



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLAUDIA TIEMI NAKANO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE LINHAÇA ADITIVADA DE EXTRATO DE CAFÉ
VERDE E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO TERAPÊUTICO
NOS DANOS OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO
UVB**

Londrina
2022

CLAUDIA TIEMI NAKANO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE LINHAÇA ADITIVADA DE EXTRATO DE CAFÉ
VERDE E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO TERAPÊUTICO
NOS DANOS OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO
UVB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Georgetti

Londrina
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Nakano, Claudia Tiemi.

Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de linhaça aditivada de extrato de café verde e avaliação do seu efeito terapêutico nos danos oxidativos causados pela radiação UVB / Claudia Tiemi Nakano. - Londrina, 2022.

160 f. : il.

Orientador: Sandra Regina Georgetti.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Nanoemulsão - Tese. 2. Óleo de linhaça - Tese. 3. Extrato de café verde - Tese. 4. Radiação ultravioleta - Tese. I. Georgetti, Sandra Regina . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDU 50

CLAUDIA TIEMI NAKANO

**DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO À BASE DE
ÓLEO DE LINHAÇA ADITIVADA DE EXTRATO DE CAFÉ
VERDE E AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO TERAPÊUTICO
NOS DANOS OXIDATIVOS CAUSADOS PELA RADIAÇÃO
UVB**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Georgetti
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Rúbia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof.^a Dr.^a Fabiana Testa Moura de Carvalho
Vicentini
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de
Ribeirão Preto - USP

Londrina, 11 de março de 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTO (S)

Primeiramente agradeço à Deus, pela vida e por todos os privilégios que recebo, pelos amparos em momentos difíceis e pelas experiências e oportunidades que surgiram durante esse processo.

Aos meus pais, Angela e Mauro, por serem meu alicerce, por me ajudarem e apoiarem a todo momento, por torcerem incansavelmente e, principalmente, por dedicar todo o seu amor à mim. Muito obrigada. Amo vocês!

À minha orientadora, Prof.^a Dr^a Sandra Regina Georgetti, que esteve sempre ao meu lado contribuindo com toda sua experiência e ensinamentos durante esses anos. Agradeço ainda pelo exemplo de profissionalismo, dedicação e integridade. Sobretudo, obrigada pela confiança!

Agradeço aos membros do Laboratório CEPPOS, em especial à Letícia e Milena, que não mediram esforços para contribuir na realização desse trabalho e por estarem sempre disponíveis quando precisei. Agradeço também à Clara, por me proporcionar ensinamentos tão sábios e experiências que contribuíram para minha evolução.

Muito obrigada à todos os meus amigos, Bruna, Marcela, Lumy e Massahiro, pelos conselhos, pelas palavras de apoio e carinho, pela cumplicidade e por serem meu suporte. Agradeço por fazerem parte da minha vida!

Por fim, sou imensamente grata a todos os outros mediadores que dedicaram seu tempo pra que esse trabalho fosse concretizado.

OBRIGADA À TODOS! Esse trabalho não teria sido realizado sem a contribuição de todos vocês. Meus mais sinceros agradecimentos!

NAKANO, Claudia Tiemi. **Desenvolvimento de nanoemulsão à base de óleo de linhaça aditivada de extrato de café verde e avaliação do seu efeito terapêutico nos danos oxidativos causados pela radiação UVB**. 2022. 160 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

A associação da nanotecnologia à insumos de origem vegetal tem levado a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos para aplicação contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (RUV) sobre a pele. Portanto, vislumbrando a aplicabilidade de uma nanoemulsão (NE) com potencial fotoquimioprotetora, o presente trabalho utilizou óleo de linhaça (OL) que possui propriedades antiinflamatórias devido presença de ácidos graxos essenciais e extrato de café verde (ECV) rico em compostos fenólicos com potencial antioxidante. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver e caracterizar uma NE utilizando o OL como fase oleosa e aditivada de diferentes concentrações de ECV, e avaliar seu efeito *in vivo* contra danos oxidativos causados pela radiação ultravioleta B (RUVB). O OL apresentou resultados satisfatórios nos testes de qualidade e o ECV demonstrou capacidade antioxidante por meio de diferentes métodos *in vitro*. Foram obtidas formulações estáveis e nanométricas utilizando como par de tensoativos o Span[®]80 e Chremophor[®]RH40 com EHL requerido (EHL_{req}) no valor de 10,0. Esta NE foi incorporada de ECV nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0% (p/p) e foram avaliadas quanto ao tamanho médio das partículas, obtendo valores menores que 200 nm e índice de polidispersividade (IP) inferior a 0,2. Foi observado um aumento de condutividade com a adição do ECV às NEs e o valor médio do pH foi de 5,15. O potencial zeta ficou na faixa de -26,1 a -38,5 mV e o comportamento reológico evidenciou-se do tipo newtoniano. Além disso, imagens realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) demonstraram gotículas de formato esférico e distribuição uniforme. Foi possível detectar conteúdo de polifenóis totais e atividade sequestradora de radical livre das diferentes NEs. Contudo, somente a NE com a menor concentração de ECV (0,25%) demonstrou diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO) e aumento da capacidade antioxidante da pele (FRAP e ABTS) após exposição a RUVB na pele de camundongos sem pelo. De acordo com os resultados obtidos, NEs obtidas com OL e contendo ECV foram desenvolvidas, exibiram boas características, podendo ser consideradas para futuras investigações como formulações antienvhecimento para a pele.

Palavras-chave: nanotecnologia; EROs; emulsão; estabilidade; antioxidante.

NAKANO, Claudia Tiemi. **Development of linseed oil-based nanoemulsion with added green coffee extract and evaluation of its therapeutic effect on oxidative damage caused by UVB radiation**. 2022. 160 p. Dissertation (Master's degree in Pharmaceutical Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The association of nanotechnology with plant-based inputs led to research to develop new products for the deleterious effects of ultraviolet radiation (UVR) on the skin. Therefore, envisioning the applicability of a nanoemulsion (NE) with photochemoprotective potential, the present work used linseed oil (LO) which has anti-inflammatory properties due to the presence of essential fatty acids and green coffee extract (GCE) rich in phenolic compounds with work potential. Thus, the objective of this work is to develop and characterize an NE using LO as the oil phase and with addition of different concentrations of GCE, and to evaluate its in vivo effect against oxidative damage caused by ultraviolet B radiation (UVBR). The LO showed satisfactory results in quality tests and the GCE demonstrated antioxidant capacity through different in vitro methods. Stable and nanometric formulations were obtained using Span®80 and Chremophor®RH40 as a pair of surfactants with HLB required (HLBreq) of 10.0. This NE was incorporated from GCE at concentrations of 0.25, 0.5 and 1.0% (w/w) and were evaluated for the average size of the particles, obtaining values lower than 200 nm and a polydispersion index (PI) lower than 0.2. An increase in conductivity was observed with the addition of GCE to NEs and the mean pH value was 5.15. The zeta potential was in the range of -26.1 to -38.5 mV and the rheological behavior was of the Newtonian type. In addition, images performed by transmission electron microscopy (TEM) showed droplets of spherical shape and uniform distribution. It was possible to detect total polyphenol content and free radical scavenging activity of the different NEs. However, only NE with the lowest concentration of GCE (0.25%) demonstrated decreased myeloperoxidase (MPO) activity and increased skin antioxidant capacity (FRAP and ABTS) after exposure to UVBR in the skin of hairless mice. According to the results obtained, NEs obtained with LO and containing GCE were developed, exhibited good characteristics, and can be considered for future investigations as anti-aging formulations for the skin.

Key words: nanotechnology; ROS; emulsion; stability; antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática dos glóbulos de emulsões O/A e A/O.....	15
Figura 2 – Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões.....	21
Figura 3 – Representação esquemática da pele e seus elementos.....	25
Figura 4 – Espectro da radiação ultravioleta.....	27
Figura 5 – Representação esquemática da redução do oxigênio molecular à água, e geração de EROs.....	29
Figura 6 – Cromatogramas dos bioativos presentes no ECV. Detecção em (A) 320 nm para o 5-ACQ e (B) 272 nm para cafeína.....	58
Figura 7 – Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical livre DPPH do ECV. Linearidade do ECV (A) diluído em água e (B) etanol 50%. Os resultados estão representados pela média \pm EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.....	64
Figura 8 – Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical livre DPPH do ECV. Curva concentração-resposta do ECV (A) diluído em água e (B) etanol 50%. Os resultados estão representados pela média \pm EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.....	64
Figura 9 – Atividade sequestradora do radical ABTS pelo ECV. (A) Linearidade e (B) concentração resposta. Os resultados estão representados pela média \pm EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.....	66
Figura 10 – Atividade sequestradora de radicais livres (%) gerados pelo sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP pelo ECV. (A) Linearidade e (B) curva concentração resposta. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os dados são representados pela média \pm EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.....	68
Figura 12 – Distribuição granulométrica da NE contendo (A) 0,25%, (B) 0,5% e (C) 1,0% ECV.....	83

Figura 13 – Imagem de microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a morfologia da NE (A) sem o ECV e (B) contendo 0,25% ECV. Escala 0,2 μ m, aumento de 30.000x.....	86
Figura 14 – Reogramas de tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento das NEs (A) base, (B) 0,25%, (C) 0,5% e (D) 1,0% ECV.....	87
Figura 15 – Atividade sequestradora do radical DPPH do ECV livre e das NEs aditivadas em diferentes concentrações. *Diferença estatisticamente significativa em comparação com ECV livre ($p < 0,05$) e **Diferença estatisticamente significativa em comparação NE aditiva.	91
Figura 16 – Imagens do teste de irritação aguda em camundongos tratados com a NE (1) sem ECV, (2) com 0,25%, (3) com 0,5% e (4) com 1,0% ECV; (a) imediatamente após a aplicação das NEs e (b) 72h após aplicação.	96
Figura 17 – Avaliação da atividade da MPO induzida pela RUVB. A inflamação da pele foi determinada em amostras coletadas 12h após o término da irradiação. As barras representam as médias \pm SEM de 6 camundongos por grupo e são representativas de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido do teste de Tukey [$\bullet p < 0,05$ em relação ao grupo não irradiado (barra branca); $\# p < 0,05$ em relação ao grupo irradiado (barra preta)]......	98
Figura 18 – Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio de (A) FRAP e (B) ABTS. O potencial antioxidante foi determinado em amostras coletadas após 12h de irradiação. As barras representam as médias \pm SEM de 6 camundongos por grupo e são representativas de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey [$\ast p < 0,05$ em relação ao grupo não irradiado (barra branca); $\# p < 0,05$ em relação ao grupo irradiado (barra preta)]......	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição % (p/p) de tensoativos hidrofílico e lipofílico utilizados na determinação do EHLreq para o OL.....	46
Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas do OL.....	69
Tabela 3 – Avaliação macroscópica das formulações com diferentes pares de tensoativos após 24h de preparo para determinação do sistema tensoativo.....	76
Tabela 4 – Avaliação macroscópica e microscópica das formulações de EHL 10,0 contendo 5 e 10% OL, com par de tensoativos SPA®80/ Chremophor®RH40.....	77
Tabela 5 – Caracterização físico-química das NEs aditivadas e não de ECV.	81
Tabela 6 – Parâmetros do comportamento reológico das NEs aditivadas e não de ECV determinados pela Lei de Potência.	87
Tabela 7 – Conteúdo de polifenóis totais das NEs aditivadas de ECV em diferentes concentrações, expressando os valores reais e teóricos em µg/g, e o conteúdo total em %.	89
Tabela 8 – Resultados dos testes de estabilidade preliminar das NEs, aditivadas e não de ECV, submetidas ao processo de ciclo gela-degela.	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Radical 2,2' azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACQ	Ácido cafeiolquínico
ACG	Ácido clorogênico
AFQ	Ácido feruloiquínico
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ECV	Extrato de café verde
EPI	Emulsion Phase Inversion
EPM	Erro padrão médio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fe ²⁺	Íon ferroso
Fe ³⁺	Íon férrico
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorídrico
HRP	<i>Horseadish peroxidase</i>
HTAB	Brometo de hexadecil trietil amônio
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
IP	Índice de polidispersividade
KCl	Cloreto de potássio
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MPO	Mieloperoxidase
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NE	Nanoemulsão

O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
OL	Óleo de linhaça
PI	Período de indução
p-CuAQ	Ácido p-cumaroilquínico
R ²	Coefficiente de correlação linear
RNA	Ácido ribonucleico
RUV	Radiação ultravioleta
RUVB	Radiação ultravioleta B
TPTZ	2,4,6-Tris(2piridil)-s-triazina-ferro
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	Emulsões	14
2.2	Nanotecnologia e Nanoemulsões	17
2.3	Óleo de Linhaça	21
2.4	A Pele	23
2.5	Radiação Ultravioleta e suas Consequências na Pele	26
2.6	Radicais Livres e Estresse Oxidativo	29
2.7	Extrato de Café Verde	31
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo Geral	35
3.1.1	Objetivos Específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Materiais	36
4.1.1	Ativo	36
4.1.2	Fase Oleosa	36
4.1.3	Fase Aquosa	36
4.1.4	Tensoativos	36
4.2	Métodos	37
4.2.1	Preparo do ECV	37
4.2.2	Caracterização Química do ECV	37
4.2.2.1	Identificação e quantificação de bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	37
4.2.2.2	Determinação do conteúdo de polifenóis totais	38
4.2.2.3	Determinação do conteúdo de flavonoides totais	39
4.2.3	Avaliação da Atividade Antioxidante do ECV por Diferentes Métodos <i>In Vitro</i>	39
4.2.3.1	Determinação da atividade sequestradora do radical DPPH	39

4.2.3.2	Determinação da capacidade doadora de elétrons ao radical ABTS	40
4.2.3.3	Determinação do poder antioxidante baseado na capacidade de redução do ferro (FRAP)	41
4.2.3.4	Determinação da atividade antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema H ₂ O ₂ /luminol/HRP (<i>horseradish peroxidase</i>).....	41
4.2.4	Caracterização do OL	42
4.2.4.1	Índice de acidez	42
4.2.4.2	Índice de peróxido	42
4.2.4.3	Índice de saponificação	43
4.2.4.4	Densidade relativa.....	44
4.2.4.5	Estabilidade oxidativa.....	44
4.2.5	Desenvolvimento das NEs	45
4.2.5.1	Emulsificação por método de EPI utilizando aquecimento	45
4.2.5.2	Determinação do valor de EHL _{req} pelo OL	45
4.2.5.3	Determinação do sistema tensoativo	47
4.2.5.4	Obtenção das NEs	47
4.2.5.5	Incorporação do ECV	47
4.2.6	Caracterização Físico-Química das NEs.....	48
4.2.6.1	Avaliação macroscópica.....	48
4.2.6.2	Teste de centrifugação	48
4.2.6.3	Determinação do tamanho de partícula, IP e potencial zeta	48
4.2.6.4	Determinação do pH	49
4.2.6.5	Determinação da condutividade elétrica	49
4.2.6.6	Densidade relativa.....	49
4.2.6.7	Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	49
4.2.6.8	Determinação do comportamento reológico	49
4.2.7	Determinação de Conteúdo de Polifenóis Totais das NEs.....	50
4.2.8	Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Livre DPPH das NEs.....	50
4.2.9	Teste de Estabilidade Preliminar (Ciclo Gela-Degela)	51
4.2.10	Teste de Irritação Aguda na Pele	51

4.2.11	Avaliação da eficácia antioxidante <i>in vivo</i>	52
4.2.11.1	Animais experimentais	52
4.2.11.2	Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de estresse oxidativo pela radiação UVB	52
4.2.11.3	Protocolo experimental de avaliação do potencial terapêutico das NEs adicionadas de ECV em camundongos	53
4.2.11.4	Atividade da MPO	53
4.2.11.5	Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical ABTS	54
4.2.11.6	Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)	54
4.2.12	Análise Estatística.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Caracterização Química do ECV	55
5.2	Atividade Antioxidante do ECV	62
5.3	Caracterização do OL	68
5.4	Desenvolvimento das NEs	74
5.4.1	Determinação do valor de EHL_{req} para o OL	74
5.4.2	Determinação do sistema tensoativo	75
5.4.3	Obtenção e caracterização físico-química das NEs	77
5.5	Caracterização Físico-Química das NEs Aditivadas de ECV	80
5.6	Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais das NEs	89
5.7	Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Livre DPPH das NEs Aditivadas de ECV	90
5.8	Teste de Estabilidade Preliminar (Ciclo Gela-Degela)	92
5.9	Teste de Irritação Aguda da Pele	95
5.10	Avaliação da Eficácia Antioxidante <i>In Vivo</i>	96
6	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

1 INTRODUÇÃO

Produtos emulsionados são empregados na indústria cosmética e farmacêutica em função das vantagens que estes apresentam como a veiculação de insumos ativos de diferentes afinidades na mesma formulação e sua facilidade de aplicação em produtos de uso tópico (MASSON, 2005).

Dentre os veículos de uso tópico, encontram-se as NEs, que possuem ampla aplicabilidade, pois podem ser usadas como nanocarreadores de compostos bioativos lipofílicos, fármacos ou nutrientes. Entre as principais vantagens, tem-se a alta estabilidade cinética, melhora a biodisponibilidade de compostos ativos, aumenta a permeabilidade de substâncias com baixa solubilidade e apresenta baixa turbidez quando comparadas aos sistemas de emulsões convencionais (GOSH; MUKHERJEE; CHANDRASEKARAN, 2013).

O menor tamanho das gotículas nanométricas previne o sistema dos fenômenos de floculação e coalescência, além de torná-los visualmente transparentes e com baixa viscosidade (SADURNÍ et al., 2005). Esses sistemas apresentam uma série de vantagens, como redução dos efeitos colaterais e aumento da penetração na pele, além da capacidade de estabilizar alguns ativos, quando comparados às formulações convencionais (SCHWARZ; WEISSPAPIR; FRIEDMAN, 1995; OLIVEIRA et al., 2011). Estas características promovem às NEs um uso em aplicações variadas (SADURNÍ et al., 2005; DIAS et al., 2014). De maneira geral, a nanotecnologia aplicada possibilita a incorporação de um óleo de caráter untuoso em uma formulação hidrofílica mais aceitável (DIAS et al., 2014).

Uma característica importante da pele como órgão é que ela funciona como uma potente barreira ao meio externo, graças ao estrato córneo. A difusão através do ambiente lipídico desta camada tem sido relatada como a principal via de penetração para aplicação tópica de substâncias (LADEMANN et al., 2005; KNORR et al., 2009). Contudo, há evidências de que o folículo piloso pode atuar como uma rota e depósito, aumentando, assim, a penetração e a absorção de produtos aplicados topicamente (LEONARDI; CAMPOS, 1998; CAMPOS; GILLIAN, 1998; OTBERG et al., 2004; BLUME-PEYTAVI et al., 2010; MEIDAN, 2010).

Os óleos vegetais apresentam como característica baixo peso molecular e viscosidade, são menos oclusivos que os óleos minerais, apresentam boa penetração cutânea, boa compatibilidade com a pele, fonte de ácidos graxos

essenciais e vitaminas (CORTE, 2006). Em virtude destas características os óleos vegetais tornam-se bons candidatos à utilização em preparações cosméticas e dermofarmacêuticas, podendo agir inclusive como promotor de permeação (STORPIRTIS; GONÇALVES; CHIANN, 2009).

Apesar da pele possuir um sistema antioxidante endógeno complexo que atua na proteção contra danos oxidativos, a exposição excessiva à RUV leva à sobrecarga destes mecanismos antioxidantes, sendo considerada um dos principais fatores que levam ao envelhecimento cutâneo e ao aparecimento do câncer de pele (NICHOLS; KATIYAR, 2010; YOUNG; CLAVEAU; ROSSI, 2017). Além da utilização de filtros solares, o uso de formulações tópicas antioxidantes pode auxiliar na proteção contra a radiação solar e minimizar os efeitos deletérios da RUV (FONSECA et al., 2011). Os antioxidantes exógenos atuam inibindo a produção de radicais livres, interrompendo reações de auto-oxidação, protegendo e regulando as defesas antioxidantes celulares, neutralizando íons pró-oxidantes metálicos e/ou inibindo enzimas pró-oxidativas, podendo assim neutralizar o estresse oxidativo (SOTO; FALQUÉ; DOMÍNGUEZ, 2015).

Os ácidos graxos são os principais componentes das membranas celulares. A fluidez da membrana é altamente influenciada pela presença de ácidos graxos ômega 3 ou ômega 6, fato que pode afetar significativamente as funções celulares, uma vez que afeta a permeabilidade e secundariamente, o transporte de proteínas (FUKUI et al. 2013).

A *Linum usitatissimum* L. (linhaça) é o alimento de origem vegetal mais rico em ácidos graxos ômega 3, apresentando também quantidades elevadas de fibras, proteínas e compostos fenólicos (NOVELLO; POLLONIO, 2012). A presença destas substâncias no óleo extraído da linhaça confere algumas atividades farmacológicas como potencial anti-inflamatório e redução de tumores (FRANKEL, 1993; ANDRADE; RIBEIRO; CARMO, 2006; LU et al, 2020; KOUAMÉ, et al., 2021).

O OL, além de elevada quantidade de ômega 3, possui ômega 6, como também, ácidos graxos monoinsaturados (palmitoléico, oléico, gadoléico, erúico e nervônico) e saturados (cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, behênico) (EPAMINONDAS, 2009). A partir dos ácidos graxos há formação intracelular de mediadores anti-inflamatórios (ômega-3) ou pró-inflamatórios (ômega-6). Nesse sentido, o papel dos ácidos graxos ômega-3 como possível função anti-inflamatória

vem sendo investigado trazendo resultados significativos para a saúde (MELLO; PINHEIRO, 2012).

Um outro produto natural que tem sido estudado por apresentar funções farmacológicas promissoras é o café. Entre as espécies de café mais comercializadas no mundo, o *Coffea canephora* (*C. canephora*) é a principal matéria-prima da indústria de café solúvel. Comparativamente ao *Coffea arabica* (*C. arabica*), destaca-se em função do maior teor de sólidos e menor preço, e pelo maior teor de cafeína e ACGs (VIGNOLI et al., 2014; AFONSO et al., 2016). Estudos realizados com grãos de café verde demonstraram a presença de substâncias bioativas tais como antocianinas, ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides sendo a ação antioxidante a mais prevalente (SANTOS et al., 2007; VIEIRA, 2015; STELMACH; POHL; MADEJA, 2015).

Levando em consideração os aspectos mencionados, a proposta deste trabalho consiste em desenvolver e caracterizar uma NE contendo ECV, rico em compostos polifenólicos, utilizando o OL como fase oleosa, com vistas à aplicação cutânea contra danos oxidativos. A utilização de ambos, ECV e OL, permitiu combinar em uma única formulação os efeitos benéficos destes compostos na fotoquimioproteção. Em adição, as NEs já se mostraram sistemas eficientes para veiculação de extratos vegetais para uso tópico (MAHDI et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015, AFORNALI; LORENCINI, 2016; RAMBARAN, 2022; WILSON et al., 2022).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

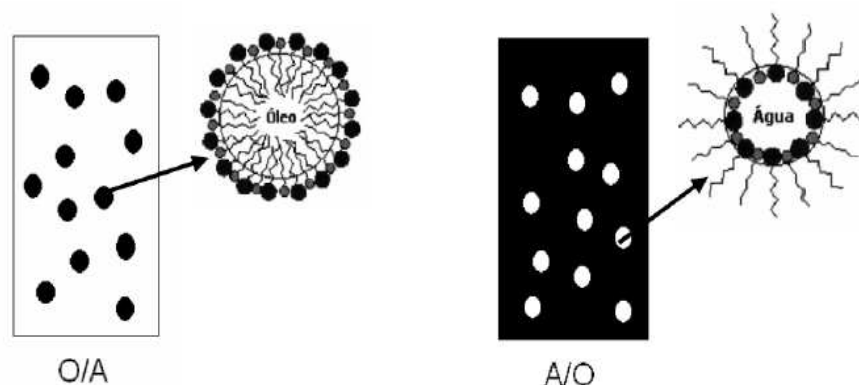
2.1 Emulsões

As formulações dermatológicas têm como principal desafio a penetração e liberação de seus insumos ativos na pele de forma eficaz para a realização do efeito desejado. As principais preparações de uso dermatológico são os sistemas emulsionados, devido as vantagens que oferecem sob o ponto de vista farmacêutico (SMITH; MALBACH; SURBER, 2000; AFORNALI; LORENCINI, 2016). Um dos veículos de grande utilização para fármacos e ativos cosméticos são as emulsões fluidas e semissólidas (MARUNO; ROCHA-FILHO, 2010; SELBACH, 2017).

Emulsões são sistemas heterogêneos, consistindo em pelo menos um líquido imiscível, intimamente disperso em outro na forma de glóbulos (BECHER, 2001; FERNANDEZ et al., 2004). Não se formam espontaneamente e suas propriedades dependem de condições termodinâmicas, modo de preparo, características de cada componente e da ordem de adição dos mesmos (SELBACH, 2017; ZHANG; McCLEMENTS, 2018). São compostas basicamente de três componentes: água, óleo e tensoativo, cujas propriedades físico-químicas influenciam significativamente no comportamento do sistema (SAJJADI; ZERFA; BROOKS, 2003). A estrutura das emulsões consiste em gotículas de fase dispersa (ou interna) envolvidas por uma fase contínua (fase externa). Podem ser classificadas como água em óleo (A/O), quando gotículas da fase aquosa estão dispersas em uma fase oleosa; ou óleo em água (O/A), quando as gotículas da fase oleosa estão dispersas na fase contínua aquosa (RIBEIRO et al., 2015; WILSON, et al., 2022) (Figura 1).

