treatment. *Alternative medicine review*, 12: 319-328.
7. Bauer KBA, Bechtel MMD. (2009). Therapeutic success requires clinicians to understand emerging and established safety concerns. A Review of Complications of Biologic, Therapy for Psoriasis. Disponível em: <http://www.psoriaderm.com>. Acedido em: Janeiro de 2013.
8. Associação Portuguesa da Psoríase, disponível em: [http://www.psoportugal.com/index.php?option=com\\_content&task=blogcategory&id=24&Itemid=48](http://www.psoportugal.com/index.php?option=com_content&task=blogcategory&id=24&Itemid=48). Acedido em: Janeiro de 2013.
9. Lowes MA, Bowcock AM, Krueger JG. (2007). Pathogenesis and therapy of psoriasis. *Nature*, 445: 866-873.

10. Menter A, Gottlieb A, Feldman SR, Van Voorhees A, Leonardi CL, Gordon KB, et al. (2008). Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: Section 1. Overview of psoriasis and guidelines of care for the treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol.*, 58: 826-850.
11. Nickoloff BJ, Nestle FO. (2004) Recent insights into the immunopathogenesis of psoriasis provide new therapeutic opportunities. *J Clin Invest.*, 113: 1664-1675.
12. Mackenzie B, Kastelein RA, Cua DJ. (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.*, 27: 17-23.
13. Guttman-Yassky E, Krueger JG. (2007). Psoriasis: evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research. *Br J Dermatol.*, 157: 1103-1115.
14. Sugiyama H, Gyulai R, Toichi E, Garaczi E, Shimada S, Stevens SR, et al. (2005). Dysfunctional blood and target tissue CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J Immunol.*, 174: 164-173.
15. Gottlieb AB, Chamian F, Masud S, Cardinale I, Abello MV, Lowes MA, et al. (2005). TNF inhibition rapidly down-regulates multiple proinflammatory pathways in psoriasis plaques. *J Immunol.*, 175: 2721-2729.
16. Zaba LC, Cardinale I, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Suárez-Fariñas M, Fuentes-Duculan J, et al. (2007). Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J Exp Med.*, 204: 3183-3194.
17. Loyola AJC, Castro LCM, Chaibub SCW, Ximenes AC. (2005). Influximab no tratamento da artrite psoriásica grave. *An Bras Dermatol.*, 80: 535-537.
18. Kourosch AS, Miner A, Menter A. (2008). Psoriasis as the marker of underlying systemic disease. *Skin Therapy Lett.*, 13:1-5.

19. Programa de apoio à psoríase. Disponível em: <http://www.psorinfo.com>. Acedido em: Janeiro de 2013.
20. Rodrigues AP, Teixeira RM. (2009). Desvendando a psoríase. Rev Bras Anal Clin., 4: 303-309.
21. Barata EAF. (2002) Cosméticos; Arte e Ciência. Lidel. pp. 1.
22. Dias AMPSP. (2008). Monografia nutrição e a pele cutânea. Monografia publicada no Google académico. Acedido em: Julho de 2013.
23. Constituição da pele; disponível em:  
<https://www.google.pt/search?q=constitui%C3%A7%C3%A3o+da+pele>. Acedido em: Junho de 2013.
24. Silpa R, Shoma JEUA, Sumod MS. (2012). Nanotecnologia em cosméticos: Oportunidades e desafios. J Pharm Sci Bioallied., 4:186-193.
25. Royal Society “Nanociências e nanotecnologias: Oportunidades e incertezas”, Royal Society de Londres, Disponível em: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.htm>. Acedido em: Março de 2013.
26. Morganti P. (2010). Uso e potencial da nanotecnologia na dermatologia cosmética. Clin Cosmet Investig Dermatol., 3: 5-13.
27. Ball P. (2003). Nanotecnologia na linha de fogo. Disponível em:  
<http://nanotechweb.org/cws/article/indepht/18804>. Acedido em: Janeiro de 2013.
28. Oliveira BR. (2008). Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com óleos de *Carapa guianensis* e *Copaifera* sp. e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti*. Biblioteca Digital Usp (Teses e Dissertações). Disponível em: [www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-31032009-132918](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-31032009-132918).