A emulsões do tipo O/A apresentam aspecto sensorial mais leve, conferindo toque seco (menos oleoso) e proporcionando menos oclusividade à pele, isso se deve ao fato de o meio dispersante ser aquoso. É o tipo de emulsão mais empregada devido à vantagem de formar um filme superficial na pele quando a água da formulação evapora. Já as emulsões A/O possuem efeito oclusivo, sendo mais utilizadas para limpeza da pele por meio de sujidades oleosas, já que as mesmas são solúveis em óleo e podem então serem removidas (COUTINHO; SANTOS, 2014).

Figura 1 - Representação esquemática dos glóbulos de emulsões O/A e A/O.



Fonte: Forgiarini et al. (2001).

A adição de agentes emulsionantes, também chamados de emulsificantes ou tensoativos, possuem papel fundamental na composição de uma emulsão. Apresentam como função a redução da tensão interfacial, além de evitar a coalescência das gotículas no sistema (BROOKS; RICHMOND; ZERFA, 1998; COUTINHO; SANTOS, 2014). Isso ocorre uma vez que são capazes de formar um filme interfacial com propriedades estéricas e eletrostáticas em torno dos glóbulos da fase interna, reduzindo assim, a tensão entre os líquidos. Este componente é utilizado com o intuito de promover a manutenção da estabilidade do sistema durante seu prazo de validade (JEONG; OH; KIM, 2001; CAPEK, 2004; MARUNO; ROCHA-FILHO, 2010). Os emulsionantes são divididos em quatro tipos: aniônicos, que formam íons carregados negativamente durante a emulsificação; catiônicos, que dissociam-se dando origem a íons positivos, responsáveis por suas propriedades emulsionantes; não iônicos, que apresentam um balanço entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula; e anfóteros, que apresentam grupamentos carregados positiva e negativamente, dependendo do pH do meio em que se encontram (MANIASSO, 2001). Podem ser utilizados separadamente ou combinados, aumentando a capacidade de promover estabilidade de acordo com a necessidade do sistema (KIM et al., 2019).

A escolha de um tensoativo ou sistema de tensoativos que resultem em emulsões estáveis, considerando-se o óleo ou mistura de óleos a serem utilizados, foi descrita por William Griffin (1949). No seu trabalho pioneiro, apresentado no *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, Griffin define que emulsificantes apresentam, em suas moléculas, grupos hidrofílicos e lipofílicos e que o equilíbrio do tamanho e da força desses grupos é chamado EHL – Equilíbrio Hidrófilo Lipófilo. O autor apresenta, ainda, relação de valores de EHL requerido (EHL_{req}) para alguns óleos e determina que, para uma mistura de tensoativos, o valor de EHL da mistura é obtido pela adição dos valores de EHL dos tensoativos individuais, multiplicada pela proporção de cada tensoativo utilizado (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; PASQUALI; TAUROZZI; BREGNI, 2008; PASQUALI; SACCO; BREGNI, 2009).

O valor de EHL_{req} é o valor que representa o tensoativo, ou mistura de tensoativos, capaz de produzir a melhor emulsão com o óleo, ou mistura de óleos, ou seja, uma emulsão sem sinais de instabilidade como floculação ou coalescência (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002; MORAIS et al., 2008).

É possível encontrar na literatura valores de EHL_{req} para alguns dos óleos mais utilizados, o que facilita a escolha do sistema tensoativo a ser usado no preparo de emulsões A/O ou O/A (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; ZANIN et al., 2002). No entanto, para óleos ou misturas de óleos que não foram determinados na literatura, é possível determinar empiricamente os valores de EHL por meio da preparação seriada de emulsões com diferentes concentrações de mistura de tensoativos, que representam diferentes valores de EHL. A estabilidade das emulsões deve ser verificada e a emulsão (ou emulsões) mais estáveis representa o valor de EHL_{req} para o óleo utilizado (SCHMIDTS et al., 2010).

2.2 Nanotecnologia e Nanoemulsões

O mercado global vem passando por períodos de grandes competições científicas e tecnológicas principalmente após o reconhecimento da nanociência e nanotecnologia como tendência chave do século XXI (BARIL et al., 2012). Sobretudo, o mercado de nanotecnologia foi estimado em cerca de US\$ 131 bilhões em 2026, crescendo em cerca de US\$ 58 bilhões em 2020 (AL-SAKKAF; ONAIZI, 2022).

O crescente interesse nas aplicações farmacêuticas e cosméticas da nanotecnologia levou ao desenvolvimento de NEs, que ganharam destaque por se tornarem uma alternativa relevante para administração e transporte de fármacos até o seu sítio ativo. Além da sua capacidade de proteger seu conteúdo quanto à degradação química ou enzimática, de controlar a liberação de fármacos e prolongar o tempo de residência dos ativos cosméticos ou fármacos no estrato córneo (BOULAIZ et al., 2011; FIGUEIRAS; COIMBRA; VEIGA, 2014; CAMBRUSSI et al., 2018).

As NEs são sistemas coloidais, cineticamente estáveis, caracterizadas por apresentarem tamanho de glóbulos na escala nanométrica, geralmente na faixa de 20 e 200 nm (BORRIN et al., 2016; ACEVEDO-FANI; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2017; CHORADIYA; PATIL, 2021; MALODE et al., 2022; SAMPAIO et al., 2022). Essa característica torna-se interessante para aplicação em produtos cosméticos de cuidado da pele e produtos para a saúde, devido as diversas vantagens que elas proporcionam, como (TADROS et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2005; PEREIRA et al., 2016; SAMPAIO et al., 2022):

- tamanho muito pequeno das partículas, associada ao movimento browniano, diminui a força da gravidade sob essas moléculas, evitando processo de instabilidade, como sedimentação e cremeação (TADROS et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004);
- utilizam baixa concentração de tensoativos, diminuindo a ocorrência de irritação da pele (TADROS et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004; IZQUIERDO et al., 2005; PEREIRA et al., 2016; SAMPAIO et al., 2022);
- garante uma aplicação tópica mais uniforme sobre a pele, devido ao pequeno tamanho dos glóbulos (TADROS et al., 2004; BOUCHEMAL et al., 2004);
- o pequeno tamanho dos glóbulos favorece a penetração dos ativos através de rugosidades da superfície da pele (TADROS et al., 2004);
- a fluidez natural do sistema confere as NEs características sensoriais e estéticas únicas, podem apresentar aparência translúcida e ser aplicada em forma de *spray* (TADROS et al., 2004; PEREIRA et al., 2016);
- podem ser empregadas como nanocarreadores de ativos lipofílicos (PEREIRA et al., 2016; SAMPAIO et al., 2022).

Os métodos de obtenção das NEs podem ser de alta ou baixa energia. Nos métodos de alta energia utilizam equipamentos capazes de produzir uma força mecânica intensa que supere a força interfacial entre dois líquidos imiscíveis e promover a formação de glóbulos em escala nanométrica. Quando a energia supera a tensão interfacial, os glóbulos são fragmentados em glóbulos menores, aumentando a quantidade de glóbulos por volume. Os métodos de alta energia consiste em utilizar equipamentos, como homogeneizadores de alta pressão, microfluidizadores ou ultrassom (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2016; CHUESIANG et al., 2018; SAMPAIO, et al. 2022).

Já nos métodos de baixa energia, a formação da NE depende menos da energia fornecida e mais das propriedades dos tensoativos utilizados e da

composição da formulação. As NEs são preparadas utilizando-se velocidades baixas de agitação, em comparação aos métodos de alta energia. Os métodos de baixa energia incluem a emulsificação espontânea e o método de inversão de fases (*Emulsion Phase Inversion* – EPI), que por sua vez se divide em inversão de fase por alteração de composição (*Phase Inversion Composition* – PIC) e a inversão de fase por variação de temperatura (*Phase Inversion Temperature* – PIT) (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2016). Estes processos apresentam diversas vantagens devido a utilização de equipamentos simples, baixo custo operacional e menor gasto de energia, sendo mais eficientes em termos energéticos. Além disso, como esses métodos não utilizam alta energia, evita-se a degradação de agentes ativos termolábeis durante o processo de encapsulamento (SAMPAIO et al., 2022).

O mecanismo de formação de glóbulos das emulsões baseia-se na propriedade dos tensoativos de formar um filme na interface entre a água e o óleo que se organiza como uma esfera tendo a parte hidrofílica voltada para a fase externa e a parte hidrofóbica voltada para a fase interna, em emulsões do tipo O/A, e o inverso ocorre para emulsões do tipo A/O. Essa esfera tem uma curvatura que é determinada pela natureza e pelo tamanho da molécula do(s) tensoativo(s) utilizado(s). Na concentração onde não há excesso de nenhuma das fases (aquosa ou oleosa), o tensoativo forma estruturas que se apresentam como um filme de surfactante de curvatura zero, que podem ser microemulsões bicontínuas ou cristais líquidos lamelares. Essas estruturas permitem a coexistência das fases aquosas e oleosas ao longo do filme interfacial formado pelo tensoativo (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA, et al., 2016).

O método PIC, para o preparo de um NE O/A, consiste na sucessiva adição da água à mistura de óleo e tensoativos, causando inicialmente a formação de gotículas de água na fase oleosa. A afinidade do tensoativo pela fase oleosa aumenta até a formação de uma microemulsão estável (A/O) ou de cristal líquido em fase lamelar. Com o progressivo aumento do volume de água, a curvatura do tensoativo se inverte, formando a NE. A partir desse ponto, o aumento do volume de água não altera o tamanho dos glóbulos (FERNANDEZ et al., 2004; YUKUYAMA et al., 2016).

O método PIT é baseado no uso de um tensoativo não iônico polietoxilado, que tem como característica a mudança de afinidade à água ou ao óleo, em função da temperatura, fixando-se o valor de EHL do sistema, de acordo com o óleo

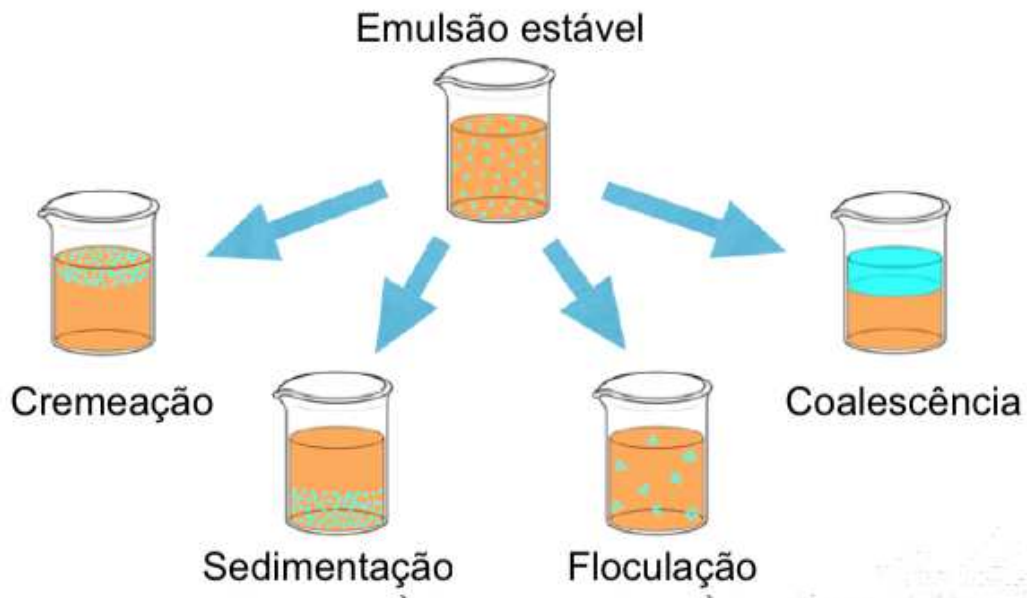
utilizado. Assim, em razão da hidratação da terminação polar do tensoativo, que se torna maior que a terminação apolar, a curvatura espontânea do tensoativo favorece a formação de emulsões O/A. Com o aumento da temperatura e a desidratação da terminação polar, a terminação apolar torna-se mais volumosa, favorecendo a formação de emulsões A/O. Na temperatura intermediária o tensoativo exibe afinidade similar à água e ao óleo, ocorrendo a formação de uma microemulsão estável (A/O) ou a formação de cristal líquido em fase lamelar. Com o resfriamento rápido da emulsão a curvatura do tensoativo se inverte, os glóbulos da microemulsão são rompidos e o tensoativo se organiza em glóbulos menores, formando a NE. É importante que a mudança da temperatura seja rápida para garantir a formação da NE, pois se o aquecimento ou resfriamento não forem suficientemente rápidos, ocorre coalescência e a formação de emulsões polidispersas (SOLANS; SOLÉ, 2012; YUKUYAMA et al., 2016).

As NEs são sistemas termodinamicamente instáveis, portanto estão sujeitos a processos de instabilidade dependendo das condições termodinâmicas submetidas, como composição, temperatura e pressão (CHIESA et al., 2008; WANG et al., 2008). O fenômeno de *Ostwald ripening* é o principal processo de instabilidade das NEs, trata-se da migração do conteúdo lipofílico de glóbulos menores para maiores através da fase externa hidrofílica da emulsão, gerando o “crescimento das gotículas”. Este fenômeno é resultante da diferença no potencial químico originado da variação dos raios de curvatura dos glóbulos (TAYLOR, 2003; TADROS et al., 2004; FRANZOL; REZENDE, 2015). Além disso, outros processos de instabilidade podem ocorrer, sendo os mais comuns (Figura 2):

- **Cremação ou sedimentação:** fenômenos causados pela ação da gravidade, onde os glóbulos tendem a separar-se da fase externa e emergirem (cremação), quando sua densidade é menor que da fase externa, ou submergirem (sedimentação), quando sua densidade é maior que da fase externa, causando a formação de duas porções distintas, com proporções diferentes de fase interna e externa (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; FRANZOL; REZENDE, 2015);

- **Floculação:** a ação das forças de Van der Waals, causa uma agregação dos glóbulos, com manutenção do filme interfacial e integridade individual dos glóbulos (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; FRANZOL; REZENDE, 2015);
- **Coalescência:** processo no qual os glóbulos se unem, com a ruptura do filme interfacial, fundindo-se para formar glóbulos maiores, levando à separação de fases (CORREA; KUREBAYASHI; ISAAC, 2012; FRANZOL; REZENDE, 2015).

Figura 2 - Representação dos fenômenos de instabilidade física de emulsões.



Fonte: Agostinho et al. (2017).

2.3 Óleo de Linhaça

Considerando que NEs são compostas por uma fase oleosa, o emprego de óleos vegetais em formulações de uso tópico torna-se de grande interesse, uma vez que óleos vegetais são conhecidos pelos efeitos benéficos à saúde. O seu uso tópico permite ao corpo absorver alguns dos ácidos graxos essenciais necessários para uma atividade celular saudável. Ele ainda pode amaciar e cicatrizar abrasões da pele, diminuir eritema e edema de lesões cutâneas, e promover a saúde e a

hidratação da pele, potencializando o efeito do produto (ARTECHE-GARCÍA, 1994; LORENCINI et al., 2014).

A linhaça é uma semente oleaginosa, proveniente da planta do linho (*Linum usitatissimum* L.), sendo pertencente à família das Lináceas originária da Ásia (KAITHWAS; MAJUMDAR, 2013). Seu óleo é rico em ácidos graxos poli-insaturados, sobretudo o ácido α -linolênico (ω -3) e ácido linoleico (ω -6). A presença desses constituintes torna a linhaça um alimento funcional, uma vez que promovem efeitos benéficos à saúde (VAISEY-GENSER; MORRIS, 2003).

O OL é considerado a maior fonte de ω -3 presente na natureza (RIEDIGER et al., 2008). Ele contém cerca de 53% de ácido α -linolênico (18:3 n-3) e 13% de ácido linoleico (18:2 n-6) (TZANG et al., 2009), são chamados de ácidos graxos essenciais já que não podem ser sintetizados pelo organismo humano e são indispensáveis para o funcionamento e crescimento normal de todos os tecidos, além de conferir ao óleo potencial atividade anti-inflamatória (RIGON et al., 2017). Em adição, contém aminoácidos essenciais (destacando-se metionina e cisteína), lignanas, fibras alimentares solúveis e insolúveis, goma, ácidos fenólicos, flavonoides, ácido fítico, vitaminas (B₁, B₂, C, E, caroteno) e minerais (ferro, zinco, potássio, magnésio, fósforo, cálcio), os quais também são responsáveis por promover benefícios à saúde, reforçando as propriedades funcionais da linhaça (MARQUES et al., 2011; KIDALCI et al., 2021).

O ácido α -linolênico é o principal ácido graxo da família do ω -3 e o ácido linoleico é o principal ácido graxo da família ω -6. O principal metabolismo do ácido α -linolênico é sua conversão para longas cadeias de ácidos graxos ω -3, como o ácido eicosapentaenoico e docosahexaenoico; e o principal metabolismo do ácido linoleico é a formação de ácido araquidônico (VAISEY-GENSER; MORRIS, 2003).

O OL está presente no Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira na forma de linimento óleo calcário, cuja indicação de uso é para os casos de dermatoses pruriginosas e queimaduras (BRASIL, 2012) e segundo a Medicina Tradicional Chinesa e a Medicina “Ayurveda”, este óleo possui indicações para o tratamento de feridas e como hidratante, antioxidante dérmico, entre outros (DATTA; MITRA; PATWARDHAN, 2011). As atribuições farmacológicas do OL são inferidas aos ácidos graxos mono e poli-insaturados nele presente, os quais atuam como poderoso mediador pró-inflamatório estimulando a produção de fatores de

crescimento, a fibroplasia e a neovascularização, e como anti-inflamatório (MARQUES et al., 2004; HATANAKA; CURI, 2007).

O óleo extraído da semente de linhaça, é obtido por compressão a frio, sendo realizado desta forma para que os componentes sejam mantidos estáveis, uma vez que o óleo é extremamente sensível às altas temperaturas, já que possui insaturações nas cadeias carbônicas de seus ácidos graxos torna-o altamente sensível aos processos oxidativos (CHOO; BIRCH; DUFOUR, 2007; OTRANTO; NASCIMENTO; MONTE-ALTO-COSTA, 2010). Além disso, a prensagem a frio é um método rápido, fácil e de baixo custo, nos óleos retêm elevados níveis de fitoquímicos bioativos, especialmente antioxidantes, podendo agregar maior valor nutricional aos alimentos processados (ANANTH et al., 2019).

Apesar de conferirem benefícios à saúde, estes mesmos ácidos graxos poli-insaturados tornam o OL instável susceptível a degradação lipídica, gerando compostos indesejáveis. Dessa forma, o efeito protetor da encapsulação do OL já vem sendo estudo por vários autores. Rigon et al. (2017) desenvolveram e caracterizaram sistemas nanoestruturados contendo OL. Foram preparadas nanocápsulas e NEs, variando a concentração de óleo e polímeros. As formulações desenvolvidas, foram consideradas adequadas para o encapsulamento do OL, sendo carreadores promissores para outras substâncias ativas, protegendo o óleo. Em estudo realizado por Baboota et al. (2012), foi preparada e caracterizada uma formulação de microemulsão com OL, no qual foi convertida em hidrogel e analisada quanto a penetração do OL na pele para possível tratamento de psoríase. Carneiro et al. (2013), analisaram o potencial da combinação da maltodextrina com diferentes materiais de parede na microencapsulação do OL por *spray dryer*, a fim de maximizar a eficiência do encapsulamento e minimizar a oxidação lipídica.

2.4 A Pele

O desenvolvimento da indústria cosmética e farmacêutica baseia-se no conhecimento das funções e estrutura da pele (ALVES, 2015). A pele é o maior órgão do corpo humano, compreendendo cerca de 16% da massa corporal, e está constantemente exposta às condições ambientais. Apresenta estrutura complexa composta por diversos tecidos e tipos celulares, exercendo funções múltiplas, como termorregulação, vigilância imunológica, sensibilidade e proteção contra agressões

exógenas, como microorganismos patógenos, substâncias químicas e RUV (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; FONSECA et al., 2010; KHAVKIN; ELLIS, 2011).

A pele é composta basicamente por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 3). A epiderme é a camada mais externa, constituída por um epitélio escamoso estratificado que sofre constante renovação. As camadas que compõe a epiderme são: estrato basal ou germinativo, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato cóneo. As principais células presentes na epiderme são os queratinócitos que representam aproximadamente 95% da sua composição (FONSECA et al., 2010; KHAVKIN; ELLIS, 2011). Ademais, outros tipos celulares podem ser encontradas na epiderme como os melanócitos, células de Langerhans e de Merkel, que desempenham funções importantes (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DAMIANI; ULLRICH, 2016).

Os queratinócitos criam uma barreira física de proteção da pele, além de acumularem pigmentos de melanina, sintetizada pelos melanócitos, que são eficazes no bloqueio da penetração da RUV na pele. A melanina também atua na homeostase epidérmica, eliminação de radicais livres e até mesmo uma possível atividade antimicrobiana (D'ORAZIO et al., 2013). Por fim, as células de Langerhans possuem como função a captação e processamento de antígenos e as células de Merkel são sensoriais, atuando como mecanorreceptores (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013; DAMIANI; ULLRICH, 2016).

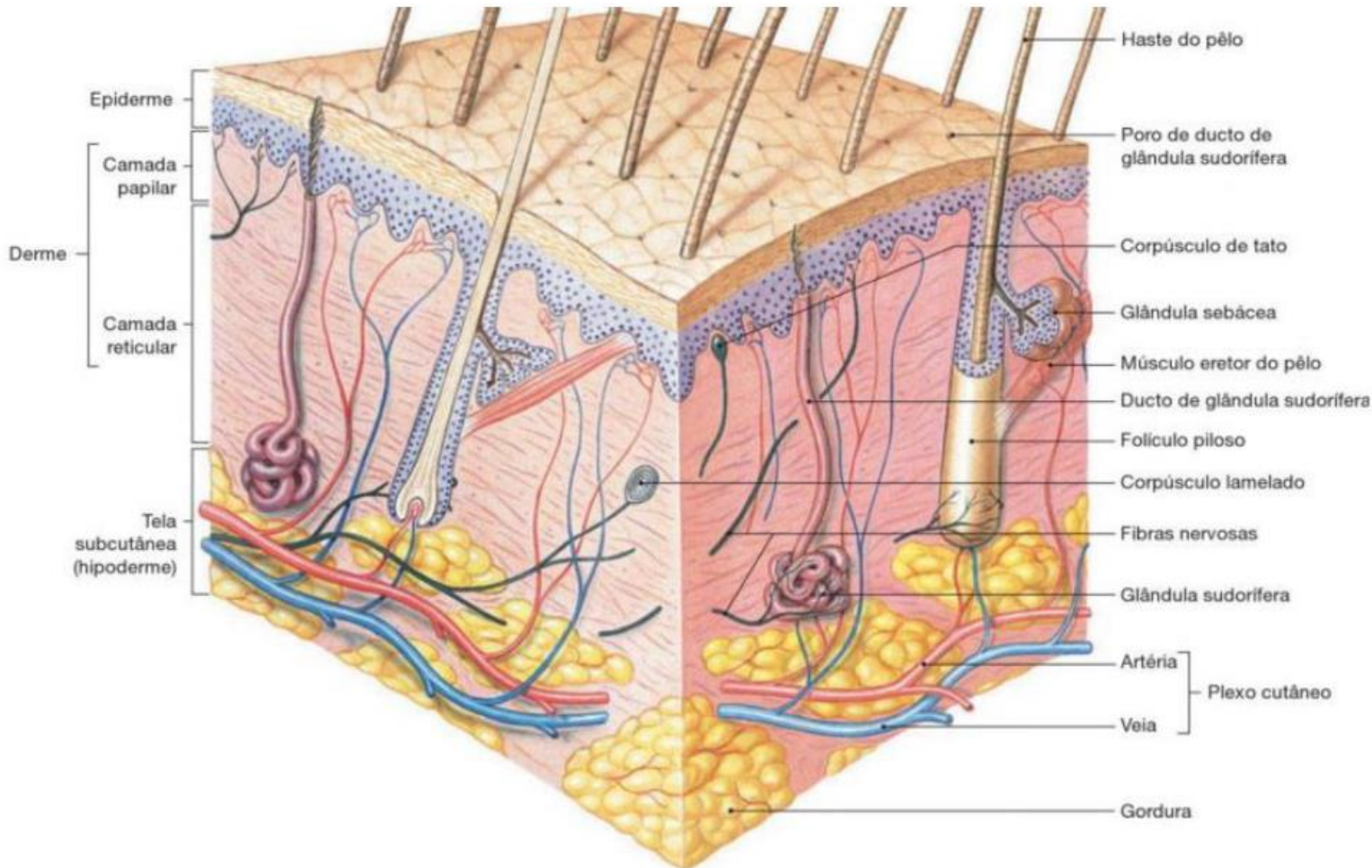
A derme, por sua vez, fica localizada abaixo da epiderme oferecendo suporte mecânico, nutrição e oxigenação a mesma. É composta por tecido conjuntivo contendo colágeno, vasos sanguíneos e linfáticos, e terminações nervosas, além de anexos provenientes da epiderme como os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas e sebáceas. Células como fibroblastos estão presentes na derme e são responsáveis pela síntese de componentes da matriz extracelular como o colágeno, e que juntamente com os mastócitos e queratinócitos epidérmicos, exercem função imunológica (FRIEDMANN et al., 1993; GELSE; PÖSCHL; AIGNER, 2003; HEATH; CARBONE, 2013; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Por fim, a hipoderme, camada mais profunda da pele, é composta de células adipócitas, sendo responsável pelo isolamento e proteção do corpo contra lesões mecânicas, como também de reserva energética (KHAVKIN; ELLIS, 2011).

Diante disso, sabe-se que a pele é um órgão altamente metabólico e complexo, funcionando como uma interface entre o meio externo e o nosso

organismo, sendo frequentemente exposta a fatores que ameaçam a sua integridade e função (ANANTHASWAMY; PIERCEALL, 1990).

Figura 3 - Representação esquemática da pele e seus elementos.



Fonte: Martini; Timmons; Tallistch (2009).

Ao longo dos anos, a mudança no estilo de vida da população, o aumento da expectativa de vida e o esgotamento da camada de ozônio acarretaram no aumento significativo da quantidade de RUV e, conseqüentemente, uma ampliação no número de casos de doenças relacionadas à pele. Por isso, existe a necessidade de compreender os mecanismos de doenças induzidas pela RUV e buscar novas alternativas terapêuticas que revertam/previnam os danos cutâneos causados nesse processo (BOWDEN, 2004; AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

Em adição, para os autores Amiralian e Fernandes (2018), hidratação adequada e a proteção contra agressões do ambiente, principalmente causados

pelos raios UV, são pontos críticos para a manutenção de uma pele saudável. A biodiversidade apresenta-se como imensurável fonte de matéria prima e os óleos vegetais são um grande exemplo, por apresentarem compatibilidade, conferir emoliência e oclusividade à pele.

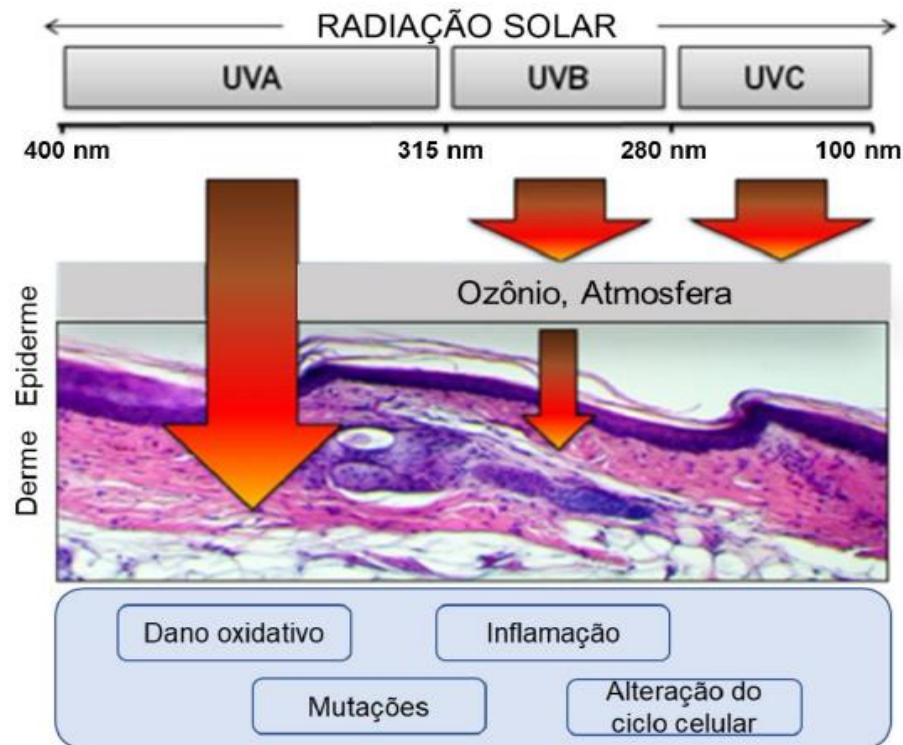
2.5 Radiação Ultravioleta e suas Consequências na Pele

A RUV é responsável por 90% das modificações que ocorrem na pele, sendo considerada o principal fator de risco (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004). Sua exposição aguda ao raios UV acarreta em uma série de efeitos adversos, como edema, queimaduras solares, eritema, inflamação e imunossupressão, além disso, a exposição crônica pode levar ao envelhecimento precoce e ao desenvolvimento do câncer de pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; FONSECA et al., 2010; MARTINEZ et al., 2015; TEWARI et al., 2013).

A luz solar é composta por três espectros eletromagnéticos, entre elas a RUV, que em baixas quantidades, pode agir positivamente pela síntese de vitamina D e liberação de endorfina (JUZENIENE; MOAN, 2012). No entanto, a exposição excessiva a RUV pode desencadear efeitos deletérios provenientes da intensa reação inflamatória e do aumento de radicais livres (CASAGRANDE et al., 2006; MARTINEZ, et al., 2018; SAITO et al., 2018).

A RUV abrange três faixas, de acordo com seu comprimento de onda. A primeira região é a UVC (280-100 nm), sendo a mais energética e prejudicial, contudo seu efeito é bloqueado pela camada de ozônio da Terra. As outras faixas correspondem à UVB (315-280 nm) e UVA (400-315 nm), que conseguem atravessar a atmosfera e são responsáveis por causar distúrbios na pele, incluindo o câncer de pele (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; D'ORAZIO et al., 2013; SCHUCH et al., 2017) (Figura 4).

Figura 4 - Espectro da radiação ultravioleta.



Fonte: D'Orazio et al. (2013). (Adaptado)

Ao entrar em contato com a pele, a RUV é absorvida por estruturas chamadas de cromóforos, que convertem essa energia eletromagnética em energia química. Os cromóforos são estruturas com dupla ou tripla ligações entre carbonos e são considerados a primeira linha de defesa contra a RUV, são eles: DNA, melanina, ácido urânico, RNA, proteínas, entre outros. Esses cromóforos atingem um estado de maior energia (excitado) e quando voltam para seu estado de origem, liberam energia e é nessa fase que pode ocorrer mudanças químicas em suas estruturas, reagindo com outras moléculas e gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (MADDODI; JAYANTHY; SETALURI, 2012; GIBBS; NORVAL, 2013; BRAND et al., 2018).

Apesar da RUV ser predominantemente composto de UVA (90-95%), o espectro de radiação UVA é responsável somente por cerca de 10% da dose carcinogênica da luz solar e provoca danos oxidativos em camadas mais profundas, principalmente na derme (MATSUMURA; ANANTHASWAMY, 2004; AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; KAPPES et al., 2006; BREM; GUVEN; KARRAN, 2017).

Já o espectro da RUVB é considerado o mais prejudicial e lesivo da RUV para pele humana (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005; HUPEL; POUPART; AR GALL,

2011; FIGUEIREDO et al., 2014). A RUVB tem como principal consequência os danos diretos no DNA, além dos danos indiretos ocasionados pela produção de EROs e resposta inflamatória, sendo mais relevante para a fotocarcinogênese (IVAN et al., 2014; MARTINEZ et al., 2018; SAITO et al., 2018). Os danos diretos são causados, pois ao absorver a RUVB, o DNA, principalmente dos queratinócitos, pode sofrer mutações que, posteriormente, podem acarretar transformações malignas nas células que culminam no tumor de pele. Além disso, a exposição à RUV ativa componentes do sistema imunológico cutâneo, gerando resposta inflamatória por diferentes mecanismos, tais como: ativação direta de queratinócitos na epiderme e outras células que liberam mediadores inflamatórios (BOWDEN, 2004; HILDESHEIM; AWWAD; FORNACE, 2004; CADET et al., 2009; MAVERAKIS et al., 2010; BALOGH et al., 2011).

O câncer de pele é a neoplasia mais frequente no Brasil, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Dentre os tumores de pele, o tipo não-melanoma é o de maior incidência no Brasil. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima, para cada ano do triênio 2020/2022, cerca de 176.930 novos casos de câncer de pele, sendo 83.770 em homens e 93.160 em mulheres. Sua ocorrência se deve principalmente a exposição excessiva à RUV, e apesar de causar baixa mortalidade, a sua alta incidência pode justificar o número de óbitos. Além disso, o câncer de pele não melanoma pode apresentar chances elevadas de cura com o diagnóstico precoce. No entanto, se o tratamento não ocorrer adequadamente, as lesões podem aumentar de tamanho e resultar em mutilações bastante expressivas, trazendo um grande impacto psicológico aos pacientes (INCA, 2019).

Frente aos efeitos deletérios da RUV, defesas profiláticas e terapêuticas incluem o uso de fotoprotetores que podem ser compostos de vários filtros UV. Os filtros são moléculas ou complexos moleculares que absorvem, refletem ou dispersam a RUV e dentre eles, encontram-se os filtros inorgânicos (bloqueadores físicos) e os filtros orgânicos (absorvedores químicos) (BALOGH et al., 2011), que são testados de acordo com o nível de proteção contra queimadura ou eritema (RUSSO; HALLIDAY, 2006).

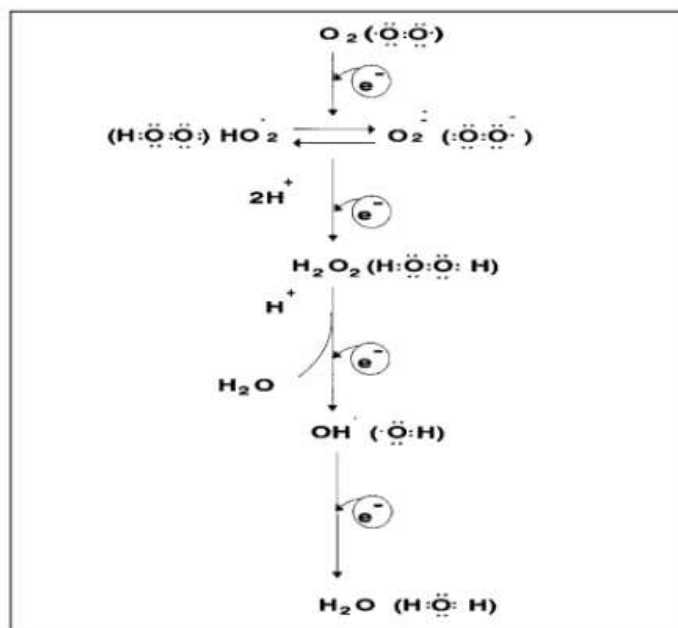
Contudo, há estudos que mencionam a preocupação de que moléculas de protetores solares na pele são, no mínimo, incompletos na fotoproteção contra EROs e podem até fotogerar estas espécies reativas altamente destrutivas. Também há

relatos que existem filtros orgânicos que possam ser responsáveis por efeitos hormonais, ocasionar absorção percutânea, dermatite de contato e fotocontato, além de já terem sido detectados na urina humana e no leite materno (HU et al., 1995; HAYDEN; ROBERTS; BENSON, 1997; INBARAJ; BILSKI; CHIGNELL, 2002; WALTERS; ROBERTS, 2002; HANSON; CLEGG, 2002; HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006; GONZALEZ et al.; 2006).

2.6 Radicais Livres E Estresse Oxidativo

Os radicais livres são definidos como toda espécie que possui um ou mais elétrons desemparelhados (SUN, 1990). Na natureza o principal componente gerador de radicais livres é o oxigênio no estado fundamental (O_2). As espécies radicalares geradas a partir do oxigênio são denominadas EROs que inclui também espécies que não possuem elétrons desemparelhados, mas que são muito reativos em decorrência de sua instabilidade, como o peróxido de hidrogênio (RIBEIRO et al., 2005). Durante a redução do oxigênio à água no processo respiratório, radicais intermediários podem ser formados, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila (OH^{\cdot}) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; RAY; HUANG; TSUJI, 2013; GRZESIK et al., 2018) (Figura 5).

Figura 5 - Representação esquemática da redução do oxigênio molecular à água, e geração de EROs.



Fonte: Ferreira; Matsubara (1997).

O H_2O_2 , apesar de não ser um radical livre, pode ser bastante prejudicial, pois participa da reação que sintetiza o radical hidroxila, considerado o mais tóxico das EROs. Este, por sua vez, na presença de metais pode levar à mutação no DNA e inativação de proteínas e lipídios. Já o $\text{O}_2^{\cdot-}$ é um radical que é formado na primeira redução do O_2 , e sofre ação da enzima superóxido dismutase, produzindo O_2 e H_2O_2 (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A geração de EROs é uma condição fisiológica associada à vida aeróbica. Em condições de homeostase, a concentração das EROs dentro das células é extremamente baixa, pois o organismo apresenta mecanismos endógenos para manter a concentração destas espécies reativas dentro dos limites fisiológicos (RIBEIRO et al., 2005). No entanto, a exposição da pele à RUVB leva a uma produção excessiva de EROs (IVAN et al., 2014), conseqüentemente a pele responde espontaneamente ao aumento destes níveis, porém esta resposta pode não ser suficiente para evitar danos celulares (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005).

No organismo, os principais meios de defesa antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos. No sistema enzimático incluem-se as enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase e a catalase. Já no sistema não enzimático podemos citar a glutathione reduzida, o alfa-tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico, o β -caroteno e o ácido úrico (POLETTA; SIMONIELLO; MUDRY, 2016).

A diminuição dos antioxidantes endógenos e/ou o aumento da geração de espécies oxidantes leva ao estresse oxidativo. Esse desequilíbrio entre a geração e a remoção dos radicais livres no organismo leva a um estado pró-oxidante que pode provocar lesões celulares, inclusive em morte celular (ROVER JR et al., 2001).

Quantidades excessivas de EROs podem ter efeitos deletérios em muitas moléculas, incluindo proteínas, lipídios, RNA e DNA, uma vez que são altamente reativas (LU et al., 2010), além disso o estresse oxidativo é responsável por uma variedade de doenças relacionadas a inflamação e ao estímulo oxidativo, como envelhecimento precoce e câncer de pele (IVAN et al., 2014; CAMBRUSSI et al., 2018).

As enzimas antioxidantes atuam cooperativamente e uma mudança em qualquer uma delas pode afetar o estado de equilíbrio e conduzir ao estresse oxidativo (KATIYAR; MEERAN, 2007). A exposição à RUVB induz o estresse

oxidativo pelo excesso de formação de radicais livres que, conseqüentemente, levam a depleção de antioxidantes endógenos, como glutathione reduzida e superóxido dismutase (HALLIWELL, 2009; ZAID et al., 2007).

Assim, uma abordagem para reduzir o estresse oxidativo induzido por RUV e, em última análise, reduzir a ocorrência de câncer de pele é através da “fotoquimioproteção”. Os agentes fotoquimioprotetores são capazes de melhorar os efeitos adversos da RUV na pele, e antioxidantes botânicos são promissores agentes fotoquimioprotetores (AFAQ et al., 2007; NICHOLS; KATIYAR, 2010; SOUZA et al., 2018). Além disso, muitos países possuem rica biodiversidade, o que estimula o uso de extratos vegetais e seus componentes químicos para fins terapêuticos propostos (CUELHO et al., 2018).

Nesse contexto, a suplementação antioxidante exógena tem sido a alternativa terapêutica mais explorada na proteção cutânea contra o estresse oxidativo. O uso de antioxidantes orais ou tópicos podem reforçar a ação de moléculas endógenas na proteção cutânea contra lesões induzidas pelas EROs (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; RAMOS-E-SILVA et al, 2013; LORENCINI et al, 2014).

Diante disso, diversos estudos têm buscado novos insumos ativos e formulações que sejam capazes de prevenir os efeitos deletérios da RUV, como o câncer de pele e o envelhecimento precoce (DINKOVA-KOSTOVA et al., 2006; RAMOS-E-SILVA, 2013; FIGUEIREDO et al., 2014; ALVES et al., 2016; SOUZA et al., 2018; MELO et al., 2021; RAPHAELLI et al., 2021).

2.7 Extrato De Café Verde

O meio científico tem demonstrado grande interesse nas propriedades biológicas de plantas, uma vez que foram comprovadas como antifúngicas, antibacteriana, antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, anticâncer, entre outras (WANG et al., 2012; BONIFÁCIO et al., 2014; KILDACI et al., 2021).

Os vegetais são conhecidos por serem fontes de água, carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais, micronutrientes essenciais, fibras dietéticas e óleos comestíveis, além de fornecerem também compostos biologicamente ativos conhecidos como metabólitos secundários. Estes metabólitos são reconhecidos como importantes fontes de uma grande variedade de fitoquímicos que

proporcionam benefícios à saúde e são utilizados no tratamento de doenças (KIM; PARK; LIM, 2010; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011).

Por isso, há um crescente interesse na identificação de compostos antioxidantes que são farmacologicamente ativos e apresentam baixos efeitos colaterais, para serem usados na medicina preventiva. As plantas são capazes de produzir grande quantidade de antioxidantes que previnem o estresse oxidativo ocasionados pelos radicais livres, eles representam uma fonte em potencial de novos compostos com atividade antioxidante (REDDY et al. 2012).

Os produtos fitoterápicos têm sido utilizados terapêuticamente há muito tempo em todo o mundo, principalmente no tratamento de doenças de pele, devido aos efeitos colaterais dos medicamentos químicos existentes (KILDACI et al., 2021). Com isso, a utilização de produtos à base de extratos vegetais está associada a uma diminuição nos riscos de efeitos patológicos ao organismo (AROKIYARAJ et al., 2014). Nesse sentido, a busca por antioxidantes naturais tem motivado muitos pesquisadores a estudar o café (NICOLI et al., 1997; BREZOVÁ; SLEBODOVÁ; STASKO, 2009; RAMALAKSHMI et al., 2009; PAUR; BALSTAD; BLOMHOFF, 2010; JEONG et al., 2013; FERK et al., 2014), uma matéria-prima de fácil acesso e abundante no Brasil.

Em 2020 o Brasil alcançou recorde de exportações de café, com mais de 45,6 milhões de sacas de 60 Kg exportadas para mais de 115 países, segundo dados do Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. O país exporta tanto *C. arabica* quanto *C. canephora* sob as formas de grãos crus, torrados, solúvel e na forma de extratos ou essências. Porém, cerca de 88% do café que é exportado é na forma de grãos crus (GOVERNO DO BRASIL, 2021).

Os produtos do café são atrativos por possuírem aroma e sabor agradável e, ainda, por apresentarem atividade antioxidante e anticancerígena. A capacidade antioxidante do café se deve pela presença de compostos bioativos no produto, como cafeína e ACGs (AFONSO et al., 2016; VIGNOLI et al., 2016; JUNG et al., 2017). Entre as espécies de café mais comercializadas no mundo, o *C. canephora* é a principal matéria-prima da indústria de café solúvel. Comparativamente ao *C. arabica*, destaca-se em função do maior teor de sólidos e menor preço, e pelo maior teor de cafeína e ACGs (VIGNOLI et al., 2014). Diversos estudos realizados com grãos de café verde demonstraram a presença de substâncias bioativas tais como antocianinas, compostos fenólicos, flavonoides e carotenoides (LUDWIG et al., 2012;

COELHO et al., 2014), sendo a ação antioxidante a mais prevalente (CHO et al., 2009; GÓMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007). Diversos estudos observaram redução progressiva da atividade antioxidante com o aumento do grau de torração do café. Estes resultados podem estar relacionados à perda de compostos fenólicos durante o processo de torrefação mediante degradação térmica progressiva (PERRONE et al., 2010; VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2011; PRIFTIS et al., 2015; CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016; CHOMA, 2019).

Foi observado que o café verde contém uma grande variedade de compostos fenólicos a exemplo dos ACGs, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido p-cumárico. Os ACGs e compostos relacionados são os principais componentes da fração fenólica dos grãos de café verde, alcançando teores de até 14% em peso seco (FARAH; DONANGELO, 2006), enquanto o conteúdo no café torrado pode atingir apenas 7% da composição (TRUGO; MACRAE, 1984a). Assim, produzindo-se um extrato a partir de café verde, seria possível obter maior concentração de bioativos como cafeína e ACGs e, conseqüentemente, maior atividade antioxidante (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016).

Além dos compostos fenólicos, outros metabólitos de importância tecnológica e biológica presentes no café são a cafeína, alcaloide pertencente ao grupo das xantinas com atividades farmacológicas reconhecidas (MONTEIRO; TRUGO, 2005), tais como, antimutagênicas, anticancerígenas, antioxidantes e anti-inflamatórias (GAWLIK-DZIKI et al., 2014). Em adição, a cafeína apresenta vantagens promissoras para a sua aplicação em cosméticos devido a sua baixa toxicidade e por apresentar uma boa permeação cutânea (ROSADO et al., 2019).

Estudos têm mostrado os efeitos anticarcinogênicos dos ACGs no intestino grosso e fígado, além de exercer ação protetora e antioxidante (DAGLIA et al., 2000), promover alterações na circulação sanguínea e inibir a oxidação de LDL *in vitro*, protegendo assim o organismo contra doenças cardiovasculares (OLTHOF; HOLLMAN; KATAN, 2001). A fração não absorvida, no cólon, inibe a formação de compostos mutagênicos N-nitrosos (nitrosaminas) exercendo assim efeito anticancerígeno (MORI et al., 2000).

Li et al. (2008) encontraram relação entre o 5-ACQ e a proteção neuronal contra apoptose por estresse oxidativo induzido pela exposição de células PC12, oriundas da linhagem clonal de feocromocitoma que exibem características de neurônio, ao metilmercúrio (MeHg). Os autores atribuíram o efeito neuroprotetor ao

5-ACQ devido ao seu papel na capacidade desativadora de EROs, decréscimo na atividade de glutathione peroxidase e no conteúdo de glutathione reduzida bem como pela atenuação da ativação da caspase-3 que desempenha um papel central na fase de execução da apoptose celular.

Estudos epidemiológicos têm mostrado a correlação entre o consumo do café e os efeitos neuroprotetores e de prevenção de doenças neurodegenerativas como Parkinson pela capacidade antioxidante desempenhada pelos seus constituintes (CHU et al., 2011). Em estudo realizado por Daglia et al. (2004), culturas de células de neuroblastoma humano (IMR 32) foram expostas a soluções contendo café verde e todas apresentaram capacidade antioxidante promovendo maior sobrevivência das células em meio oxidante, sendo que as frações mais ativas apresentaram uma dose-resposta linear em relação a concentração de 5-ACQ.

Wang et al. (2018) determinaram, tanto *in vitro* quanto em cultura celular, a atividade antirradicalar específica, contra a hidroxila radical, dos componentes solúveis presentes nos grãos de café verde e erva mate e observaram atividade antioxidante destes extratos, como também dos principais compostos fenólicos e seus metabólicos.

Recentemente, um estudo avaliou a atividade anti-inflamatória tópica (edema de pata induzido por carragenina) de uma pomada preparada com extrato metanólico de grãos verde de *C. robusta* via histologia. Os resultados mostraram que o tratamento com a pomada reduziu o edema de pata em 3 e 5 h após a administração da carragenina. As avaliações imuno-histoquímicas deram suporte adicional à análise morfológica. Em adição, verificaram que o extrato demonstrou possuir elevada capacidade de sequestro de radicais livres pelo ensaio de DPPH, o que pode ter contribuído para a atividade anti-inflamatória observada (PERGOLIZZI et al., 2018). Affonso et al. (2016), verificaram que o uso tópico de hidrogel com extrato aquoso de torta residual de grãos de café melhorou a cicatrização de feridas cutâneas em modelo animal.

Um estudo recente foi conduzido com intuito de desenvolver um gel contendo lipossomas carregados de extrato de grão de café verde para possível utilização como formulação cosmética antioxidante para efeitos antienvhecimento (DESAI; MALLYA, 2021).

Portanto, considerando a importância econômica do café no Brasil, a atual preocupação dos consumidores com a busca por novas alternativas terapêuticas e

mediante os dados sobre o potencial terapêutico do café, torna-se interessante o uso de ECV para o desenvolvimento de um produto com vistas a aplicação tópica antioxidante.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi obter, caracterizar e avaliar NEs preparadas com OL como fase oleosa, aditivada de ECV para serem empregadas como alternativa terapêutica inovadoras para o tratamento tópico contra danos oxidativos causado pela RUVB.

3.1.1 Objetivos Específicos

- Caracterizar quimicamente o ECV;
- Avaliar a atividade antioxidante do ECV por diferentes métodos *in vitro*;
- Caracterizar o OL quanto os parâmetros físico-químicos e sua estabilidade oxidativa por Rancimat;
- Desenvolver uma NE estável pelo método de inversão de fases aditivada de diferentes concentrações de ECV;
- Caracterizar as NEs quanto análise macroscópica, centrifugação, pH, tamanho e distribuição de gotículas, IP, condutividade elétrica e análise morfológica por MET;
- Realizar o ensaio para conteúdo de polifenóis totais nas NEs aditivadas de ECV;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das NEs aditivadas de ECV;
- Realizar estudos preliminares de estabilidade das NEs obtidas (características físico-químicas e atividade sequestradora do radical DPPH);
- Avaliar o potencial irritante tópica aguda das NEs;
- Avaliar a atividade antioxidante *in vivo* das NEs contra danos oxidativos induzidos por RUVB.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Ativo

Extrato de café verde

INCI: *Coffea Canephora Seed Extract* – Fornecedor: Companhia Iguaçu de Café Solúvel (Cornélio Procópio, Paraná, Brasil).

Nome científico: *Coffea robusta*.

Características: Pó fino, de coloração marrom esverdeado, com odor característico.

4.1.2 Fase Oleosa

Óleo de Linhaça Dourada

INCI: *Linum usitatissimum* (Linseed) oil – Marca: Pazze.

Característica: Líquido oleoso, límpido, de coloração amarelada, com odor característico.

Descrição: Óleo vegetal prensado à frio, engarrafado e lacrado.

4.1.3 Fase Aquosa

Água Milli-Q recém coletada.

4.1.4 Tensoativos

Hidrofilicos:

Monooleato de polioxietileno (20) sorbitano, polissorbato 80 – valor de EHL: 15,0.