29. Waniorek L. (1992). *Cosmética Natural*, Círculo de Leitores, pp. 13-19.
30. Barata EAF. (2002). *Cosméticos, Arte e Ciência*, Lidel, pp. 53 e 115.
31. Proença da Cunha A, Nogueira MT, Roque OR, Barroso JMG. (2012). *Plantas aromáticas e óleos essenciais: composição e aplicações*; 1ª Edição, Gulbenkian.
32. Ruivo JSP. (2012). *Fitocosmética: aplicação de extratos vegetais em cosmética e dermatologia*. Disponível em:  
[http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3574/3/T\\_JoanaRuivo.pdf](http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3574/3/T_JoanaRuivo.pdf).
33. Valdir F, Junior V, Pinto AC. (2002). O Género *Copaifera* L. *Quim. Nova*, 25: 273-286.
34. Emulsões; disponível em:  
<http://www.fcf.usp.br/Departamentos/FBF/Disciplinas/Farmacotecnica/EMULSOES1.htm>. Acedido em: Agosto de 2013.
35. Emulsão O/A; disponível em:  
<http://www.google.pt/imgres?newwindow=1&safe=off&sa=X&biw=1280&bih=709&tbid=S6I43xBIhGjmXM:&imgrefurl=http://dc362.4shared.com/doc/LzAS6sBE/preview.html&docid=ahQGG3j7WedMEM&imgurl=http://dc362.4shared.com/doc>. Acedido em: Agosto de 2013.
36. Coulter CN5. (2003). *Submicron Particle Size Analyzer. PCS Software Help Manual*.
37. Schaffazick SR, Guterres SS, Freitas LL, Pohlmann, AR. (2003). Caracterização e estabilidade físico-química de poliméricos; Nanopartículas para administração de fármacos. *Quim. Nova*, 26: 726-737.
38. Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS, Teixeira HF (2012) Nanoemulsões como sistemas de liberação parental de fármacos. *Quim. Nova*, 35: 1827-1840.

- 39.** Zanin SMW, Miguel MD, Chimelli M, Oliveira AB. Hydrophile-Lipophile Balance (HLB) determination of vegetable oil family; disponível em: <http://www.visaoacademica.ufpr.br/v3n1/hidrofilo.htm>. Acedido em: Julho de 2013.
- 40.** Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, 29: 81-96.
- 41.** Friedrich M, Primo FT, Funck JAB, Laporta LV, Alves MP, Bittencourt CF, Escarrone ALV. (2007). Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico no formulário nacional. *Lat Am J Pharm.*, 26: 558-863.
- 42.** Cosméticos; Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos; disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/public/series/cosmeticos.pdf>. Acedido em: Julho de 2013.
- 43.** Maique WB, Dossin D, Deschamps FC, Lima MP. (2006). Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade, *Rev Bras Farmacogn.*, 16: 230-235.

VI. Anexos

Formulação 6



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra1(100nm)

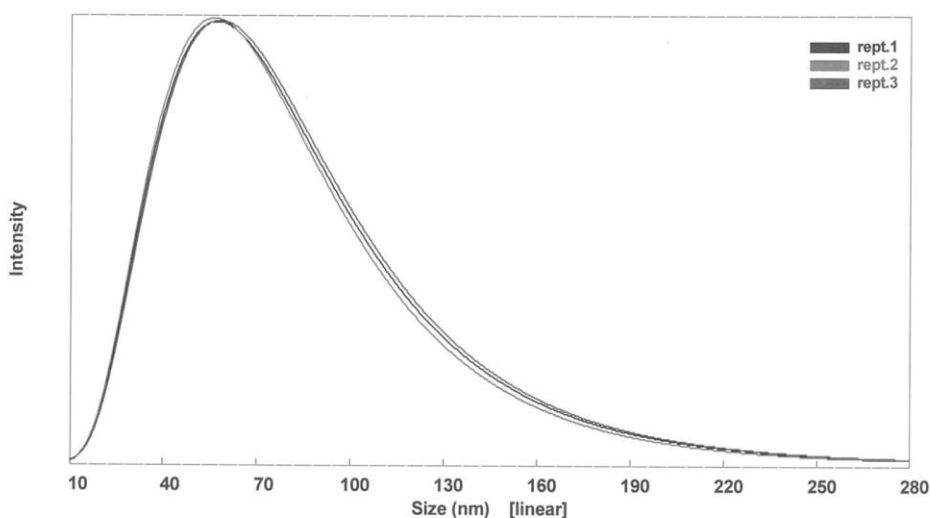
Sample Name: Amostra1(100nm)