INCI: Polysorbate 80.

Nome comercial: Tween[®] 80.

Óleo de Rícino hidrogenado 40 OE – valor de EHL: 13,0.

INCI: PEG-40 Hydrogenated Castor Oil.

Nome comercial: Chremophor[®] RH 40.

Lipofílico:

Monooleato de sorbitano – valor de EHL: 4,3.

INCI: Sorbitan Monooleate.

Nome comercial: Span® 80.

Olivato de cetearilo, Olivato de sorbitano – valor de EHL: 9,0.

INCI: Cetearyl Oliviate, Sorbitan Oliviate.

Nome comercial: Olivem® 1000.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do ECV

O extrato liofilizado de café verde (ECV) foi elaborado e cedido pela Companhia Iguazu de Café Solúvel (Cornélio Procópio, Paraná, Brasil) utilizando café da espécie *C. canephora*. O processamento foi realizado em planta piloto seguindo procedimento convencional de extração de café solúvel por percolação em colunas, utilizando água como solvente de extração. Neste processo, água à 180°C foi alimentada no primeiro estágio de percolação (coluna com o café mais antigo) e na sequência percolando os estágios seguintes, até atingir o café mais novo. No último estágio, o extrato encontra o café recém carregado, do qual extrai parte dos sólidos solúveis. Durante o processo, os sólidos solúveis do extrato aumentam, mas a temperatura diminui, então a última coluna contendo café fresco é extraída a uma temperatura próxima à 100°C, estando o produto sujeito a danos térmicos mínimos. O extrato originado deste processo foi submetido ao processo de liofilização, e armazenado em recipientes plásticos vedados e mantido sob refrigeração.

4.2.2 Caracterização Química do ECV

4.2.2.1 Identificação e quantificação de bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O teor de ácidos clorogênicos (5-ACQ) e cafeína foi determinado por CLAE (Ultimate 3000, Thermo Scientific, Germering, Alemanha) conforme metodologia

descrita por Corso, Vignoli e Benassi (2016). O sistema é equipado com um injetor automático de amostras e detecção por arranjo de diodos, acoplado ao espectrofotômetro UV-Vis (Libra S22, Biochrom, Cambridge, Inglaterra) e controlado por *software Chromeleon 7.0*. Foi empregado coluna C₁₈ Spherisorb ODS-1 (150 x 4,6 mm, 3 µm) e os compostos foram eluídos com solução de ácido acético 5% (A) e acetonitrila (B) a uma taxa de fluxo de 0,6 mL/min usando o seguinte gradiente: 0 - 1 min 5% (B); 1 - 6 min 13% (B). A detecção foi realizada à 272 nm para cafeína e 320 nm para os ACGs. A identificação foi feita com base nos tempos de retenção e espectro no UV.

A quantificação foi realizada por padronização externa, no qual foram construídas curvas analíticas na faixa de 3,0 a 20,0 µg/mL para cafeína (R=0,9989, p<0,001) e 0,5 a 30,0 µg/mL para 5-ACQ (R=0,9997, p<0,001), sendo este utilizado como padrão para quantificação do teor de ACGs totais por meio da soma das áreas dos compostos detectados. Os resultados foram expressos em g de composto por 100 g de ECV em base seca.

Para a análise, o ECV foi diluído em solução de ácido acético 5% (0,1 mg/mL), e as amostras foram filtradas em membrana de poro 0,22 µm (Millipore, São Paulo, Brasil). Os solventes empregados na análise eram de grau cromatográfico, sendo eles: ácido acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) e acetonitrila (J.T. Baker, Phillipsburg, EUA).

4.2.2.2 Determinação do conteúdo de polifenóis totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado por espectroscopia na região do visível empregando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como padrão de referência para construção da curva de calibração (KUMAZAWA et. al., 2004; GEORGETTI et. al., 2006). A amostra do ECV foi obtida por meio da diluição do extrato em água purificada na concentração de 100,0 µg/mL. Para a reação, foi utilizado 0,5 mL da amostra do ECV, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de Na₂CO₃ 10%. O branco foi preparado utilizando 0,5 mL de água purificada, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de Na₂CO₃ 10%. Para eliminar a possibilidade da presença de interferentes de cor, foi preparado um controle contendo 0,5 mL da amostra, 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 0,9 N e 0,5 mL de água purificada. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada em

comprimento de onda de 760 nm. As amostras foram analisadas em triplicata e o conteúdo de polifenóis foi expresso como g de equivalente de ácido gálico por 100 g de extrato. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.2.3 Determinação do conteúdo de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais presentes no ECV foi determinado pelo método colorimétrico de complexação do cloreto de alumínio (AlCl_3) conforme descrito por Georgetti et. al. (2007), sendo a quercetina empregada como padrão de referência para construção da curva de calibração. Foram adicionados 0,5 mL do ECV diluído em água purificada na concentração de 4,0 mg/mL à 0,5 mL de solução etanólica 80% (v/v) de AlCl_3 2%. O branco foi constituído de 0,5 mL de etanol 80% e 0,5 mL de solução AlCl_3 2%. Para eliminar possíveis interferentes de cor da amostra, foi preparado um controle contendo 0,5 mL de amostra e 0,5 mL de etanol 80%. Após 1h de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi determinada em comprimento de onda 420 nm. As amostras foram analisadas em triplicata e o conteúdo de flavonoides totais foi expresso como g de equivalente de quercetina por 100 g de extrato. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.3 Avaliação da Atividade Antioxidante do ECV por Diferentes Métodos *in Vitro*

4.2.3.1 Determinação da atividade sequestradora do radical DPPH

A atividade antioxidante do ECV foi avaliada pela doação de átomos de hidrogênio ao radical DPPH por meio da diminuição da absorbância medida em 517nm (GEORGETTI et al., 2006; CASAGRANDE et al., 2007).

O preparo da amostra nesse ensaio consistiu na solubilização do ECV em água purificada ou solução hidroetanólica 50% (v/v) para alcançar no meio reacional as concentrações de 0,625; 1,25; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$. Assim, para determinar a atividade antioxidante do ECV, alíquotas de 50,0 μL das amostras foram adicionadas à mistura reacional contendo 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5), 1,0 mL de etanol absoluto e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 μM . A diminuição da absorbância do meio reacional foi medida após 15 min. de incubação à temperatura ambiente. O branco foi preparado contendo 1,0 mL tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol absoluto. Um

controle de cor foi realizado contendo 1,0 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), 1,5 mL de etanol e 50,0 µL das amostras. O controle positivo foi preparado na ausência de amostra e ele indica o máximo de elétrons livres do DPPH, o qual é considerado 100% de radicais livres na solução. Após incubação à temperatura ambiente, a absorvância foi determinada por espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.3.2 Determinação da capacidade doadora de elétrons ao radical ABTS

Os ensaios utilizando o radical ABTS estão baseados na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o radical de longa vida ABTS. Neste ensaio o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para seu radical cátion, que é intensamente colorido. A atividade antioxidante é medida pela capacidade do composto teste descolorir a solução reagindo diretamente com o radical ABTS (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O método foi realizado de acordo com Sánchez-Gonzalez et al. (2005), com algumas modificações. A solução ABTS foi preparada em meio aquoso e o cátion ABTS foi obtido após a reação de 7 mM da solução de ABTS com 2,45 mM de persulfato de potássio. A mistura foi armazenada em frasco âmbar e em geladeira por no mínimo 16h antes do uso. A solução ABTS foi diluída com tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) até atingir uma absorvância de 0,7 em 730 nm. Para preparar a curva de dose-resposta, uma alíquota de 50,0 µL da amostra diluída em água purificada de ECV foi adicionada ao meio reacional contendo 2,0 mL da solução de ABTS diluída, de modo que as concentrações finais de ECV no meio reacional em cada tubo fossem: 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 e 25,0 µg/mL. A mudança na absorvância foi medida após 6 min. de incubação à temperatura ambiente por espectrofotômetro em 730 nm. O branco foi constituído de tampão fosfato 20 mM (pH 7,4). O controle positivo foi preparado na ausência da amostra. O controle de cor foi preparado com solução de persulfato de potássio diluído em tampão fosfato 20 mM (pH 7,4) e 50,0 µL das amostras. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

4.2.3.3 Determinação do poder antioxidante baseado na capacidade de redução do ferro (FRAP)

A capacidade redutora do ferro pelo ECV foi determinada pelo ensaio FRAP, onde avalia a capacidade dos compostos antioxidantes para reduzirem o complexo férrico (Fe^{3+} - TPTZ) à forma ferrosa (Fe^{2+} - TPTZ), em meio ácido (pH 3,6). A capacidade redutora do ECV foi expressa em equivalente do padrão Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E (MARTINEZ et al., 2020).

O reagente de FRAP foi preparado como segue: 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM em ácido clorídrico (HCl) 40 mM foram adicionados à 2,5 mL de cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 20 mM e 25,0 mL de tampão acetato 0,3 mM (pH 3,6). Essa solução foi incubada à 37 °C por 30 min. antes do uso.

Para a avaliação da capacidade antioxidante, 900,0 μL do reagente de FRAP preparado previamente foram adicionados de 90,0 μL de água deionizada e 10,0 μL do padrão de Trolox ou 10,0 μL da amostra diluída de ECV (concentração final no meio reacional igual a 100,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após incubação das amostras à 37°C por 30 min., a absorvância foi determinada em 595 nm. O branco foi constituído de 100,0 μL de H_2O e 900,0 μL do reagente FRAP. Os resultados foram expressos em μM de equivalente de Trolox por grama de extrato. Todas as medidas foram feitas em triplicata (SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2005; MELO et al., 2021).

4.2.3.4 Determinação da atividade antioxidante por inibição da quimiluminescência gerada pelo sistema H_2O_2 /luminol/HRP (*horseradish peroxidase*)

O método se baseia na capacidade do antioxidante em inibir a quimiluminescência emitida pelo luminol em presença dos radicais livres gerados pela ação da peroxidase sobre H_2O_2 (MELO et al., 2021). Primeiramente, o ECV foi diluído em água para que atingisse no meio reacional as concentrações de 0,01; 0,04; 0,15; 0,30; 0,60; 1,25; 2,50; 5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As amostras de extrato diluído foram adicionadas à 380,0 μL de tampão fosfato (0,1 M pH 7,4) e 10,0 μL de solução de luminol, de modo a ter-se este no meio reacional na concentração de $1,13 \times 10^{-4}$ M. Na sequência, 100,0 μL de H_2O_2 foi incluído numa concentração final de 5×10^{-5} M. A reação foi iniciada pela adição de 500,0 μL e da enzima peroxidase (HRP) na concentração final de 0,2 UI/mL. Foi preparado um controle contendo 10,0 μL do

diluyente da amostra, no qual a quimioluminescência observada equivale a 100%. Todas as medidas foram feitas em triplicata (GEORGETTI et al., 2003; MELO et al., 2021).

4.2.4 Caracterização do OL

Para avaliar a identidade e qualidade do OL, foram realizados testes clássicos como índice de acidez, de saponificação, de peróxido e densidade relativa, assim como sua estabilidade oxidativa por Rancimat.

4.2.4.1 Índice de acidez

Para a determinação do índice de acidez, foi utilizado a metodologia 325/IV, descrito no livro Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz 4ª Edição (IAL, 2008). Foi pesado 2,0 g da amostra de OL em frasco erlenmeyer de 125,0 mL e, foi adicionado 25,0 mL de solução éter-etanol (2:1) neutra e 3 gotas de fenolftaleína 1% na amostra. Posteriormente, foi realizada a titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 M até o aparecimento da coloração rósea, que persistiu por 30 s. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O índice de acidez, expresso em mg NaOH/g, foi determinado através da equação (1).

$$Ia = \frac{v \times f \times 5,61}{p} \quad (1)$$

Onde:

v = volume (mL) de solução de NaOH 0,1 M gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1 M;

p = quantidade (g) da amostra.

Nota: O índice de acidez também foi expresso como acidez em ácido oleico (%), dividindo o resultado por 1,99 (IAL, 2008).

4.2.4.2 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado de acordo com a metodologia 5.2.29.11 descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª Edição (ANVISA, 2019). Foi pesado 5,0 g da

amostra de OL em frasco erlenmeyer de 250,0 mL e, foi adicionado 30,0 mL de uma mistura de ácido acético glacial e clorofórmio (3:2). A amostra foi agitada até sua total dissolução e foi adicionado 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após esse processo, a amostra foi agitada durante exatamente 1 min. e adicionado 30,0 mL de água. A amostra foi titulada com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M, lentamente, sem cessar a agitação magnética, até que a coloração amarela tenha quase desaparecido. Foi efetuado o ensaio em branco nas mesmas condições da amostra. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O índice de peróxido, expresso em meq/Kg, foi determinado através da equação (2).

$$I_p = \frac{10 (n_1 - n_2)}{m} \quad (2)$$

n_1 = volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio 0,01 M gasto na amostra;

n_2 = volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio 0,01 M gasto no branco;

m = quantidade (g) da amostra.

4.2.4.3 Índice de saponificação

O índice de saponificação foi determinado seguindo a metodologia 5.2.29.8 descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª Edição (ANVISA, 2019). Foi pesado 2,5 g da amostra de OL em balão volumétrico de 250,0 mL e, foi adicionado 25,0 mL da solução de hidróxido de potássio etanólico 0,5 M. Um condensador de refluxo vertical foi adaptado e, submetido a aquecimento em chapa aquecedora por 30 min. Por fim, foi adicionado 1,0 mL de solução de fenolftaleína 1% e titulado, imediatamente, o excesso de hidróxido de potássio com solução de ácido clorídrico 0,5 M. Foi efetuado o ensaio em branco nas mesmas condições da amostra e corrigido o volume do titulante. Todas as análises foram feitas em triplicata.

O índice de saponificação, expresso em mg KOH/g, foi determinado através da equação (3).

$$I_s = \frac{28,05 (n_2 - n_1)}{m} \quad (3)$$

Onde:

n_1 = volume (mL) de solução de hidróxido de potássio etanólico 0,1 M gasto na amostra;

n_2 = volume (mL) de solução de hidróxido de potássio etanólico 0,1 M gasto no branco;

m = quantidade (g) da amostra.

4.2.4.4 Densidade relativa

A densidade relativa do OL foi determinada pelo método do picnômetro de vidro à temperatura de 20°C, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª Edição (ANVISA, 2019). A densidade relativa é igual a razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas na mesma temperatura.

Primeiramente, o picnômetro (10,0 mL) foi pesado vazio, em seguida foi adicionado o OL e levado ao banho-maria em temperatura de 20°C durante 30 min., e então pesado novamente. Posteriormente, no picnômetro limpo foi adicionado água purificada e levado ao banho-maria, também na mesma temperatura e tempo. O ensaio foi realizado em triplicata e a densidade relativa foi calculada conforme a equação (4).

$$\rho (20^\circ\text{C}) = A - B/C \quad (4)$$

Onde:

ρ = Densidade relativa;

A = Massa do picnômetro contendo o óleo à 20°C;

B = Massa do picnômetro vazio;

C = Massa da água a temperatura de 20°C.

4.2.4.5 Estabilidade oxidativa

Para avaliar a estabilidade oxidativa do OL foi utilizado o equipamento Rancimat, que consiste em um teste acelerado expresso em período de indução (PI), definido como o intervalo de tempo correspondente ao ponto de inflexão da curva de condutividade *versus* tempo (METROHM, 2012). Conforme a metodologia da AOCS (2009), 2,0 g de amostra foram submetidos às condições de 110°C e 10,0

L de ar/L em equipamento Rancimat 873 (Metrohm, Herisau, Suíça). O teste foi feito em duplicata.

4.2.5 Desenvolvimento das NEs

As NEs formuladas para o estudo de EHL_{req} , determinação do sistema tensoativo e obtenção das NEs foram preparadas pelo método de EPI – *Emulsion Phase Inversion* por meio de aquecimento das fases aquosa e oleosa.

4.2.5.1 Emulsificação por método de EPI utilizando aquecimento

As formulações foram preparadas pelo método de baixa energia por inversão de fases, a fase oleosa contendo a mistura de tensoativos foi aquecida à temperatura de $75 \pm 2^\circ\text{C}$. A fase aquosa composta de água milli-Q foi submetida ao mesmo aquecimento. Após ambas as fases atingirem a mesma temperatura, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa, lentamente e sob agitação constante, a 600 rpm durante 3 min. Foi realizado o resfriamento forçado das emulsões com banho de gelo até que atingissem a temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) (FERNANDEZ et al., 2004; OLIVEIRA, 2008; SANTOS et al., 2011).

4.2.5.2 Determinação do valor de EHL_{req} pelo OL

Foi utilizado o método indireto, onde foram preparadas emulsões seriadas do OL, obtidas utilizando um par de tensoativos de EHL conhecidos, misturados em proporções variáveis, originando assim, valores definidos e escalonados de EHL (ZANIN et al., 2002). Para o estudo, foi utilizado o tensoativo hidrofílico polissorbato 80 (Tween[®] 80/ $EHL=15,0$) e o tensoativo lipofílico monooleato de sorbitano (Span[®] 80/ $EHL=4,3$), de modo a obter emulsões com valores seriados de EHL (CAMARGO, 2008). Os pontos de EHL_{req} variaram entre 4,3 e 15,0 (Tabela 1) e a composição total da mistura de tensoativos foi 5%, sendo a de OL 10% e água 85%.

A concentração necessária de cada tensoativo foi calculada utilizando a equação (5).

$$EHL_{req} = (EHL_A \times 0,01 \times A) + (EHL_B \times 0,01 \times B) \quad (5)$$

Onde:

EHL_{req} = valor de EHL resultante da mistura de tensoativos;

A = porcentagem do tensoativo hidrofílico;

B = porcentagem do tensoativo lipofílico.

Em que, $A + B = 100$, EHL_A e EHL_B correspondem ao EHL do Tween[®]80 e Span 80, respectivamente.

Tabela 1 - Composição % (p/p) de tensoativos hidrofílico e lipofílico utilizados na determinação do EHL_{req} para o OL.

Valor de EHL	Tensoativo Lipofílico	Tensoativo Hidrofílico
	Monooleato de Sorbitano	Polissorbato 80
	(Span [®] 80)	(Tween [®] 80)
	% (p/p)	% (p/p)
4,3	5,00	-
5,0	4,67	0,33
6,0	4,21	0,79
7,0	3,74	1,26
8,0	3,27	1,73
9,0	2,80	2,20
10,0	2,34	2,66
11,0	1,87	3,13
12,0	1,40	3,60
13,0	0,93	4,07
14,0	0,47	4,53
15,0	-	5,00

Legenda: EHL = Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo; p/p = peso em peso. **Fonte:** O próprio autor.

Após 24h do preparo, foi realizado testes de centrifugação para verificar floculação, cremação ou separação de fases, como também avaliar macroscopicamente as características típicas de NE (translucência, fluidez e reflexo azulado) (TADROS et al., 2004).

A emulsão que apresentou maior estabilidade, ou seja, menor volume cremeado e sem separação de fases, ou separação mínima, representa o valor de EHL_{req} pelo óleo que constitui a fase oleosa da emulsão (ZANIN et al., 2002).

4.2.5.3 Determinação do sistema tensoativo

Para definir o sistema tensoativo que estabilizasse a dispersão constituída de OL, foram testados outros pares de tensoativos, utilizando como tensoativos lipofílico o monooleato de sorbitano (Span[®] 80/EHL=4,3) e o olivato de cetearilo (Olivem[®] 1000/EHL=9,0) e, como tensoativo hidrofílico o óleo de rícino hidrogenado 40 OE (Chremophor[®] RH 40/EHL=13,0). A quantidade de cada tensoativo foi calculada para que atingisse os valores de EHL de 10,0, 11,0 e 12,0 do OL previamente determinado por meio do método descrito em 4.2.5.2.

4.2.5.4 Obtenção das NEs

Após avaliar o par de tensoativo que estabilizasse melhor as gotículas de OL no sistema, foram preparadas emulsões alterando a concentração da fase oleosa em 5 e 10% de OL, e a mistura de tensoativos mantida fixa em 5%.

As formulações foram preparadas conforme o item 4.2.5.1, utilizando como par de tensoativos o monooleato de sorbitano (SPAN[®]80/tensoativo lipofílico) e óleo de rícino hidrogenado 40 OE (Chremophor[®]RH40/tensoativo hidrofílico) para alcançar um valor de EHL de 10,0. As emulsões obtidas foram analisadas macroscopicamente, como também, por centrifugação, tamanho de partícula, IP e potencial zeta.

4.2.5.5 Incorporação do ECV

A NE selecionada após o estudo de caracterização física foi testada quanto a adição do ECV nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1,0% (p/p). O preparo foi realizado pelo método de EPI, conforme descrito no item 4.2.5.1. A adição do ECV nas formulações foi realizada diluindo o extrato seco em 3,0 mL de água milli-Q e adicionadas às formulações previamente preparadas sob agitação constante à 600 rpm por 3 min. Posteriormente, adicionou-se como conservante 0,5% de uma mistura de fenoxietanol e parabenos.

As formulações foram avaliadas quanto as características físico-químicas, conteúdo de polifenóis totais, estabilidade preliminar, potencial irritante tópico e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

4.2.6 Caracterização Físico-Química das NEs

A caracterização das NEs foi realizada pelos parâmetros de análise macroscópica, centrifugação, tamanho de partícula, IP, potencial zeta, pH, condutividade elétrica, densidade relativa, morfologia por MET e comportamento reológico.

4.2.6.1 Avaliação macroscópica

A avaliação macroscópica das emulsões foi realizada após 24h (estabilidade intrínseca) do preparo. Os aspectos observados foram de cremeação ou separação de fases, assim como os aspectos físicos de NE como translucência, fluidez e reflexo azulado (TADROS et al., 2004). Nos testes de estabilidade utilizou-se como nomenclatura: N = normal, sem alteração; CL = cremeação leve; CI= cremeação intensa; SF= separação de fases; FTA = fluído translúcido azulado.

4.2.6.2 Teste de centrifugação

A estabilidade das formulações foi avaliada submetendo as amostras à velocidade de 3200 rpm durante 30 min. em centrífuga modelo 206-BL da marca Fanem®, à temperatura ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (GEORGETTI et al., 2006). Posteriormente, foram analisadas macroscopicamente quanto à cremeação ou separação de fases e classificadas conforme descrito no item 4.2.6.1.

4.2.6.3 Determinação do tamanho de partícula, IP e potencial zeta

O tamanho médio das partículas e o IP das formulações foram avaliados por *Dynamic Light Scattering* (DLS) utilizando o equipamento *Nano Plus* (*NanoPlus Particle Size Analyzer*) e *Software Nano Plus*. Os valores de potencial zeta foram obtidos a partir da derivação da mobilidade eletroforética dada pelo mesmo equipamento. Para análise do tamanho de partícula e IP as amostras foram diluídas 1:100 (p/p) em água purificada e para o potencial zeta 1:300 (p/p) em KCl 1 mM à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, no ângulo de 90°C (CAMARGO, 2008; FERNANDEZ, 2004).

4.2.6.4 Determinação do pH

O valor de pH das NEs aditivadas e não de ECV foi medido utilizando um potenciômetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura marca Marte[®], previamente calibrado com soluções tampão padrões. A leitura foi à temperatura ambiente e as amostras foram diluídas 1:10 (p/p) em água purificada (GEORGETTI et al., 2006). As leituras foram feitas em triplicata.

4.2.6.5 Determinação da condutividade elétrica

O condutivímetro (HANNA instrument Modelo HI 8819N) foi calibrado com solução padrão de KCl 0,1 N. A medida de condutividade elétrica das emulsões foi realizada à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, adicionando o eletrodo diretamente na amostra (CAMARGO, 2008; LONNI et al., 2015). As leituras foram feitas em triplicata.

4.2.6.6 Densidade relativa

A densidade relativa das NEs adicionadas e não de ECV foi determinada conforme item 4.2.4.4.

4.2.6.7 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O aspecto morfológico das NEs foi avaliado utilizando MET (JEM 1400 instrument JEOL Inc., USA). As NEs foram diluídas na proporção 1:100 (p/p) em água destilada, e uma gota desta solução foi depositada sobre uma grade de cobre de 400 mesh coberta com filme FormVar/Carbono, e deixado em repouso durante 1h. Posteriormente, foi adicionado 1 gota de contraste negativo à base de acetato de uranila 2%, e deixado em contato por 10 min. O excesso de contraste foi retirado com papel filtro e a grade foi analisada diretamente no MET à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e 80kV, com aumento de 30.000 vezes.

4.2.6.8 Determinação do comportamento reológico

A avaliação do perfil reológico das NEs foi realizada em reômetro rotacional de modelo *HR-2 Discovery Hybrid Rheometer* (T.A Instruments, New Castle, Delaware, USA), utilizando aparato *spindle* DIN. As amostras foram analisadas

em 3 etapas: aumento da taxa de cisalhamento de 0 a 700 s⁻¹ (curva ascendente), constante em 700 s⁻¹ e redução de 700 a 0 s⁻¹ (curva descendente), em intervalos de 180s para cada ciclo à temperatura de 25°C. Os dados experimentais foram ajustados ao modelo Lei da Potência de acordo com a equação (6).

$$\sigma = K\gamma^n \quad (6)$$

Onde:

K = índice de consistência (cP);

σ = tensão de cisalhamento (Pa);

γ = taxa de cisalhamento (s⁻¹);

n = índice de comportamento de fluxo (adimensional).

4.2.7 Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais das NEs

A quantidade de polifenóis totais nas NEs aditivadas com diferentes concentrações de ECV foi avaliada pelo método espectrofotométrico utilizando Folin-Ciocalteu como reagente (GEORGETTI et al., 2006), conforme descrito no item 4.2.2.2. Para quantificação do conteúdo de polifenóis totais presente nas NEs foi realizado, primeiramente, uma extração por partição das mesmas. Amostras de 0,3 g das diferentes formulações foram adicionadas em tubos de ensaios contendo uma mistura de 1,0 g de solução de KCl 20% e 1,5 mL de acetato de etila, em seguida as amostras foram submetidas à agitação com auxílio de um vórtex por 3 min. Após esta etapa, os tubos foram colocados em centrífuga com rotação de 3600 rpm durante 30 min. Posteriormente, a fração acetato de etila (sobrenadante) foi cuidadosamente removida e separada da fração remanescente (parte aquosa) (LONNI et al., 2015). Ambas foram levadas a evaporação e, posteriormente, foram ressuspensas em água deionizada para determinação do conteúdo de polifenóis totais.

4.2.8 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Livre DPPH das NEs

A atividade antioxidante do ECV livre e das NEs aditivadas do extrato em diferentes concentrações foi avaliada pela capacidade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH como descrito no item 4.2.3.1. As NEs aditivadas e não de ECV, assim como o ECV livre, foram diluídos para alcançar um valor aproximado de IC₅₀ encontrado previamente para o extrato. O ECV livre e as NEs

carregadas de extrato foram apropriadamente diluídos com etanol 50% (v/v) para obter concentrações teóricas de extrato de 10,0 µg/mL no meio reacional. Para medir a capacidade sequestradora do DPPH, foi adicionado no meio reacional 50,0 µL de cada amostra. A mudança na absorvância foi medida após 15 min. de incubação à temperatura ambiente. O branco foi constituído de 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M (pH 5,5) e 1,5 mL de etanol. Como controle foi utilizado meio reacional de DPPH adicionado de 50,0 µL de etanol 50% e outro controle adicionado de 50,0 µL de NEs sem extrato. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.2.9 Teste de Estabilidade Preliminar (Ciclo Gela-Degela)

Neste teste as amostras foram armazenadas em diferentes temperaturas, em intervalos regulares de tempo (ANVISA, 2004). Para tanto, as NEs aditivadas e não de ECV foram acondicionadas em potes semipermeáveis de polipropileno e armazenadas em condições de temperaturas alternadas de $4 \pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$ e $40 \pm 2^\circ\text{C}/24\text{h}$, completando assim um ciclo. No total foram 6 ciclos, totalizando 12 dias (ANVISA, 2004; LIMA et al., 2008).

As amostras foram avaliadas quanto aos parâmetros físico-químicos, como aspecto macroscópico, pH, condutividade, centrifugação, além da estabilidade funcional pela avaliação da atividade antioxidante por sequestro do radical DPPH. As análises foram realizadas antes do início do ciclo e após completar o 6º ciclo.

4.2.10 Teste de Irritação Aguda na Pele

A aplicação tópica de diferentes preparações pode provocar irritação na pele. Sendo assim, as NEs desenvolvidas neste trabalho foram investigadas quanto ao seu potencial de sensibilização da pele (BALATA et al., 2018). Para tanto, alíquotas de 300,0 µL das NEs aditivadas e não de ECV foram aplicadas na pele dorsal de camundongos sem pelo da linhagem HRS/J. Em adição, foi utilizado um grupo de animais sem tratamento para comparação. Após a aplicação das formulações no dorso dos animais (n=3/grupo) previamente limpos com solução salina, as áreas foram observadas nos tempos 24, 48 e 72h para avaliar qualquer sinal e/ou sintoma de inflamação ou outras alterações anormais na pele (GFELLER; KOBEL; SEIFERT, 1985; BALATA et al., 2018, GHOSH; MONDAL; RAMAKRISHNA, 2019).

4.2.11 Avaliação da eficácia antioxidante *in vivo*

4.2.11.1 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos sem pelo da linhagem HRS/J, machos e adultos, pensando em média 30,0 g. Os camundongos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) localizada no Biotério do Centro de Ciências da Saúde/UEL, utilizando ciclo de claro/escuro (12/12h) com água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina, com seguimento de suas normas (registro no CEUA sob o nº 019/2020, processo nº 197.2020.75).

4.2.11.2 Sistema e fonte de radiação UVB e modelo de indução de estresse oxidativo pela radiação UVB

A fonte de luz utilizada nos experimentos de indução de estresse oxidativo e processo inflamatório agudo foi uma lâmpada UVB fluorescente modelo PHILIPS TL/12 40W RS (MEDICAL-HOLANDA). A lâmpada emite radiação na faixa de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm e foi acoplada no interior de uma caixa retangular de madeira desenvolvida especificamente para indução da lesão cutânea, com capacidade máxima para 6 caixas de polipropileno com dimensão 30x19x13 cm para acondicionamento de camundongos. Os camundongos foram distribuídos nas caixas e cobertos com tela plástica para que eles permanecessem dentro delas, além de manterem complemente expostos à luz ultravioleta. Ainda, os animais foram colocados a uma distância de 20 cm da lâmpada UVB, movimentando-se livremente em suas caixas e para que a mesma dose de radiação fosse distribuída para todos os animais, foi realizada uma rotatividade entre as caixas, já que podem ocorrer variações de emissão de luz ao longo da lâmpada. A medida de irradiância da lâmpada foi realizada utilizando-se um radiômetro (IL 1700) com detectores para RUV (SED 005) e, especialmente, para UVB (SED 240) (CARINI et al., 2000; CASAGRANDE et al., 2006), tornando-se possível a posterior padronização da dose de radiação para $4,14 \text{ J/cm}^2$ (CAMPANINI et al 2013; IVAN et al., 2014; MARTINEZ et el., 2016; SAITO et al., 2018) durante o período de exposição de 4:05h .

4.2.11.3 Protocolo experimental de avaliação do potencial terapêutico das NEs adicionadas de ECV em camundongos

Os camundongos foram alocados aleatoriamente em 6 grupos experimentais contendo 6 animais cada:

- (1) Grupo não irradiado e tratado com salina;
- (2) Grupo irradiado e tratado com salina;
- (3) Grupo irradiado e tratado com formulação BASE;
- (4) Grupo irradiado e tratado com formulação 0,25% ECV;
- (5) Grupo irradiado e tratado com formulação 0,5% ECV;
- (6) Grupo irradiado e tratado com formulação 1,0% ECV.

Os camundongos foram tratados com 300,0 μ L com as diferentes formulações em 3 diferentes tempos: 1h antes da irradiação, imediatamente antes e logo após a irradiação. Os animais foram submetidos a eutanásia com 5% de isofurano e amostras de pele da região dorsal foram coletadas 12h após a irradiação para realização dos testes da atividade da MPO, FRAP e ABTS (CAMPANINI et al., 2013; MARTINEZ et al., 2015; SAITO et al., 2018).

4.2.11.4 Atividade da MPO

A atividade da enzima MPO representa um ensaio indireto para o recrutamento de leucócitos após a RUVB (CAMPANINI et al., 2013; IVAN et al., 2014).

As amostras de pele foram coletadas e homogeneizadas com tampão fosfato 50mM (pH 6,0) contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetil amônio (HTAB). Essas amostras foram homogeneizadas com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) e, posteriormente, centrifugadas à 16.100 *g* por 2 min. à temperatura de 4°C. Para a reação colorimétrica, foram adicionados 30,0 μ L do sobrenadante de cada amostra juntamente com 200 μ L de uma solução contendo 10% de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), 0,167mg/mL de orto-dianisidina e 0,015% de H₂O₂ em água deionizada. A atividade da MPO das amostras foi determinada espectrofotometricamente em 450 nm (EnSpire, Perkin Elmer) e comparada a uma curva padrão de neutrófilos com concentração conhecida. Os resultados obtidos foram expressos em número de neutrófilos/mg de pele (CASAGRANDE et al., 2006).

4.2.11.5 Avaliação do poder antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical ABTS

A capacidade antioxidante de cada amostra é medida de acordo com o decaimento da coloração do radical cátion ABTS quando ocorre doação de elétrons a ela feita pelo antioxidante. Para a reação de ABTS, as amostras foram homogeneizadas em 400,0 μL de KCl a 1,15% com auxílio do homogeneizador de tecidos Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas à 1.000 g por 10 min à temperatura de 4°C, posteriormente, o sobrenadante foi utilizado para análise. A solução de ABTS foi preparada como descrito no item 4.2.3.2. Em seguida, a solução ABTS foi diluída em tampão fosfato até atingir a absorvância de 0,7 a 0,8 em 730 nm. Para a reação, foram adicionadas alíquotas de 7,0 μL do sobrenadante de cada amostra e 200,0 μL da solução de ABTS diluída. O branco foi composto apenas de tampão fosfato. Após 6 min. de reação, foi realizada a leitura em 730 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Uma curva padrão foi realizada com diferentes concentrações de trolox (0,02 a 20,0 nmol) e os resultados foram expressos em nmol equivalente de trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005; MARTINEZ et al., 2015).

4.2.11.6 Avaliação do poder antioxidante redutor de ferro (FRAP)

O ensaio de FRAP mede a redução férrica do 2,4,6 tripiridil-S-triazina (TPTZ) para um produto colorido por meio da ação de antioxidantes que doam elétrons para a reação (KATALINIC et al., 2005). O ensaio foi adaptado e utilizado para avaliar o poder antioxidante de amostras de pele (MARTINEZ et al., 2015).

As amostras de pele dos animais dos diferentes grupos foram coletadas e homogeneizadas em 400,0 μL de KCl (1,15%) com auxílio do Tissue-Tearor (Biospec 985370) e centrifugadas à 1.000 g por 10 min. à temperatura de 4°C. Para a reação foram utilizadas 30,0 μL do sobrenadante do homogenato das amostras e 150,0 μL de reagente FRAP previamente preparado como descrito no item 4.2.3.3. Posteriormente, foi realizada a leitura em 595 nm (EnSpire, Perkin Elmer). Soluções padrão com diferentes concentrações de trolox (0,039 a 20,0 nmol) (antioxidante análogo da vitamina E) foram utilizadas para a curva padrão. Os resultados foram expressos com nmol equivalente de Trolox/mg de pele (KATALINIC et al., 2005).

4.2.12 Análise Estatística

As concentrações do extrato que inibem o processo oxidativo *in vitro* em 50% (IC₅₀) foram estimadas pelo software *GraphPad Prism*®, versão 7.00 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA), utilizando uma curva hiperbólica e apresentadas pela média ± erro padrão da média (EPM) de mensurações feitas em triplicata de cada concentração e foram representativas de três experimentos separados. Os resultados *in vivo* foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) com um fator seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey e apresentados pela média ± EPM de mensuração feitas com 6 animais em cada grupo por experimento. Os resultados foram representativos de 2 experimentos separados e foram considerados significativamente diferentes para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Química do ECV

Recentemente, a demanda e o consumo dos grãos de café verde dispararam devido aos diversos benefícios que proporcionam à saúde. Essas propriedades biológicas do café se devem principalmente à presença de elevados níveis de compostos fenólicos (ZAIN; BABA; SHORI, 2018).

Os compostos fenólicos compreendem uma diversidade de substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, e podem ser classificados conforme o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligadas. Os principais grupos de compostos fenólicos encontrados nos alimentos são os ácidos fenólicos, flavonoides e as lignanas (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Ácidos fenólicos são os principais responsáveis pela ação antioxidante em plantas, sendo os ACGs e compostos relacionados os componentes majoritários da fração fenólica dos grãos de café verde, correspondendo a teores de até 14% em peso seco (FARAH; DONANGELO, 2006). Esses constituintes são metabólitos secundários de plantas geralmente envolvidos na defesa contra a RUV ou agressão por patógenos (FARAH; DONANGELO, 2006), proporcionam diversos benefícios à saúde, atuando não somente como um potente antioxidante, mas também como

agentes hepatoprotetores, hipoglicêmicos e antivirais (CORSO; VIGNOLI; BENASSI, 2016), além de ter ação no tratamento do diabetes mellitus, hipertensão e Alzheimer (FUKAGAWA et al., 2017; STEFANELLO et al., 2019). Em adição, alguns estudos demonstraram que os ACGs são efetivos na prevenção da inflamação da pele e pigmentação causada pela RUV (FUKAGAWA et al., 2017), além de apresentarem propriedades anticancerígenas (FARAH; DONANGELO 2006; DE OLIVEIRA; BASTOS, 2011; ZAIN; BABA; SHORI, 2018).

Os ACGs incluem diferentes grupos de compostos e isômeros relacionados formados pela esterificação de uma molécula de ácido quínico com um dos seguintes ácidos trans-cinâmicos: o mais comum no café é o ácido cafeico (3,4-dihidroxi-cinâmico), seguido por ácido ferúlico (3-metoxi, 4-hidróxi-cinâmico) e o ácido *p*-cumárico (4-hidróxi-cinâmico) (FARAH; DONANGELO, 2006). Os grupos podem ser classificados de acordo com o tipo, número e posições dos resíduos acilas, os principais grupos de ACGs encontrados nos grãos de café verde são os mono ésteres (ácidos cafeoilquínicos, ACQs; *p*-cumaroilquínicos, *p*-CuAQs e feruloilquínicos, AFQ); di-ACQ, tri-ACQ e tetra ésteres (tetra-ACQ), e ainda os ésteres mistos dos ácidos cafeico e ferúlico (ácidos cafeoil-feruloilquínicos, ACFQ) (FARAH, DONANGELO, 2006; NARITA; INOUE, 2015; STEFANELLO et al., 2019). Sendo que os nove principais isômeros são: três de ACQs (3-, 4- e 5-ACQs), três de di-ACQs (3,4-, 3,5- e 4,5-diACQs) e três dos AFQs (3-, 4- e 5-AFQs) (NARITA; INOUE, 2015).

Apesar dos ACGs estarem presentes em diversas plantas, os grãos de café verde são considerados um dos alimentos mais ricos em ACGs (FARAH, DONANGELO, 2006; NARITA; INOUE, 2015), sendo o 5-ACQ o mais abundante, compreendendo concentrações maiores que 50% (p/p), enquanto que o 3-ACQ e 4-ACQ correspondem juntamente a aproximadamente 15-20% (p/p) dos ACGs totais no café (NARITA; INOUE, 2015). Segundo Fukagawa et al. (2017), a eficácia do café é particularmente atribuída a presença de polifenóis, incluindo os ACQs (principalmente o 5-CQA), os 2-ACQ e os ACQs. Além disso, os três isômeros 2-ACQ (3,4-, 3,5- e 4,5-diCQA) dos grãos de café verde apresentam melhores efeitos antioxidantes. Em complemento, a atividade antioxidante do 3-, 4- e 5-ACQs são similares ao α -tocoferol e ácido ascórbico (NARITA; INOUE, 2015).

O conteúdo de ACGs em grãos de café verde pode variar de acordo com os aspectos genéticos, espécies, clima, estado nutricional do solo e processamento,

como descafeinação, grau de maturação e torrefação (FARAH, DONANGELO, 2006; VIGNOLI et al., 2014). Os grãos de café verde e o café torrado apresentam algumas diferenças em sua composição, uma vez que no processo de torrefação uma grande quantidade de ácidos fenólicos, sucrose, proteínas e trigonelina são degradados (FARAH, DONANGELO, 2006; CHOMA, 2019).

Durante o processo de torrefação os ACGs sofrem diversas mudanças, como a isomerização, epimerização, lactonização e degradação (STEFANELLO et al., 2019). Del Castillo et al. (2002), observaram uma diminuição na atividade antioxidante que foi correlacionado ao grau de torrefação, associado principalmente à degradação dos ACGs. Em adição, um estudo realizado na Grécia demonstrou que o processo de torrefação reduziu a atividade antioxidante de alguns tipos de café, e isso está diretamente relacionado a sua composição química. No entanto, o tempo de torrefação demonstrou, de forma conclusiva, a redução da atividade antioxidante. Normalmente, o conteúdo de ACGs pode variar de 0,5 a 6,0 g/100 g de peso seco, dependendo do tipo de processamento e, se o processo de torra for mais intenso, a quantidade de ACGs pode ser inferior a 1% de matéria seca (STEFANELLO et al., 2019).

Leloup (2006) estudou algumas bebidas feitas com diferentes grãos de café e relataram uma maior capacidade antioxidante para *C. canephora* do que para *C. arabica*, apresentando teores de ACGs em torno de 10% para o *C. canephora* e 8% para o *C. arabica*. No entanto, apesar dos grãos do *C. canephora* verde apresentarem teores de ACGs maiores que o *C. arabica*, os compostos presentes no *C. canephora* pareceram ser mais sensíveis ao processo de torra. Clifford (1997) relatou que para um grau de torra semelhante, o *C. canephora* passa por um maior grau de perda de ACGs, produzindo fenóis voláteis e guaicol. Trugo e Macrae (1984b) e Dias (2005) também descreveram um comportamento semelhante para o *C. arabica* e *C. canephora* com diferentes graus de torra. Diante disso, Vignoli, Bassoli e Benassi (2011) demonstraram que a maior capacidade antioxidante do *C. canephora* poderia ser atribuída ao seu maior teor de cafeína, uma vez que se correlacionou positivamente com sua atividade antioxidante.

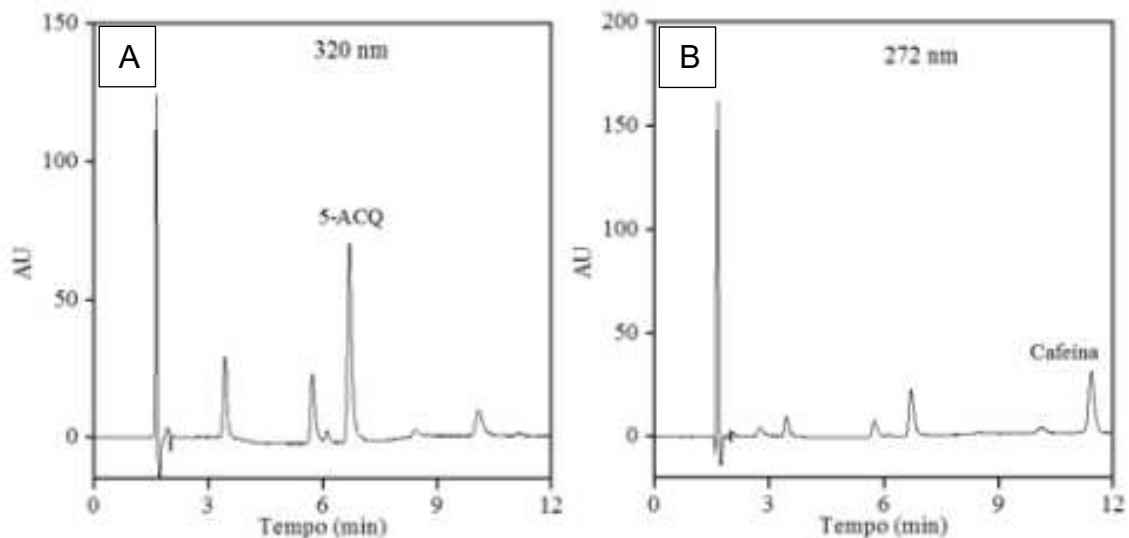
Além dos ACGs, outros compostos que atribuem propriedades bioativas ao café verde são as fibras solúveis, alcaloides e terpenos. Dentre os alcaloides presentes no café estão a cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e a trigonelina, como os principais componentes. Outras formas de metilxantinas encontradas no café são

teobromina, paraxantina e teofilina (STEFANELLO et al., 2019). A cafeína foi o precursor que despertou o interesse em ser estudado, devido ao poder que tem sobre o metabolismo energético e aos efeitos psicoativos (PANUSA et al., 2013).

Além de exercer efeito sobre o sistema nervoso, a cafeína é outro constituinte do café com atividade antioxidante exercida pelo mecanismo de sequestro de radicais livres (GEORGE et al., 1999). Em estudo realizado por Devasagayam et al. (1996), a cafeína demonstrou efetiva inibição da peroxidação lipídica *in vitro* induzida por EROs em microssoma de fígado de rato. A lesão oxidativa foi induzida pelos radicais hidroxil, peroxil e oxigênio singlete. A cafeína apresentou efetiva inibição da peroxidação lipídica, em concentrações milimolares, contra as três espécies reativas do metabolismo do oxigênio.

Mediante o exposto, o presente trabalho avaliou o teor de 5-ACQ e cafeína presente no ECV por CLAE. Quanto a composição em bioativos, o ECV apresentou teores de 12,2 g de ACGs/100 g e 3,6 g de cafeína/100 g, conforme cromatogramas que podem ser observados na Figura 6.

Figura 6 - Cromatogramas dos bioativos presentes no ECV. Detecção em (A) 320 nm para o 5-ACQ e (B) 272 nm para cafeína.



Fonte: O próprio autor.

Segundo Narita e Inouye (2015), os teores de ACGs no *C. arabica* e *C. canephora* verde encontram-se na faixa de 3,40 a 7,24% (p/p) e 5,17 a 14,4% (p/p), respectivamente. Farah e Donangelo (2006), reportaram que o *C. canephora* verde contém teores de ACGs na faixa de 7 a 14%.

Vignoli, Bassoli e Benassi (2011), realizaram um estudo com cafés solúveis produzidos com *C. canephora* e *C. arabica* submetidos a diferentes graus de torrefação e encontrou teores de ACGs para *C. canephora* entre 2,79 e 4,24% (torra leve), 1,71 e 2,26% (torra média) e 0,21 e 0,25% (torra intensa), e para *C. arabica* teores entre 3,53 e 4,11% (torra leve), 1,87 e 2,55% (torra média) e 0,62 e 0,40% (torra intensa). Já para concentrações de cafeína foi encontrado teores entre 3,98 e 5,33% (torra leve), 5,82 e 5,54% (torra média) e 4,75 e 4,88% (torra intensa) para o *C. canephora*, e 2,84 e 3,44% (torra leve), 3,07 e 4,12% (torra média) e 3,64 e 3,34% (torra intensa) para o *C. arabica*.

Corso, Vignoli e Benassi (2016), também avaliaram o conteúdo de ACGs e cafeína em diferentes espécies e grau de torrefação, e para o *C. arabica* encontraram teores de ACGs de 5,75% (torra média) e 3,83% (torra intensa) e para cafeína 2,60% (torra média) e 2,72% (torra intensa), para *C. canephora* teores de ACGs de 3,75% (torra média) e 2,39% (torra intensa) e para cafeína 3,80% (torra média) e 3,98% (torra intensa), e para o *C. canephora* verde foram encontrados teores de ACGs e cafeína de 14,04% e 3,86%, respectivamente.

Os resultados apresentados por Vignoli, Bassoli e Benassi (2011) e Corso, Vignoli e Benassi (2015) corroboram que o conteúdo de bioativos do café depende da espécie e do grau de torra, demonstrando que o aumento no grau de torra do café reduziu o conteúdo de ACGs em ambas as espécies. Em relação ao teor de cafeína para as diferentes espécies de café e grau de torrefação, o *C. canephora* apresentou teores maiores que o *C. arabica*. Segundo a literatura, os teores de cafeína são altamente dependentes das espécies, sendo que o *C. canephora* apresenta teores mais elevados do que o *C. arabica*, e apenas pequenas perdas são observadas durante o processo de torra devido à sua estabilidade térmica (MONTEIRO; TRUGO, 2005).

Em adição, segundo Rodrigues et al. (2015) e Mehari et al. (2016), o perfil e quantidade de ácidos fenólicos no café depende principalmente da variabilidade genética, práticas agrônômicas e fatores ambientais e, em menor grau de importância, condições de colheita e pós-colheita.

Baseado nesses resultados, é notório que o café verde tem suas propriedades preservadas e, conseqüentemente, uma maior eficiência antioxidante, uma vez que ao passar pelo processo de torra muitos componentes são degradados diminuindo a sua atividade bioativa. Além disso, o *C. canephora* apresenta maior

conteúdo de cafeína quando comparada ao *C. arabica*, este composto por sua vez está ligado diretamente à atividade antioxidante do café (VIGNOLI; BASSOLI; BENASSI, 2010).

Estudos epidemiológicos sugerem que o uso de compostos bioativos com atividade antioxidante reduz a incidência de doenças como hipertensão, ataque cardíaco e câncer de pele, além de apresentar fatores favoráveis para o controle de desordens metabólicas (PRIOR, 2015). Há estudos que demonstram que o estresse oxidativo está relacionado a doenças neurodegenerativas, como doenças de Alzheimer e Parkinson (NIKI, 2010).

A atividade antioxidante detectada nos polifenóis ocorre por meio da capacidade em doar átomos de hidrogênio ou elétrons a fim de impedir os mecanismos de oxidação. O elevado potencial antioxidante que estes compostos polifenólicos possuem reforça os estudos que têm surgido sobre a prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e doenças degenerativas crônicas, mostrando-se benéficos à saúde (VIGNOLI et al., 2014). Na indústria alimentar e farmacêutica, as substâncias fenólicas têm sido utilizadas como flavorizantes, corantes, aromatizantes e, sobretudo, como antioxidantes (FIRMINO, 2011).

Uma das maiores classes de compostos polifenólicos são os flavonoides, estes são pigmentos naturais importantes e nas plantas tem como função principal proteger estes organismos contra agentes oxidantes (LOPES et al., 2010). Basicamente, todos os flavonoides são constituídos por três anéis, onde os seus carbonos podem sofrer variações químicas, dando formação a inúmeros compostos que são agrupados em classes (GEORGIEV; ANANGA; TSOLOV, 2014). Suas principais classes são as flavonas, flavonóis, flavanonas, catequinas, antocinas, isoflavonas, diidroflavonóis e chalconas (MACHADO et al., 2008). Tem-se verificado um interesse muito grande pelas propriedades biológicas dos flavonoides, como também pelo fato de estes poderem ser utilizados como substitutos de antioxidantes sintéticos, não só pela área alimentar, mas também pela cosmética e pela indústria farmacêutica (COSTA, 2014a).