Comments:  
Operator: Tânia  
Temperature: 20.0°C  
Start Time: 29-Oct-13 03:08:43 PM  
Auto SDP: No  
Angle: 90.0 °  
Run Time(manual): 170s  
Sample Time(auto): 2 us  
Prescale(auto): 2  
21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: Amostra1(100nm).som  
Diluent: WATER  
End Time: 29-Oct-13 03:23:41 PM  
Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

Unimodal Results Summary

Rept#.	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
Rept.1	62.0	0.482	6.91e-12	2.53e+05	0.03%	0
Rept.2	60.8	0.438	7.04e-12	2.50e+05	-0.01%	0
Rept.3	62.9	0.466	6.81e-12	2.55e+05	0.09%	164
Average	61.9 ± 0.84	0.462 ± 0.018				



Formulação 8



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra2(100nm)

Sample Name: Amostra2(100nm)

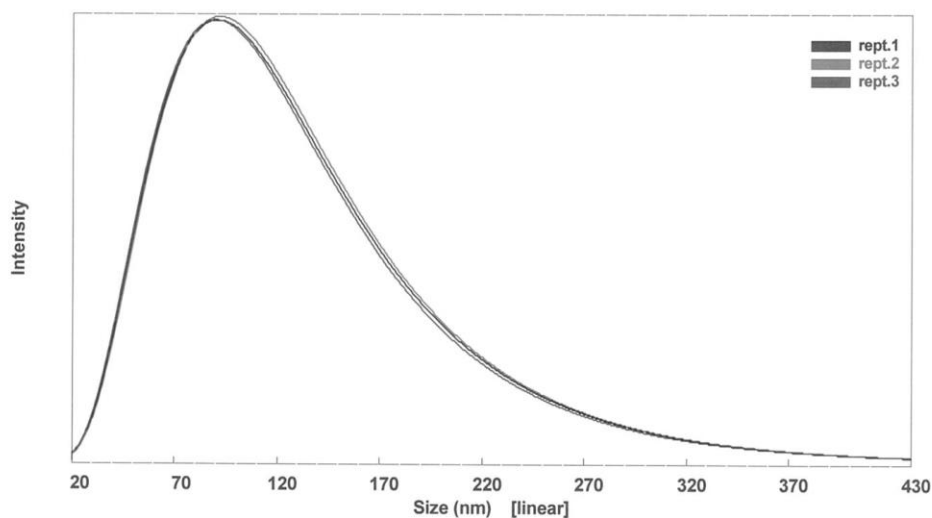
Comments:

Operator: Tânia  
Temperature: 20.0°C  
Start Time: 29-Oct-13 04:32:15 PM  
Auto SDP: No  
Angle: 90.0 °  
Run Time(manual): 170s  
Sample Time(auto): 2.5 us  
Prescale(auto): 4  
21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: Amostra2(100nm).som  
Diluent: WATER  
End Time: 29-Oct-13 04:47:13 PM  
Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

90.0° Unimodal Distribution  
Unimodal Results Summary

Rept#.	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
Rept.1	98.5	0.466	4.35e-12	4.23e+05	0.02%	0
Rept.2	99.5	0.425	4.30e-12	4.31e+05	0.05%	0
Rept.3	97.3	0.464	4.40e-12	4.14e+05	0.03%	0
Average	98.5 ± 0.90	0.451 ± 0.019				