Neste estudo, foram determinados os teores de polifenóis e flavonoides totais recorrendo à espectrofotometria. Para a análise de polifenóis totais foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu empregando o ácido gálico como padrão. Deste modo, o teor de polifenóis totais foi dado como equivalentes de ácido gálico, onde estatisticamente apresentou um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9998. A

quantidade encontrada de polifenóis totais no ECV foi de $15,53 \pm 0,20$ g ácido gálico/100 g extrato. Em um estudo realizado por Abrahão et al. (2010) foi determinado o conteúdo de polifenóis totais do café verde e café torrado da espécie *C. arabica*, e os resultados encontrados foram de 5,43 e 4,83 g ácido gálico/100 g extrato, respectivamente. Fernandes et al. (2003) também encontrou valores no intervalo de 4,31 a 6,18% para cafés verdes e torrados para o *C. arabica*.

Palmieri et al. (2018), avaliaram o efeito da biotransformação de compostos fenólicos no café verde (*C. arabica* L.) utilizando o fungo *Aspergillus oryzae* para obter um extrato fermentado com maior atividade antioxidante. Verificaram que a fermentação do farelo obtido do café verde fermentado pelo *A. oryzae* por 24h forneceu um extrato apresentando o valor de $17,63 \pm 4,22$ g ácido gálico/100 g de extrato, enquanto o não fermentado um valor de $10,56 \pm 1,53$ g ácido gálico/100 g de extrato. Assim, podemos observar que o valor encontrado de polifenóis totais no presente trabalho foi próximo do valor obtido no extrato após fermentação e maior que o não fermentado avaliados no estudo supracitado.

Para determinação do conteúdo de flavonoides totais, uma curva padrão de quercetina foi analisada estatisticamente apresentando um coeficiente de correlação linear (R^2) de 0,9932 e o valor encontrado no ECV foi de $0,28 \pm 0,11$ g de quercetina/100 g de extrato.

Em estudo no qual foi avaliado o teor de flavonoides em extrato obtido das sementes de *C. arabica* e no extrato da torta, que é um resíduo da produção da indústria cafeeira, encontrou-se os valores de 3,96 μ g e 5,12 μ g de flavonoides equivalentes a quercetina/ 100 μ g de extrato, respectivamente (CASTRO, 2014).

Vega, León e Reyes (2017) avaliaram 34 tipos de cafés comerciais do Panamá, e o teor de flavonoides totais das amostras analisadas encontraram-se na faixa de 22,16 e 38,29 mg de catequina/g amostra. Já Hecimovic et al. (2011) encontrou valores inferiores para os cafés da variedade arábica, que ficou na faixa de 15,41 e 17,29 mg/g, dependendo do grau de torra.

No trabalho de Hecimovic et al. (2011), que avaliou as espécies *C. arabica* e *C. canephora* na condição verde e em três níveis de torra, foi observado valores de flavonoides totais que variaram de 12,33 a 20,58 mg ácido gálico/g amostra.

Já no estudo de Vieira (2015), foi verificado em grãos de café verde um conteúdo de flavonoides totais (41,2 mg/g) maior que de polifenóis (4,855 mg/g),

diferentemente do que foi encontrado no presente trabalho e nos estudos supracitados.

A diferença de valores encontrados no conteúdo total dessas substâncias normalmente depende da maturidade dos grãos e, em menor grau, sobre a composição do solo, condições climáticas e práticas agrícolas relacionadas ao café arbusto (STELMACH; POHL; SZYMCZYCHA-MADEJA, 2015; FARAH; DONANGELO, 2006). Em adição, Cheong et al. (2013), relata que a discrepância de valores pode ser explicada pela diferente origem do café verde.

5.2 Atividade Antioxidante do ECV

Evidências científicas têm demonstrado que os compostos fenólicos provenientes do extrato do grão de café cru ou verde, principalmente os ACGs, exibem inúmeras propriedades biológicas, incluindo efeitos antibacteriano, antioxidante, atividade anticarcinogênica e termogênica (KONO et al., 1997; SHIMODA; SEKI; AITANI, 2006; VINSON; BURNHAM; NAGENDRAN, 2012).

Considerando que a atividade antioxidante dos extratos de plantas está relacionada a uma complexa mistura de substâncias, que podem atuar por meio de mecanismos variados (ROCHA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009), são propostos diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais, envolvendo ensaios químicos ou até mesmo o uso de ferramentas instrumentais (MEINHART et al., 2018). Dessa forma, este trabalho utilizou diferentes métodos *in vitro* para avaliação do potencial antioxidante do ECV.

Os métodos mais utilizados para determinação da atividade antioxidante são baseados na determinação espectrofotométrica por meio de mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons livres. Esses ensaios incluem o radical 2,2-difenil-1-(2,4,6-trinitrofenil) hidrazil (DPPH), o ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e redução do íon ferro (FRAP) (ARNAO, 2000; FRANKEL; MEYER, 2000; WOLLINGER et al., 2016; SHIVAKUMAR; KUMAR, 2018).

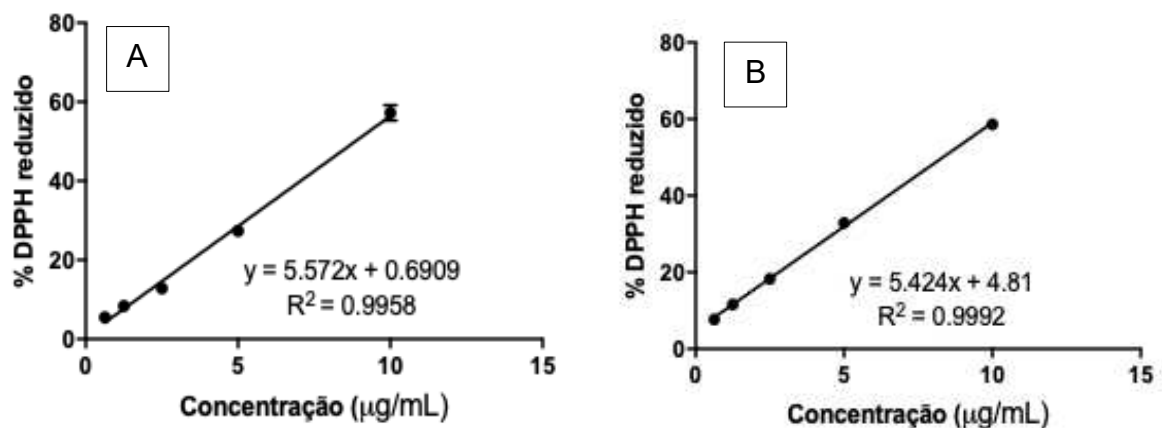
O ensaio de DPPH é um dos métodos mais populares e frequentemente utilizados em ensaios antioxidantes, é uma metodologia simples e rápida, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação, além de economicamente acessível (IHA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). O DPPH é considerado um

radical livre estável devido sua estrutura química que permite o deslocamento do elétron desemparelhado por toda a molécula, este deslocamento confere a molécula uma coloração roxa púrpura que possui uma banda de forte absorção em 517 nm (SCHAICH; TIAN; XIE, 2015).

Nos testes que envolvem capacidade sequestradora, os resultados foram expressos em IC₅₀ que se refere à mínima concentração necessária de antioxidante para inibir 50% de uma determinada concentração de radical (ĆETKOVIĆ et al., 2012). Para Roesler et al. (2007), um extrato apresenta alto potencial de sequestro de radicais livres quando possui baixo valor de IC₅₀, inibindo a oxidação em 50% do radical.

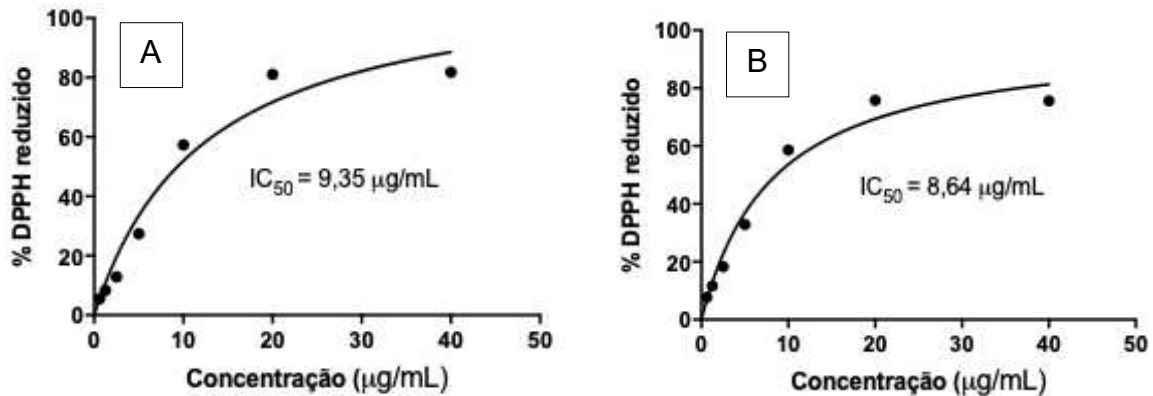
De acordo com os resultados obtidos, demonstrou-se que a atividade doadora de átomos de hidrogênio ao radical DPPH foi concentração-dependente para ECV utilizando água purificada ou etanol 50% como solventes. O extrato apresentou uma linearidade entre 0,625 - 10,0 µg/mL, com R² de 0,9958 e 0,9992, respectivamente (Figura 7). As atividades máximas encontradas para o ECV dissolvido em água e em etanol 50% na concentração de 20,0 µg/mL no meio reacional, apresentou valores de 81,08 e 75,83%, respectivamente, alcançando um platô de atividade (Figura 8).

Figura 7 - Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical livre DPPH do ECV. Linearidade do ECV (A) diluído em água e (B) etanol 50%. Os resultados estão representados pela média ± EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.



Fonte: O próprio autor.

Figura 8 - Habilidade doadora de átomo de hidrogênio ao radical livre DPPH do ECV. Curva concentração-resposta do ECV (A) diluído em água e (B) etanol 50%. Os resultados estão representados pela média \pm EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.



Fonte: O próprio autor.

Em estudo realizado por Stelmach, Pohl e Madeja (2015), amostras de 0,06 mL de infusões obtidas de grãos de café verde de diferentes origens do mundo apresentaram atividade doadora de átomos de hidrogênio que variam de 59,7% a 93,3%, com média de 75%. Em outro estudo, realizado com extratos obtidos de grãos de café verde arábica e robusta utilizando isopropanol em diferentes concentrações como solvente, foi observado também um alto potencial sequestrador do radical DPPH. Na concentração de 200 ppm, amostras de café arábica exibiram atividade de 76 a 92% e as de café robusta exibiram atividade de 78 a 88% (NAIDU et al., 2008).

Xavier (2017) avaliou a atividade antioxidante de dois cultivares do café arábica em diferentes níveis de processamento pós-colheita e foi verificado valores de IC₅₀ que variaram de 68,0 a 410,94 µg/mL. Segundo López-Galilea, Peña e Cid (2007), a maior capacidade antioxidante do *C. canephora* é atribuída principalmente ao maior teor de cafeína nesta espécie, uma vez que em seus estudos foi observado uma correlação significativa entre o conteúdo de cafeína e antioxidantes avaliado pelo ensaio de DPPH de bebidas de cafés comerciais.

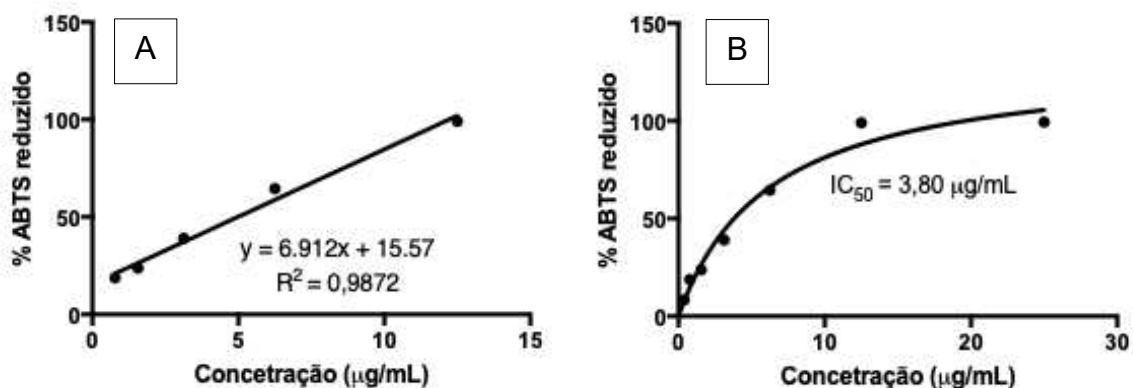
Em estudo realizado por Noorazwani et al. (2021), investigaram a capacidade antioxidante do *C. canephora* local (Jor, Malásia) submetido ao processo de fermentação ou torra. Os valores de IC₅₀ encontrados para o café cru, torrado e

fermentado foram 2,35, 3,23 e 2,43 mg/mL, respectivamente. Nota-se que o IC₅₀ encontrado por estes autores apresentou valores de IC₅₀ superiores ao do ECV, indicando que o extrato utilizado para este trabalho apresenta maior potencial antioxidante. Essa variação pode ser justificada pela diferença de clima, estado nutricional do solo e processamento ao qual o café foi submetido, uma vez que esses parâmetros influenciam no conteúdo de bioativos responsáveis pela atividade antioxidante (FARAH; DONANGELO, 2006).

Contudo, podemos concluir com base nos resultados obtidos que o café apresenta relevante capacidade sequestradora de radical livre DPPH apresentando potencial como antioxidante primário.

Foi avaliado também a capacidade sequestradora do radical ABTS pelo ECV. A amostra apresentou atividade nesse método de forma concentração-dependente. A atividade máxima encontrada para o extrato foi de 99,39% numa concentração de 12,5 µg/mL alcançando posteriormente um platô em 25 µg/mL (99%) e um valor de IC₅₀ de 3,80 µg/mL. A linearidade para o extrato apresentou-se entre 0,78 – 12,5 µg/mL com R² de 0,9872 (Figura 9).

Figura 9 - Atividade sequestradora do radical ABTS pelo ECV. (A) Linearidade e (B) concentração resposta. Os resultados estão representados pela média ± EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.



Fonte: O próprio autor.

Vignoli et al. (2014) relataram valores de ABTS de 48,2 a 36,4 g de Trolox/100 g para cafés solúveis arábica e robusta com diferentes graus de torra. Este mesmo trabalho analisou o potencial antioxidante pelo método FRAP e observou que esta atividade permaneceu quase estável (de 16,6 a 15,9 g Trolox/100 g para robusta e

13,6 a 13,4 g Trolox/100 g para arábica) diferentemente com os resultados observados pelo método de ABTS que demonstrou uma diminuição com o aumento de torra.

No presente trabalho, a metodologia de FRAP também foi utilizada para analisar o poder redutor de ferro do ECV. Os resultados foram expressos em equivalente de Trolox, considerando que quanto maior o resultado, maior é a capacidade redutora de Fe^{3+} , e assim, mais equivalente ao padrão Trolox (SHIVAKUMAR; KUMAR, 2018). O resultado foi calculado por meio da curva padrão de Trolox que apresentou um R^2 de 0,9989 e o poder redutor do ECV na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi de 0,93 μM Trolox/ $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amostra.

Outros estudos utilizaram a metodologia de FRAP para demonstrar a atividade antioxidante de café verde e torrado (HECIMOVIC et al., 2011; NAIDU et al., 2008; CHEONG et al., 2013). Assim, estes testes têm se tornado ferramentas usuais e extremamente necessárias na seleção de produtos naturais com potencial antioxidante (ALVES et al., 2010; PRIOR et al., 2005). O ensaio de FRAP mede somente os mecanismos de transferência de elétrons que em combinação com outros métodos, pode ser útil na distinção de mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes. Devido aos potenciais redox comparáveis do Fe^{3+} -TPTZ (0,70V) e do ABTS (0,68V), os compostos antioxidantes que reagem no ensaio do ensaio de FRAP tendem a reagir de forma similar no ensaio ABTS, gerando resultados que se correlacionam positivamente (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

O método de quimioluminescência baseia-se na emissão de luz gerada em uma reação química. Neste caso, a oxidação do luminol (5-amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinediona) envolve a formação de um complexo entre o agente oxidante (H_2O_2) e a enzima HRP (*horseradish peroxidase*) oxidada, para a produção do radical luminol (SHAHIDI; ZHONG, 2015).

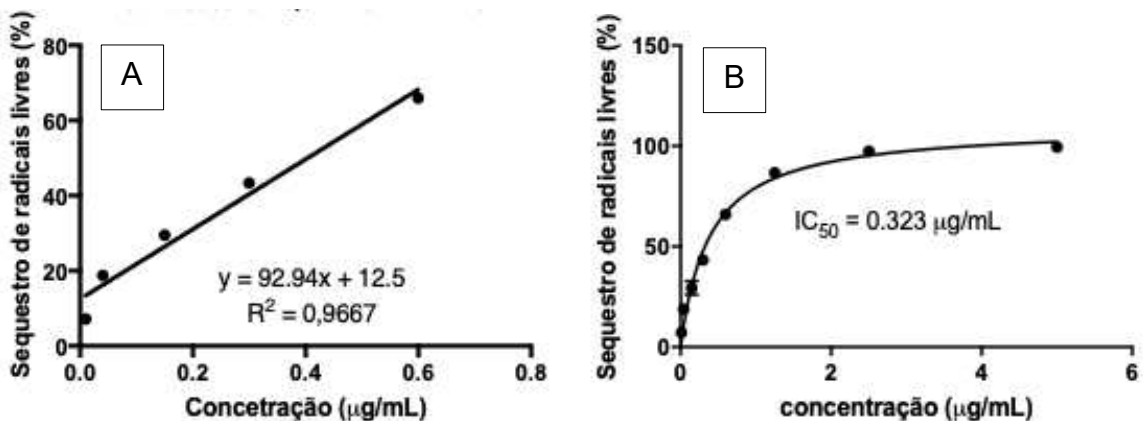
A enzima HRP nativa reage com H_2O_2 , desta maneira, catalisa a oxidação do luminol por meio de um ciclo enzimático. Luminol é o reagente quimioluminescente aquoso mais utilizado, este reage com intermediários da enzima HRP formando o radical luminol (L^{\cdot}), o qual reage com oxigênio, formando um endoperóxido ($\text{LO}^{2\cdot}$). Este endoperóxido se decompõe formando o diânion 3-aminofalato eletronicamente excitado ($\text{AP}^{2\cdot}$), que retorna ao seu estado basal, emitindo fótons, os quais são captados pelo equipamento. A enzima HRP retorna a sua forma reduzida (nativa)

pela reação com uma segunda molécula de luminol (KAMIDATE et al., 1995; DODEIGENE; THUNUS; LEJEUNE, 2000).

No entanto, na presença de moléculas antioxidantes, o radical luminol reage rapidamente com estes compostos antioxidantes, levando a uma inibição da oxidação dos radicais luminol a 3-aminofalato, e subsequente diminuição na intensidade de emissão de luz, onde pode ser considerada uma medida da atividade antioxidante (COSTIN et al., 2003).

No ensaio de quimioluminescência com geração de radicais livres (HRP/luminol/H₂O₂) foi verificado para o ECV uma capacidade sequestradora de radical livre concentração-dependente de 0,01 - 5,0 µg/mL, além de apresentar baixo valor de IC₅₀ (0,323 µg/mL), provavelmente devido a sensibilidade do método (MARQUELE et al., 2005). Atividade antioxidante máxima encontrada foi de 99,4% a 5,0 µg/mL. A linearidade do método ocorreu na faixa de 0,01 - 0,60 µg/mL com R² = 0,9667 (Figura 10).

Figura 10 - Atividade sequestradora de radicais livres (%) gerados pelo sistema H₂O₂/luminol/HRP pelo ECV. (A) Linearidade e (B) curva concentração resposta. Os dados foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Os dados são representados pela média ± EPM de medidas feitas em triplicata de cada concentração.



Fonte: O próprio autor.

Dessa forma, podemos observar que o ECV apresentou em todos os métodos *in vitro* utilizados um elevado potencial antioxidante. Em adição, devido a diversidade dos resultados conclui-se que não é recomendável a utilização de um único teste para determinar a capacidade antioxidante de uma substância e mais de

um teste deve ser realizado, devido os diferentes modos de ação dos antioxidantes presentes em uma matriz vegetal (HUANG; BOXIN; PRIOR, 2005; DUDONNÉ et al., 2009).

5.3 Caracterização do OL

Avaliar as propriedades físico-químicas se faz necessário uma vez que fornecem informações sobre as propriedades químicas ou físicas de uma amostra. Sendo assim, as técnicas instrumentais, baseadas em determinados princípios físicos e químicos desempenham importante papel avaliador da qualidade e segurança, por exemplo de óleo vegetais (IAL, 2008) que podem ser empregados na produção de produtos farmacêuticos e cosméticos.

As determinações realizadas nas análises de óleos e gorduras são geralmente os chamados índices, que são expressões de suas propriedades físicas ou químicas. São estes índices que, juntamente com as reações características, servem para identificação e avaliação da maioria dos óleos e gorduras, sendo o resultado da análise baseado neste conjunto de dados (IAL, 2008). A Tabela 2 apresenta os resultados da caracterização físico-química do OL.

Tabela 2 - Resultados das análises físico-químicas do OL.

Propriedades	Resultado
Índice de acidez (mg KOH/g)	4,97±0,26
(% ácido oleico)	2,50±0,13
Índice de peróxidos (meq/Kg)	4,90±0,00
Índice de saponificação (mg KOH/g)	191,95±0,24
Densidade (g/mL a 20°C)	0,9244±0,00
Rancimat (h)	2,21
Cor	Amarelo-dourado
Odor	Característico

Fonte: O próprio autor.

O índice de acidez é um importante parâmetro para avaliar o estado de conservação do óleo, que está intimamente relacionado com a natureza e qualidade

da matéria prima, com a qualidade e o grau de pureza do óleo, com o processamento e, principalmente, com as condições de conservação, uma vez que a decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada da formação de AGs livres. O índice de acidez corresponde ao número de mg de base (KOH ou NaOH) para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 grama de amostra (HARTMAN; STEVES, 1982; IAL, 2008).

Este parâmetro pode ser influenciado por diversos fatores como maturação dos grãos, tempo de estocagem da matéria-prima, ação enzimática, qualidade dos grãos, processo de extração do óleo (por ação mecânica e/ou por solventes) e, principalmente, as condições de conservação (CARDOSO et al., 2010).

Entre a colheita e a industrialização, ocorre a etapa de armazenagem, em que sementes e/ou grãos armazenados podem sofrer alterações em sua composição química, em razão do ambiente de conservação. Na indústria oleaginosa, os grãos passam por um período relativamente longo de armazenamento, compensando a sazonalidade entre safras para que não ocorra falta de matéria-prima para extração do óleo (BORDIGNON, 2009). Conforme Dios (1984), uma característica dos grãos oleaginosos, quando armazenados, é a acidificação, que se processa de forma progressiva, dependendo das condições ambientais do local, da quantidade de materiais estranhos, de grãos amassados e descascados, sendo acelerados para os maiores valores de teor de água e da temperatura do grão.

De acordo com a resolução RDC nº270 da ANVISA (2005), os óleos prensados a frio e não refinados deve apresentar limite máximo de acidez de 4,0 mg KOH/g. Nota-se, então, que o índice de acidez encontrado para o OL apresentou valor um pouco acima do permitido (Tabela 2). Possivelmente, esse grau de acidez foi obtido em virtude de uma maior quebra hidrolítica, sugerindo que as amostras possam não ter sido devidamente preservadas durante os processos de secagem, extração e/ou armazenamento (MORETTO; FETT, 1998).

Outro fato é que em óleos de primeira prensagem, a concentração de ácidos graxos livres é pequena, diferente daqueles de prensagens subsequentes, que apresentam conteúdo mais elevado destes compostos, pois neste processo a matriz celular é rompida e as lipases tem tempo de hidrolisar os triacilgliceróis (McCLEMENTS; DECKER, 2010), assim o valor um pouco mais elevado encontrado

para o OL obtido comercialmente neste trabalho pode ser explicado pelo fato de não ser produto obtido de primeira prensagem.

No entanto, ainda que o resultado obtido para o OL excedesse o valor estabelecido pela ANVISA (2005), a *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes* (FIRESTONE, 2006) estabelece como satisfatório um índice de acidez inferior a 3% expresso em % de ácido oléico, sendo assim o valor encontrado para o OL atendeu aos critérios de qualidade da AOCS uma vez que apresentou uma % em ácido oléico de 2,5 (Tabela 2).

Moura et al. (2019) encontraram valores de índice de acidez de outros óleos vegetais, como Babaçu (1,58mg KOH/g), Buriti (1,67mg KOH/g), Macaúba (8,74 mg KOH/g) e Pinhão-manso (3,99 mg KOH/g). Enquanto, para o óleo de girassol foi encontrado Índice de acidez de 3,09 g de ácido oléico/100g e para o óleo de coco índice de acidez de 4,48 mg KOH/g e acidez em ácido oléico de 0,43%. O resultado do índice de acidez é um ensaio que pode variar conforme a temperatura, ar atmosférico e luz. Assim, armazenar o óleo de maneira correta evita a ação desses fatores e, conseqüentemente, evita a sua deterioração, aumentando a vida de prateleira do produto (MORETTO; FETT, 1998).

Outro ensaio físico-químico realizado foi o índice de peróxido. Este índice tem como papel avaliar o grau de oxidação de óleos e gorduras, sendo utilizado para quantificar os hidroperóxidos que são produtos primários da rancidez oxidativa. Logo, a presença destes compostos é um indício de deterioração de óleos e gorduras (FENNEMA, 2000). A principal forma de deterioração dos óleos consiste na oxidação, que ocorre quando o oxigênio atmosférico é dissolvido no óleo e reage com os ácidos graxos insaturados, que são mais reativos quanto maior número de insaturações em suas cadeias. É um processo natural e a taxa de deterioração dependerá da quantidade de antioxidantes presentes (MACHADO et al., 2006).

Portanto, o índice de peróxido é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação do óleo ou gordura e a sua presença é indício de deterioração, que poderá ser verificada em alterações nas características dos óleos (REDA; CARNEIRO, 2007). Conforme a resolução RDC nº 270 da ANVISA (2005), estabelece limite máximo de 15,0 meq/kg para óleos prensados a frio e não refinados. Observa-se que o OL apresentou níveis de peróxidos (Tabela 2) dentro dos padrões preconizados pela legislação, indicando que o mesmo possui baixo

processo oxidativo e conseqüentemente pouca formação de peróxidos, confirmando que o óleo não está deteriorado.

O índice de saponificação é um indicativo da quantidade relativa de ácidos graxos de alto e baixo peso molecular. Os ésteres de baixo peso molecular requerem mais álcali para a saponificação, portanto o índice de saponificação é inversamente proporcional ao peso molecular dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis (MELLO; PINHEIRO; 2012, FIRESTONE, 2013).

Dessa forma, a reação de saponificação pode estabelecer o grau de deterioração e a estabilidade, verificar se as propriedades dos óleos estão de acordo com as especificações e identificar possíveis fraudes e adulterações (MORETTO; FETT, 1998). De acordo com a *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes* (FIRESTONE, 2006), estabelece para óleo bruto valor de índice de saponificação entre 188,0 e 196,0 mg KOH/g, com base no resultado obtido para OL (Tabela 2) o valor encontra-se dentro da faixa permitida pela legislação. Um índice de saponificação acima do permitido pela legislação indica presença indevida triglicerídeos de cadeia curta, enquanto valores abaixo do permitido indicam presença de triglicerídeos de cadeia longa (MORETTO; FETT, 1998). Sendo assim, o OL não apresentou alterações em sua composição e, conseqüentemente, não sofreu nenhuma fraude ou adulteração.

Epaminondas (2009), avaliou o índice de saponificação de OL das variedades dourada e marrom obtidos de sementes cruas e torradas. Foi encontrado valores de saponificação menores nos óleos das sementes cruas ($182,62 \pm 0,54$ mg KOH/g dourada e $184,01 \pm 1,07$ mg KOH/g marrom) que os obtidos das sementes após torrefação ($202,49 \pm 0,40$ mg KOH/g dourada e $201,46 \pm 0,87$ mg KOH/g).

Para se avaliar a estabilidade oxidativa ou a sua suscetibilidade à oxidação, o óleo ou gordura é submetido a teste de oxidação acelerada, sob condições padronizadas e um ponto final é escolhido, no qual se observam sinais de deterioração oxidativa. Para se acelerar a oxidação, os testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente (ANTONIASI, 2001).

Importante salientar que a composição dos ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras é particularmente relevante em relação à estabilidade oxidativa. Quanto mais insaturada for a matriz, mais rápida será a reação de oxidação. Em adição, o

teste Rancimat determina a estabilidade de oxidação dos óleos em um tempo muito curto, utilizando de altas temperaturas (50 - 150°C) e aeração intensiva, o que pode modificar a natureza do processo de oxidação (MASZEWASKA et al., 2018).

A estabilidade oxidativa realizada pelo método de Rancimat em temperatura de 110°C e fluxo de 10,0 L/h apresentou um tempo de indução da amostra de OL em 2,21h (Tabela 2). Devido ao baixo tempo de indução encontrado, foi realizado o teste com um outro OL obtido comercialmente da marca DUOM, sendo que o mesmo apresentou menor resistência a degradação oxidativa com tempo de indução de 1,41h. Assim, esses resultados do período de indução do OL, obtidos pelo método acelerado de Rancimat, mostra uma estabilidade oxidativa baixa, o que é justificado pelas características de composição relevante do nível de ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) dessa matriz. Apesar de conferirem susceptibilidade a degradação lipídica, estes mesmos ácidos graxos promovem benefícios à saúde (RIGON et al., 2017).

Rudnik et al. (2001), encontraram um valor de tempo de indução maior (6,4h) à uma temperatura de exposição menor que 100°C e fluxo de 10,0 L/h. Neste estudo, foi utilizado um óleo prensado à temperatura inferior a 40°C em nitrogênio. E o mesmo não foi refinado ou branqueado.

Assim, esta variação pode ser devido a diferentes fatores relacionados, como processo de obtenção, estocagem e composição química do óleo comercial utilizado no estudo. Nawar (2000) relatou que entre os fatores que afetam ou catalisam a oxidação dos lipídios, os mais importantes são: presença de insaturação nos ácidos graxos, luz, temperatura, presença de antioxidantes e de pró-oxidantes (como metais e clorofila), enzimas, metaloproteínas, microrganismos e condições de armazenamento.

Symoniuk, Ratusz e Krygier (2017), analisaram 15 OL prensados à frio obtidos do comércio local e encontraram variação entre os mesmos nos valores de PI, sendo o menor de 2,85h e maior de 4,96h.

Para Frankel (1993) os métodos de estabilidade acelerada apresentam validade restrita, pois à medida em que se submete a amostra ao aquecimento, à luz ou ao contato com metais muda-se o mecanismo da oxidação. Assim, os resultados obtidos sofrem desvios dos valores reais, já que o comportamento do óleo nestas condições será diferente das condições normais de estocagem.

A determinação da densidade é, geralmente, feita em análise de alimentos que se apresentam no estado líquido. Pode ser medida por vários aparelhos, sendo os picnômetros e densímetros convencionais e digitais os mais utilizados. Os picnômetros dão resultados precisos e são construídos e graduados de modo a permitir a pesagem de volumes exatamente iguais de líquidos, a uma dada temperatura. Da relação destes pesos e volumes resulta a densidade dos mesmos à temperatura da determinação. Usando água como líquido de referência, tem-se a densidade relativa à água ou peso específico (IAL, 2008).

É preciso destacar que a densidade evidencia o quanto de material está contido por uma unidade de volume, auxiliando na caracterização das substâncias. É inversamente proporcional ao volume; sendo assim, quanto maior a densidade menor será o volume ocupado, para uma mesma massa da substância, ou seja, quanto menor for o peso molecular dos triglicerídeos, menor será a densidade; e quanto maior for o grau de insaturação, mais denso será o óleo (CARVALHO, 2017). Segundo Walia et al. (2014) a densidade é influenciada pelo grau de insaturação dos ácidos graxos.

Carvalho (2017) salienta que o OL não apresenta parâmetros determinados legalmente, esta falta de informação físico-química prejudica a comparação dos resultados em relação à legislação, no entanto, apresenta em um de seus trabalhos, um valor de densidade de 4,28 g/mL a 25°C o que difere bastante com o resultado encontrado de 0,9244 g/mL a 20°C. Contudo, no estudo de Epaminondas (2009), os valores encontrados dos óleos obtidos de sementes cruas e torradas de linhaça marrom e dourada, encontram-se todos muito próximos entre si (0,924 - 0,9260 g/mL), como também, do valor encontrado para nossa amostra (Tabela 2). Valores estes que são recomendados por Gustone, Harwood e Dijkstra (2007), Firestone (2006), Novello e Pollonio (2011).

Considerando os resultados encontrados, podemos observar que o OL é susceptível à oxidação lipídica, que pode ocorrer durante o processamento, manipulação e estocagem por ser um óleo rico em ácidos graxos poliinsaturados. Em contrapartida, devido as potencialidades relatadas do OL, torna-se importante sua incorporação em formulações que favoreçam sua absorção no organismo e principalmente protejam-no contra eventuais fenômenos de degradação (RIGON et al., 2017). Assim, foi desenvolvida uma NE constituída de OL como fase oleosa.

5.4 Desenvolvimento das NEs

5.4.1 Determinação do valor de EHL_{req} para o OL

A estabilidade das emulsões se deve principalmente ao uso de tensoativos na sua preparação, estes por sua vez apresentam natureza anfifílica cuja molécula contém grupamentos hidrofílicos e lipofílicos que se posicionam entre as duas fases da emulsão (aquosa e oleosa), originando uma película interfacial que diminui a tensão entre elas e estabiliza o sistema. O balanço entre as duas porções moleculares com características opostas é denominado EHL. Este apresenta um sistema de classificação dos tensoativos, tendo como base os parâmetros de solubilidade desses compostos em solventes polares e/ou apolares (GRIFFIN, 1949; LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986; PASQUALI; SACCO; BREGNI; GADHAVE, 2014).

Cada emulsão, em particular, possui um valor de EHL específico, que depende do óleo utilizado, da proporção dos componentes e ainda se esse óleo vai constituir a fase interna ou externa da emulsão. O valor de EHL_{req} para um óleo ou sistema oleoso é determinado por meio da preparação de uma série de emulsões com tensoativos apropriados em uma faixa de EHL (MORAIS et. al., 2008).

Uma vez que emulsões O/A apresentam aspecto menos oleoso e uma aplicação tópica mais agradável (SILVA; SOARES, 1996; COUTINHO; SANTOS, 2014) foi desenvolvida uma emulsão O/A pelo método de baixa energia.

De acordo com literatura as NEs podem ser obtidas utilizando de 1,5 a 10% de tensoativos, sendo mais apropriado o uso de menores concentrações devido ao poder irritativo à pele das altas concentrações destes (TEO et al., 2010; GIANETI et al., 2012). Assim, foram desenvolvidas neste trabalho emulsões constituídas de 5% de mistura de tensoativos.

Primeiramente, para determinação do valor de EHL do OL foram preparadas 12 emulsões nas concentrações de 10% de fase oleosa com o par de tensoativos, Span[®] 80 e Tween[®] 80, na faixa de EHL entre 4,3 e 15,0. Após 24h, foram avaliados a separação/cremeação e os aspectos macroscópicos das formulações.

As emulsões constituídas de valores de EHL de 4,3 a 9,0, como também, de 13,0 a 15,0, apresentaram intensa cremeação. Enquanto, as emulsões com valores de EHL de 10,0 11,0 e 12,0, apresentaram melhores características macroscópicas (cremeação leve) observadas após 24 horas de sua preparação no teste de

centrifugação. Assim, estes valores de EHL foram utilizados para continuidade dos estudos.

Em estudo realizado por Hosseini et al. (2015) foi verificado um valor de EHL de um OL em 11,7, utilizando 10% dos pares de tensoativos Tween[®]80 e Span[®]60. Rebouças (2019), verificou um valor de EHL de 12,0 utilizando como par de tensoativos um altamente hidrofílico (EHL 22,0) e outro altamente lipofílico (EHL 2,0).

5.4.2 Determinação do sistema tensoativo

Um dos principais fatores que controla o processo de emulsificação é a estrutura e a concentração de tensoativos e, conseqüentemente, a tensão interfacial do sistema, uma vez que o aumento na concentração de tensoativos geralmente provoca diminuição da tensão interfacial, promovendo emulsificação do sistema (BOUCHEMAL et. al., 2004). Segundo a literatura, é possível a obtenção de emulsões a partir de um único tensoativo, no entanto, emulsões mais estáveis são formadas pela combinação destes agentes, lipofílicos e hidrofílicos, uma vez que os mesmos podem adsorverem-se à interface O/A formando um filme interfacial coeso (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 1986; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1992; STORPIRTS, 1998).

Baseado nesses conceitos, para obter NEs estáveis utilizando OL foram propostos outros pares de tensoativos, utilizando como tensoativos lipofílicos o monooleato de sorbitano (Span[®]80/EHL=4,3) e o olivato de cetearilo (Olivem[®]1000/EHL=9,0), e como tensoativo hidrofílico o óleo de rícino hidrogenado 40 OE (Chremophor[®] RH 40/EHL=13,0) (Tabela 3). Os parâmetros observados na análise macroscópica foram a estabilidade física do sistema, bem como a presença de características relacionadas à NEs, como translucência e reflexo azulado (MORALES et. al., 2003; TADROS et. al., 2004).

Tabela 3 - Avaliação macroscópica das formulações com diferentes pares de tensoativos após 24h de preparo para determinação do sistema tensoativo.

Valor de EHL	(1) T_{MS}/T_{40OE} (% p/p)	(2) T_{OC}/T_{40OE} (% p/p)
10,0	N	SF
11,0	CL	SF
12,0	CI	SF

Legenda: T_{MS} = tensoativo monooleato de sorbitano; T_{OC} = tensoativo olivato de cetearilo; T_{40OE} = óleo de rícino hidrogenado 40 OE; N = normal, sem alteração; CL = cremeação leve; CI = cremeação intensa; SF = separação de fase. **Fonte:** O próprio autor.

Segundo os resultados obtidos (Tabela 3) o par de tensoativos (1) (T_{MS}/T_{40OE}) foi o que proporcionou maior estabilidade frente ao teste preliminar, o que sugere que a mistura dos dois tensoativos, favorece a formação de emulsões estáveis no valor de EHL de 10,0. Chamanai, Horn e McClements (2002), relataram que a estabilidade de uma emulsão frente à cremeação depende da composição do óleo, pois a densidade da gotícula deste depende do tipo e da concentração de moléculas apolares presentes na fase interna. Além disso, a taxa de transporte destas moléculas apolares através do filme interfacial da fase aquosa depende de sua solubilidade em água e, em função disso, o crescimento das gotículas por *Ostwald ripening* também será dependente da composição do óleo.

Sendo assim, o par de tensoativos (1) com valor de EHL 10,0 foi escolhido para os estudos subsequentes devido a maior estabilidade física observada após 24h do preparo, esse sistema tensoativo provavelmente favoreceu uma dispersão mais adequada da fase oleosa e uma menor tensão interfacial do sistema.

5.4.3 Obtenção e caracterização físico-química das NEs

O método de inversão de fases pela mudança da fração volumétrica é um método eficiente na produção de NEs e depende mais da razão entre a fase oleosa e emulsificantes do que da fase aquosa (FERNANDEZ et al., 2004). Baseado neste conceito, para se obter uma NE com tamanho de gotícula nanométrica, foi analisado a influência da quantidade de fase oleosa na formulação, utilizando concentrações de 5 e 10%. Os aspectos macroscópicos, diâmetro médio, potencial zeta e IP das NEs são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação macroscópica e microscópica das formulações de EHL 10,0 contendo 5 e 10% OL, com par de tensoativos SPA[®]80/ Chremophor[®]RH40.

Fase Oleosa (%)	Centrifugação ¹	Aspecto ²	Cor ³	Tamanho de partícula (nm)	IP ⁴	Potencial Zeta (mV)
5	+	FTA	LA	79,63	0,125	-26,1
10	+	FTA	LA	188,8	0,195	-29,1

Legenda: ¹(+) em conformidade; ²FTA: fluido translúcido azulado; ³LA: levemente amarelado; ⁴IP: índice de polidispersividade. **Fonte:** O próprio autor.

As amostras, macroscopicamente, apresentaram-se com aspecto translúcido de reflexo azulado e coloração levemente amarelada, características estas apresentadas em emulsões com tamanho de glóbulos diminutos (MORALES et al., 2003; TADROS et al., 2004). Além disso, o aspecto amarelado provavelmente se deve à coloração característica do OL obtido de semente dourada. Na Tabela 4, observa-se que ambas as formulações, ou seja, com maior ou menor concentração de fase oleosa apresentaram partículas na faixa nanométrica entre 20 e 200 nm (MARZUKI; WAHAD; HAMID, 2019). Devido a isso, as mesmas apresentaram, como relatado, aparência translúcida, uma vez que isso ocorre quando o tamanho do glóbulo é inferior a 200 nm, ou uma aparência leitosa quando o tamanho está entre 200 e 500 nm (FORGIARINI et al., 2001; CAPEK, 2004; SOLÉ et al., 2012).

Diversos fatores podem influenciar no grau de distribuição e o diâmetro médio de gotículas da NE, em especial, a seleção dos componentes, como os tensoativos e os óleos, a composição quantitativa das formulações e as condições experimentais utilizadas nas técnicas de preparação (BOUCHEMAL et al., 2004). As formulações contendo de 5 e 10% de OL (Figura 11) apresentaram distribuição monomodal das gotículas, indicando homogeneidade. Este fato pode ser devido a formação de uma estrutura bicontínua ou lamelar, quando a fase aquosa está sendo vertida na fase oleosa. Depois que essas estruturas passam do ponto de inversão decompõem-se em pequenos glóbulos de óleo, sendo essa decomposição facilitada pela baixa tensão interfacial do sistema no ponto de inversão de fases (FERNANDEZ et. al., 2004 SAFAYA; ROTLIWALA, 2020). Desta forma, a emulsificação é considerada a etapa de maior importância no processo de obtenção dos sistemas

nanoemulsionados, sendo que, uma dispersão insuficiente pode resultar em glóbulos grandes com ampla distribuição (MAINARDES; EVANGELISTA, 2005).

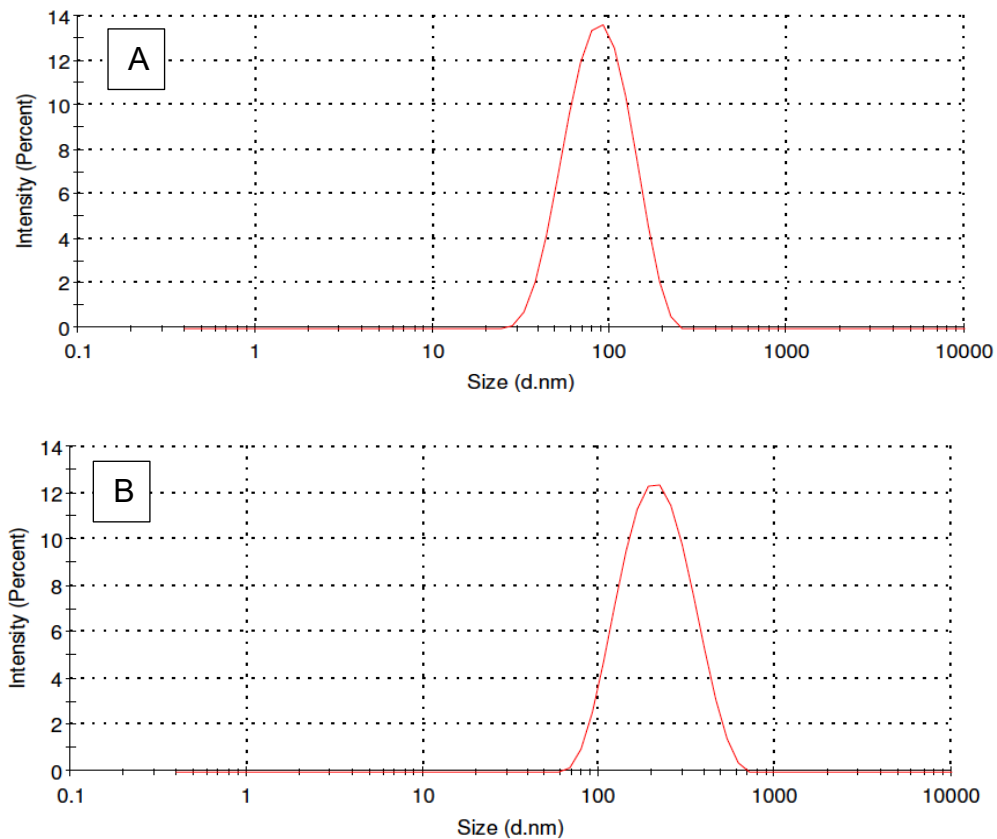
A literatura relata que a lipofilicidade do óleo e a concentração da fase oleosa em sistemas nanoemulsificantes do tipo O/A são diretamente proporcionais ao tamanho da NE (PORTER et al., 2004; GIANETI et al., 2012). No presente estudo foi verificado que a menor concentração de fase oleosa forneceu uma NE com tamanho médio de partícula inferior que a formulada com maior concentração. Resultados semelhantes foram obtidos por Camargo (2008) que relatou observar menores tamanhos de gotículas com menores proporções de fase oleosa.

É importante destacar que as partículas são suscetíveis às forças gravitacionais, independentemente de suas dimensões, mas é menos provável que a sedimentação das nanopartículas ocorra em comparação com as gotículas convencionais, uma vez que o movimento browniano de gotículas menores é maior do que a taxa de cremação induzida pela gravidade (HUANG; YU; RU, 2010; NORCINO et al., 2020). Isso está de acordo com a observação de que gotículas menores que 1 μm são normalmente cineticamente estáveis (YI et al., 2014). Portanto, nas NEs, devido ao pequeno tamanho de partícula e menor tensão superficial entre o óleo e a fase aquosa, dificilmente permite aglomeração ou precipitação e, dessa forma, reduz a possibilidade de formação de creme ou sedimentação (SUTRADHAR; AMIN, 2013). Isto auxilia a penetrar a barreira das membranas biológicas por alteração reversível do arranjo celular e melhorando a interação com as células após solubilização da barreira lipídica ou fusão da interface de dupla camada lipídica com a parede celular (BASPINAR; BORCHERT, 2012; RAI et al., 2018).

A distribuição granulométrica das partículas é uma maneira efetiva para estimar a estabilidade e o efeitos de emulsificação das NEs (LI et al., 2009). O IP é uma grandeza adimensional que revela a qualidade da dispersão de uma amostra, variando de valores de 0,1 até 1,0. Valores próximos de 1,0 são indicativos de amostras de baixa qualidade, o que significa a presença de glóbulos de tamanho coloidal de alta polidispersividade. Logo, baixos valores de polidispersão são indicativos de uma amostra de qualidade com alto grau de uniformidade no tamanho das partículas (JAFARI; HE; BHANDARI, 2007). Conforme Yilmaz e Borchert (2006), o IP deve ser menor que 0,25 devido à redução do fenômeno *Ostwald ripening*. As NEs obtidas com OL apresentaram IP menor que 0,2 (Tabela 4) e uma distribuição

monomodal (Figura 11), apresentando assim boa homogeneidade do tamanho das gotículas.

Figura 11 - Distribuição granulométrica da NE contendo (A) 5% e (B) 10% de FO.



Fonte: O próprio autor.

O potencial zeta reflete a composição da interface das NEs, seja em relação aos tensoativos formadores do filme interfacial ou em relação à presença de moléculas com carga localizadas na interface. A magnitude desse potencial permite uma avaliação da estabilidade das partículas em suspensão considerando que, se todas as partículas apresentam um valor altamente positivo ou altamente negativo desse potencial, elas irão se repelir evitando a agregação. No caso de valores de potencial zeta próximos à zero, a ausência de carga superficial pode favorecer, em alguns casos, interações entre partículas o que promove processos de floculação ou agregação. De forma geral, a fronteira entre suspensões estáveis e não estáveis é considerada como sendo o valor de potencial zeta de ± 30 mV (ROLAND et. al., 2003; WANG et al., 2006).

Dessa forma, podemos observar que as NEs desenvolvidas apresentaram altos valores negativos de potencial (Tabela 4), apresentando-se muito próximos do relatado como ideal para se obter repulsão eletrostática que promova estabilização da emulsão (MÜLLER; JACOBS; KAYSER, 2001; CLOGSTON; PATRI, 2011). NEs produzidas a partir de misturas de tensoativos não-iônicos apresentam potencial zeta negativo. A carga superficial negativa tem sido atribuída à adsorção de íons hidroxila na interface O/A. Esse mecanismo pode ser decorrente da formação de ligações de hidrogênio com os grupos etóxi da cadeia polietilênica, originando íons oxônio (HO; AHMAD, 1999; LIU et al., 2006; SANTOS et al., 2011).

Diante dos resultados obtidos, a NE contendo 5% de OL foi escolhida para ser aditivada de ECV uma vez que apresentou um menor tamanho de gotícula.

5.5 Caracterização Físico-Química das NEs Aditivadas de ECV

A NE obtida previamente foi acrescida de ECV em diferentes proporções (0,25, 0,5 e 1,0% p/p), conforme metodologia descrita no item 4.2.5.5. Após 24h do preparo, as NE aditivadas foram submetidas à centrifugação e avaliadas quanto aos aspectos macroscópicos, pH, condutividade elétrica, tamanho de partícula, IP, potencial zeta, morfologia e comportamento reológico.

Tabela 5 - Caracterização físico-química das NEs aditivadas e não de ECV.

Formulação	Centrifugação ¹	Aspecto ²	Cor ³	pH	Condutividade (μ S)	Tamanho de partícula (nm)	IP ⁴	Potencial Zeta (mV)
Base	+	FTA	LA	5,18 $\pm 0,06$	91,0 $\pm 1,41$	79,63 $\pm 36,60$	0,125	-26,1 $\pm 3,43$
0,25% ECV	+	FTA	MC	5,04 $\pm 0,03^*$	389,5 $\pm 0,71^*$	79,65 $\pm 32,50$	0,108	-29,2 $\pm 6,57^*$
0,5% ECV	+	FTA	MM	5,16 $\pm 0,02$	672,5 $\pm 3,54^*$	87,83 $\pm 55,94^*$	0,203	-35,6 $\pm 5,39^*$
1,0% ECV	+	FTA	MI	5,23 $\pm 0,15^*$	1235,0 $\pm 4,24^*$	82,20 $\pm 38,55^*$	0,176	-38,5 $\pm 4,56^*$

Legenda: ¹(+) em conformidade; ²FTA: fluido translúcido azulado; ³LA: levemente amarelado, MC: marrom claro, MM: marrom médio, MI: marro intenso; ⁴IP: índice de polidispersividade. *Diferença estatisticamente significativa em relação a NE BASE ($p < 0,05$). **Fonte:** O próprio autor.