Formulação 3



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra3(500nm)

Sample Name: Amostra3(500nm)

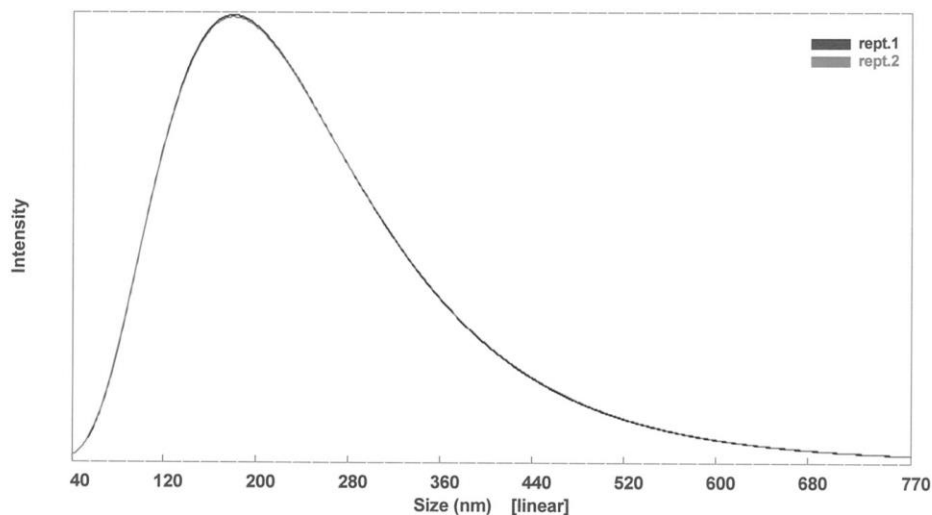
Comments:

Operator: Tânia  
 Temperature: 20.0°C  
 Start Time: 29-Oct-13 06:22:25 PM  
 Auto SDP: No  
 Angle: 90.0 °  
 Run Time(manual): 850s  
 Sample Time(auto): 4 us  
 Prescale(auto): 8  
 21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: Amostra3(500nm).som  
 Diluent: WATER  
 End Time: 29-Oct-13 06:56:47 PM  
 Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

Unimodal Results Summary

Rept#.	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
Rept.1	191.1	0.265	2.24e-12	9.53e+05	0.02%	0
Rept.2	191.5	0.274	2.24e-12	9.45e+05	0.03%	0
Average	191.3 ± 0.21	0.270 ± 0.005				



**Formulação 1**



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra4(100nm)

**Sample Name: Amostra4(100nm)**

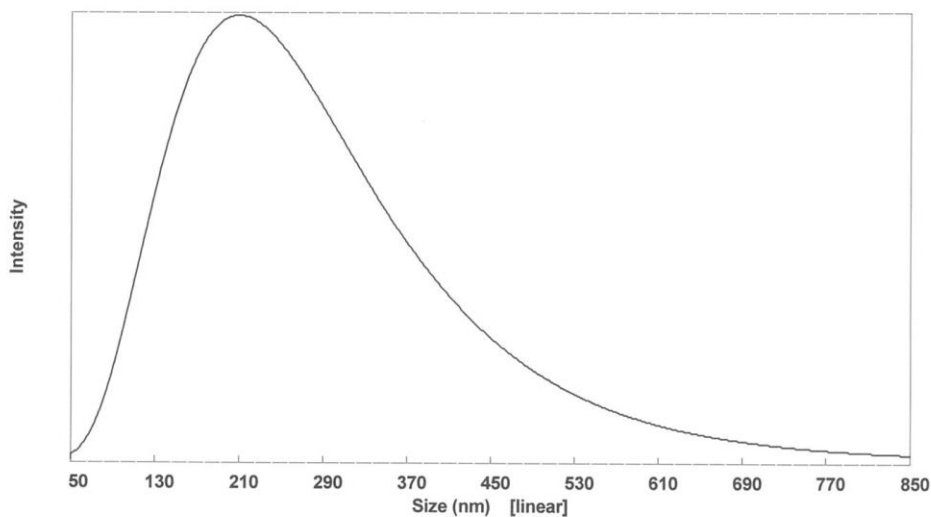
Comments:

Operator: Tânia  
 Temperature: 20.0°C  
 Start Time: 29-Oct-13 07:22:03 PM  
 Auto SDP: No  
 Angle: 90.0 °  
 Run Time(manual): 170s  
 Sample Time(auto): 4.5 us  
 Prescale(auto): 8  
 21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: Amostra4(100nm).som  
 Diluent: WATER  
 End Time: 29-Oct-13 07:30:27 PM  
 Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

**Unimodal Results Summary**

Angle	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
90.0°	221.7	0.219	1.93e-12	8.62e+05	0.01%	0



Formulação 4



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra5

Sample Name: Amostra5

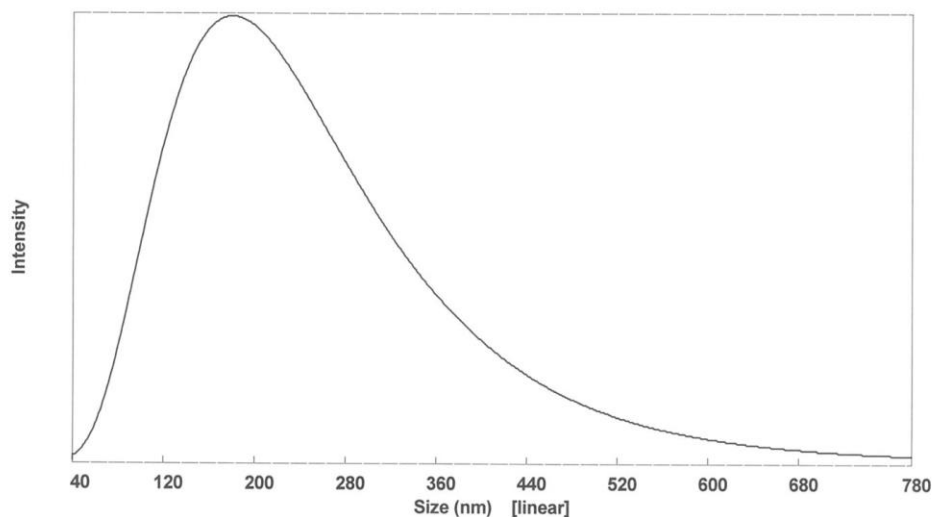
Comments:

Operator: Tânia  
 Temperature: 20.0°C  
 Start Time: 29-Oct-13 07:45:53 PM  
 Auto SDP: No  
 Angle: 90.0 °  
 Run Time(manual): 170s  
 Sample Time(auto): 4 us  
 Prescale(auto): 8  
 21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: Amostra5.som  
 Diluent: WATER  
 End Time: 29-Oct-13 07:54:17 PM  
 Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

Unimodal Results Summary

Angle	Mean (nm)	P.I.	Diff. Coef (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
90.0°	192.8	0.285	2.22e-12	8.03e+05	0.02%	0



Formulação 5



PCS Submicron Particle Size Analyzer

Page 1 of 1  
Sample: Amostra6

Sample Name: Amostra6

Comments:

Operator: Tânia  
 Temperature: 20.0°C  
 Start Time: 29-Oct-13 08:10:59 PM  
 Auto SDP: No  
 Angle: 90.0 °  
 Run Time(manual): 170s  
 Sample Time(auto): 3.5 us  
 Prescale(auto): 4  
 21 CFR Part 11 Compliant? No

SOM / SOP Name: amostra6.som  
 Diluent: WATER  
 End Time: 29-Oct-13 08:19:23 PM  
 Diluent Viscosity / RI: 1.002 cP / 1.333

Unimodal Results Summary

Angle	Mean (nm)	P.I.	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Counts/s	Baseline Error	Overflow
90.0°	149.5	0.283	2.87e-12	4.57e+05	0.05%	0