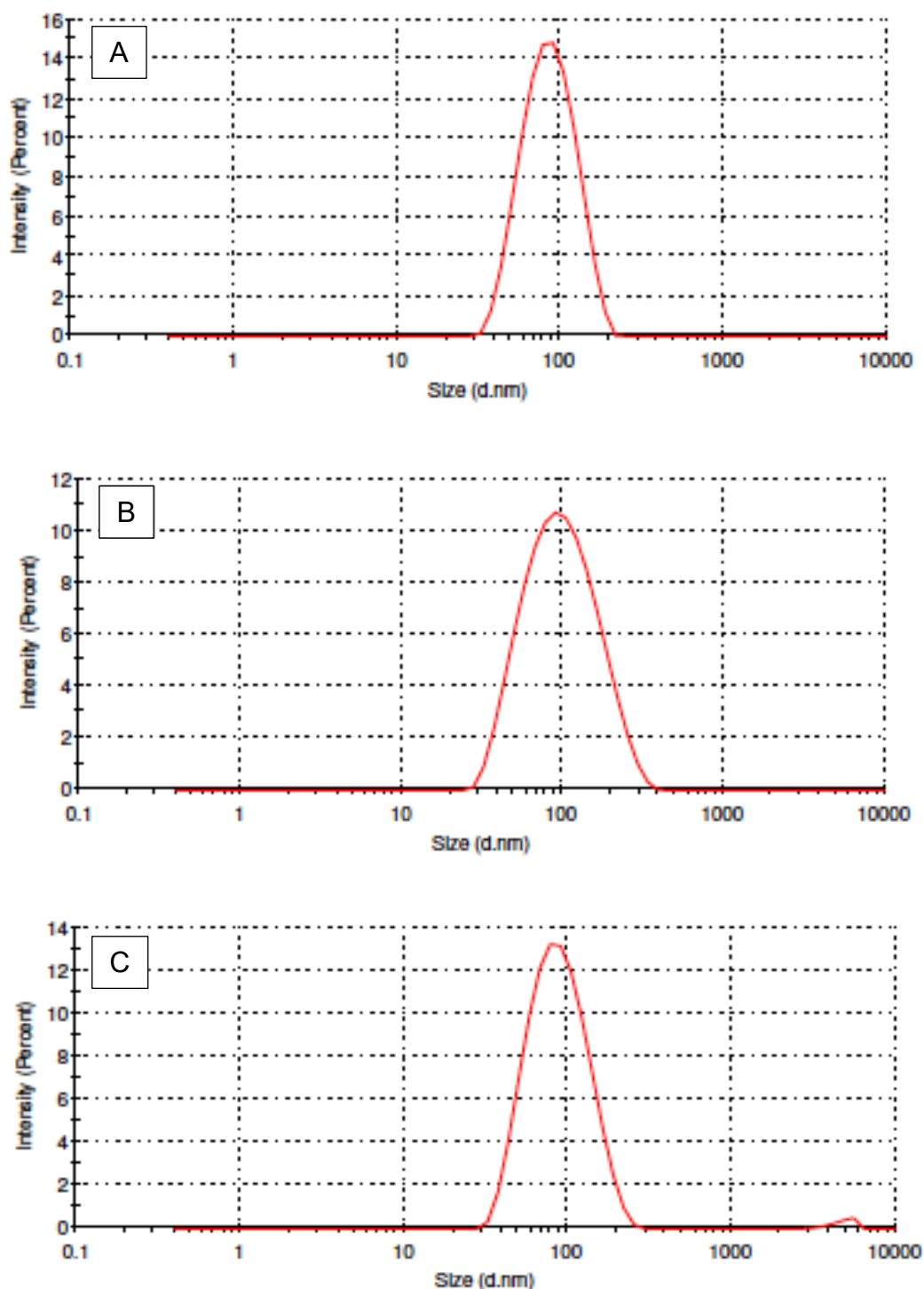
Todas as formulações, aditivadas ou não de ECV, apresentaram características típicas de NE, como fluidez, translucência e reflexo azulado (TADROS et al., 2004). Quanto à coloração das NEs, foi observado um aumento gradativo na intensidade da cor com o aumento da concentração adicionado de ECV (Tabela 5), uma vez que o mesmo apresenta coloração característica do café (SANTOS et al., 2017).

Além disso, foi realizado o teste de centrifugação com NEs aditivadas e não de ECV. A centrifugação aumenta as colisões entre os glóbulos acelerando assim a possível instabilidade, por isso, este teste prediz com rapidez a provável estabilidade do sistema (GEORGETTI et al., 2007; FERRARI; ROCHA-FILHO, 2011). Em formulações que apresentam alto IP, a centrifugação acelera o processo de cremação (CASTELI et al., 2008). Assim, pode-se verificar que a adição de ECV nas concentrações de 0,25 – 1,0% não promoveu instabilidade física da NE de OL frente ao teste de centrifugação (Tabela 5). Dessa forma, como todas apresentaram características macroscópicas satisfatórias foram utilizadas nos estudos subsequentes.

As NEs aditivadas com as diferentes concentrações de ECV permaneceram com apenas uma população de gotículas (Figura 12) e valores de $IP \leq 0,2$ (Tabela 5). Esses resultados indicam que a adição do ECV de 0,25 a 1,0% não alterou a distribuição do tamanho das gotículas mantendo-se uniforme, ou seja, todas as formulações demonstraram uma distribuição estreita de tamanho de partículas. Em adição, foi verificado que a concentração de 0,25% do ECV não conduziu a um aumento do tamanho de partícula, enquanto a adição de 0,5 e 1,0% levou a um pequeno aumento, contudo permanecendo em tamanho menores que 100 nm (Tabela 5), valores estes encontrados dentro da faixa proposta pela literatura (ACEVEDO-FANI; SOLIVA-FORTUNY; MARTÍN-BELLOSO, 2017; CHORADIYA; PATIL, 2021; MALODE et al., 2022; SAMPAIO et al., 2022).

A estabilidade inerente das NEs pode estar relacionada ao uso de tensoativos ou polímeros que proporcionam estabilização entre as partículas, reduzindo assim a possibilidade de coalescência. Assim, considerando os resultados obtidos, os processos de instabilidade das NEs foram evitados (FERNANDEZ et al., 2004; TADROS et al., 2004). Além disso, a espessura do filme interfacial, que está relacionado com o tamanho da partícula, evitou a ruptura da mesma (FORGIARINI et al., 2001; BOUCHEMAL et al., 2004; TADROS et al., 2004; SONNEVILLE-ABRUN; SIMONNET; L'ALLORET, 2004; IZQUIERDO et al., 2005).

Figura 12 - Distribuição granulométrica da NE contendo (A) 0,25%, (B) 0,5% e (C) 1,0% ECV.



Fonte: O próprio autor.

Vale ressaltar que o potencial zeta mede a estabilidade a longo prazo da NE, sendo que quando o valor em módulo é pequeno, a força de atração das partículas é maior podendo desestabilizar o sistema de dispersão coloidal através da floculação.

Como referência, a NE com um valor potencial zeta de ± 30 mV ou superior é indicativo de uma estabilidade promissora a longo prazo (JEONG; OH; KIM, 2001; ROLAND et al., 2003; COSTA et al., 2014b). Uma vez que o potencial zeta das NEs adicionadas de ECV foram -29,7 a -38,5 mV, indica que os sistemas se mostram cineticamente estáveis (Tabela 5). Nota-se que a distribuição do potencial zeta da NE base, como também, das adicionadas de ECV, foi detectada na zona de carga negativa, indicando a presença adequada de repulsão eletrostática de Van der Waals para estabilizar o sistema (ROMES et al., 2020).

Outro parâmetro capaz de avaliar a estabilidade das emulsões é a medida de condutividade, uma vez que a estabilização do sistema pode ser alcançada na presença de eletrólitos (MORAIS, 2008; ÇINAR, 2017). O café, por sua vez, contém em sua maioria sólidos solúveis, correspondendo a cerca de 30% de sua composição total (AGUIAR et al., 2005). Nota-se, portanto, que com o aumento da concentração de ECV nas formulações, a condutividade elétrica também aumentou. Segundo Morais (2008) e Çinar (2017), a adição de eletrólitos em soluções de tensoativos ou em emulsões pode provocar o fenômeno denominado *salting-out*. Em emulsões, este promove um rearranjo das moléculas de tensoativos nas interfaces O/A e A/O, que se modificam, tornando-se mais rígidas, formando então uma barreira mecânica, aumentando a estabilidade. Este fenômeno pode ser explicado como resultado de um rearranjo do filme interfacial. Com o aumento da concentração de eletrólitos as interfaces tornam-se mais condensadas. Contudo, dependendo da quantidade de eletrólito utilizado, o sistema pode se desestabilizar progressivamente, proporcionando a destruição dos glóbulos.

De acordo com Friberg, Goldsmith e Hilton (1988), a adição de eletrólitos à fase contínua de emulsões O/A provoca redução do potencial repulsivo da dupla camada elétrica, esta redução causa uma diminuição do potencial total de superfície dependendo da quantidade de eletrólitos adicionados, a altura da barreira energética é reduzida, perdendo-se assim a estabilidade do sistema. Neste estudo, foi observado que a adição do ECV às formulações promoveu uma maior estabilidade dos sistemas, indicado pelo aumento no valor de potencial zeta. Assim, os resultados sugerem que as NEs desenvolvidas podem permanecer estáveis por um longo período (MARQUES et al., 2018).

Em relação ao pH das NEs (Tabela 5), todas as formulações apresentaram pH próximos ao da pele (4,6 a 5,8), sendo então considerados valores adequados

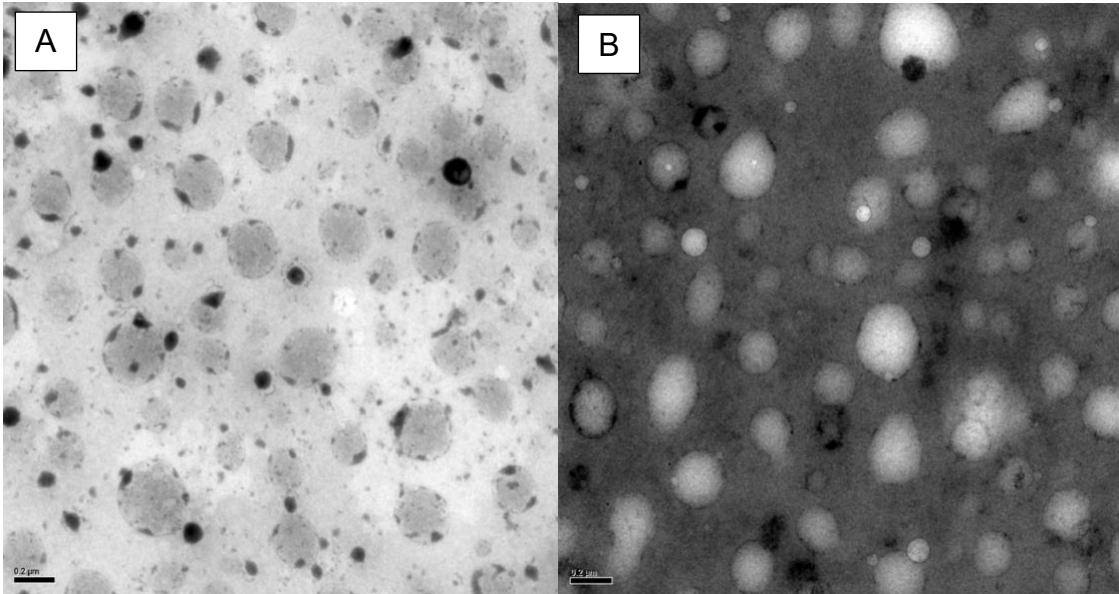
para formulações tópicas por garantir compatibilidade da pele em razão de irritabilidade, sustentar processos fisiológicos e contribuir para a proteção bactericida e fungicida em sua superfície (BORDAS, 2003; YILMAZ, 2016). Portanto, os valores de pH obtidos, tanto da NE base como das aditivadas com ECV, estão de acordo com a utilização destinada de produtos aplicados topicamente.

A avaliação da densidade em relação a adição de diferentes concentrações de ECV também foi analisada. Foi verificado que todas as formulações, NE base ($0,9244 \pm 0,006$ g/mL), 0,25% ($1,0007 \pm 0,002$ g/mL), 0,5% ($1,0018 \pm 0,003$ g/mL) e 1,0% ($1,0033 \pm 0,003$ g/mL) aditivadas de ECV possuem valores próximos do componente majoritário, resultados compatíveis com literatura (SILVA JR. et al., 2013; LYRA, 2019). As NEs contêm em sua composição maior conteúdo de água que possui densidade de aproximadamente 1,00 g/mL. Apesar de estarem em menor proporção, o surfactante Span[®]80 e o OL também possuem densidades próximas a 1, sendo 1,068 g/mL e 0,9244 g/mL, respectivamente.

A morfologia das NEs foi avaliada em MET que consiste em uma ferramenta para observação direta da estrutura de materiais atômicos, sendo considerada a técnica mais acurada dentre as existentes (SELBACH, 2017). Portanto, a MET tem sido utilizada para analisar e validar o tamanho e a morfologia das partículas (SINGH et al., 2017).

A caracterização qualitativa nanoscópica da morfologia das gotículas presentes por meio de MET, foi realizada na NE base e NE adicionada de ECV à 0,25%. A Figura 13 mostra as imagens morfológicas das NEs captadas.

Figura 13 - Imagem de microscopia eletrônica de transmissão, evidenciando a morfologia da NE (A) sem o ECV e (B) contendo 0,25% ECV. Escala 0,2 μm , aumento de 30.000x.



Fonte: O próprio autor.

As imagens sugerem que as gotículas apresentam formato esférico, e que a NE contendo ECV demonstrou morfologia semelhante a NE base, indicando que a adição do extrato nessa concentração não modificou a estrutura da NE. Além disso, é possível observar que as gotículas de óleo estão distribuídas uniformemente na fase contínua sem agregação das mesmas, o que implica que as cargas superficiais das partículas são suficientes para manter a repulsão entre elas, levando a uma emulsão estável (FRANZOL; REZENDE, 2015). Portanto, as imagens confirmam o tamanho nanométrico da fase dispersa interna, além de sua morfologia circular de uma nanogotícula.

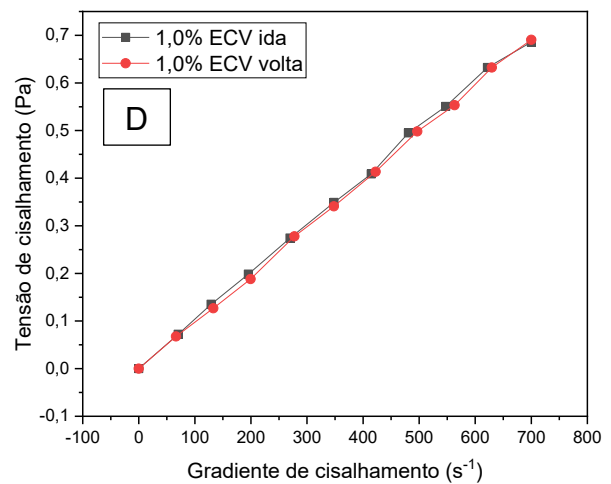
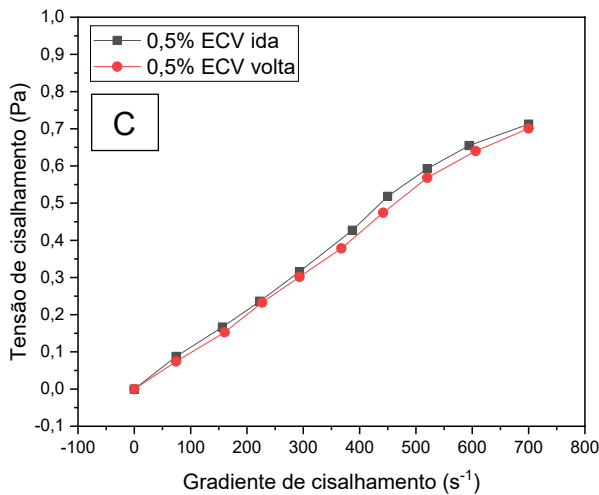
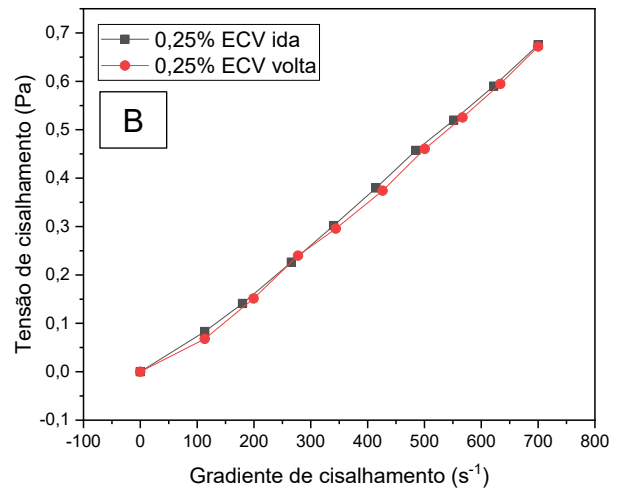
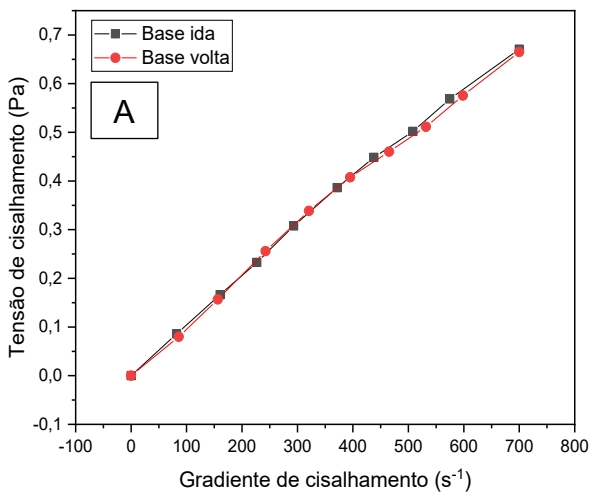
Se faz importante, também, avaliar o comportamento reológico das NEs, uma vez que estuda as propriedades de fluxo e a deformação da matéria (RAO, 2013; ZHANG; McCLEMENTS, 2018). A reologia de uma NE determinará, por exemplo, a sua capacidade para fluir através de um tubo, a eficiência dos processos de mistura e seus atributos sensoriais, como suavidade, cremosidade ou sensação. As propriedades reológicas das NEs podem variar consideravelmente dependendo de sua composição, interação e estrutura, variando de líquidos de baixa viscosidade a materiais semissólidos (ZHANG; McCLEMENTS, 2018).

Tabela 6 - Parâmetros do comportamento reológico das NEs aditivadas e não de ECV determinados pela Lei de Potência.

Formulação	Índice de fluxo	Índice de consistência (cP)
Base	0,9379	1,4
0,25% ECV	1,1235	0,4
0,5% ECV	0,9569	1,4
1,0% ECV	0,9460	1,4

Fonte: O próprio autor.

Figura 14 - Reogramas de tensão de cisalhamento em função do gradiente de cisalhamento das NEs (A) base, (B) 0,25%, (C) 0,5% e (D) 1,0% ECV.



Fonte: O próprio autor.

Conforme o modelo da Lei de Potência, quando o índice de fluxo (n) for igual a 1, o fluido é newtoniano (STEFFE, 1992). De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, as NEs base e aditivadas de ECV apresentaram valores muito próximos de $n = 1$, o que pode definir as NEs com um comportamento do tipo newtoniano. Um fluido newtoniano caracteriza-se por possuir viscosidade absoluta constante, independentemente da variação da taxa de deformação, como demonstrado na Figura 14, em que a relação entre a tensão de cisalhamento e o gradiente de cisalhamento é linear (COSTA; CAGNON; BATTAGLINI, 2010). Isso significa que para uma dada temperatura, a viscosidade das NEs permanece constante durante sua medição, independentemente do tempo e da taxa de cisalhamento empregada (SEIBERT, 2015).

Portanto, quanto mais próximo de 1, menor tendência à pseudoplastia de uma amostra (ALMEIDA, BAHIA, 2003; BRICEÑO, 2000), porém também é relevante considerar o perfil demonstrado pelas amostras, pois este se mostra um fator significativo. Assim, os valores encontrados de n bem próximos de 1, observados nas NEs base e aditivadas de extrato podem ser explicados devido a sua baixa viscosidade, demonstrando característica bastante fluída.

Segundo a literatura, as NEs são caracterizadas como líquido de reduzida viscosidade, apresentando geralmente um comportamento reológico do tipo newtoniano. Esse parâmetro é influenciado pela concentração de óleo da fase interna e pelo diâmetro de gotículas das formulações, nesse sentido em altas concentrações de fase interna a viscosidade da emulsão aumenta devido a aproximação das gotículas de óleo na fase contínua (ISHII; SASAKI; OGATA., 1990; SILVANDER et al., 2003). Os valores de viscosidade das NEs, representados pelo índice de consistência (k), foram equivalentes a 0,4 e 1,4 cP (Tabela 6), revelando um baixo índice. Sendo assim, as NEs aditivadas e não de ECV apresentaram baixa viscosidade, sendo que a concentração de 5% foi suficiente para manter um fluido do tipo newtoniano.

O mesmo comportamento foi observado em um estudo realizado por Seibert (2015), em que a NE desenvolvida apresentou valor de $n = 1$ e o k foi equivante a 2,91 cP. Rebouças (2019) em seu estudo encontrou valor de k igual a 1,2 cP para uma NE à base de ácido betulínico e óleo de linhaça. Valores estes próximos ao encontrado no presente estudo.

Sendo assim, considerando os resultados obtidos, pode-se inferir que a incorporação do ECV nas concentrações de 0,25 a 1,0%, não promoveu alterações significativas nas características físico-químicas avaliadas, proporcionando propriedades favoráveis para o uso dessas NEs quanto a aplicação cutânea.

5.6 Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais das NEs

O conteúdo total de polifenóis das NEs aditivadas com diferentes concentrações do ECV, foi determinado por meio da extração por partição das mesmas, e a quantificação foi realizada mediante equação da reta obtida pela curva padrão de ácido gálico. O resultado de polifenóis totais das NEs aditivadas foi comparado com o valor teórico do ECV livre nas mesmas concentrações para confirmar a presença dos mesmos, sendo o resultado expresso em % conteúdo total (Tabela 7).

Tabela 7 - Conteúdo de polifenóis totais das NEs aditivadas de ECV em diferentes concentrações, expressando os valores reais e teóricos em $\mu\text{g/g}$, e o conteúdo total em %.

Formulação	Polifenóis totais	Polifenóis	Conteúdo total (%)
	($\mu\text{g/g}$)	totais ($\mu\text{g/g}$)	
	Valor real	Valor teórico	
0,25% ECV	94,07 \pm 1,30	116,52	80,74
0,50% ECV	181,09 \pm 6,26	233,04	77,71
1,0% ECV	356,76 \pm 13,48	466,08	76,55

Fonte: O próprio autor.

Com base nos resultados obtidos, foi observado uma diminuição do teor de polifenóis totais das NEs quando comparado ao valor teórico contido no ECV adicionado nas mesmas. Por outro lado, não houve diferença estatística entre as NEs com as diferentes concentrações de ECV incorporado. Em estudo realizado por Gadkari e Balaraman (2015), verificou-se o conteúdo de polifenóis de uma NE aditivada de catequina extraída do chá verde, assim como, do próprio composto

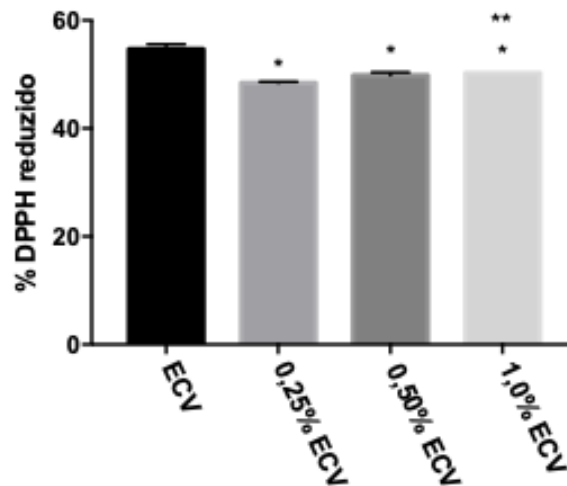
isolado, e também observaram diminuição no conteúdo de polifenóis no sistema nanoemulsionado. Segundo eles, essa redução pode ser devido à camada protetora de lipídios circundando o ativo que não estava facilmente disponível na reação. Além disso, componentes das NEs, como os tensoativos, podem interagir com os compostos fenólicos dificultando a disponibilidade de extração dos mesmos (COMUNIAN et al., 2017; CHANIOTI; KATSOULI; TZIA, 2021). Chaiittianan e Sripanidkulchai (2014) observaram esse comportamento em seus estudos, relatando que o perfil dos componentes fenólicos da NE desenvolvida com extrato de *Pyllanthus emblica* L. apresentou baixa disponibilidade quando comparado com o extrato livre em solução etanólica 50%, sugerindo que os compostos fenólicos interagem com os tensoativos por ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals*.

Contudo, ressalta-se que um alto valor de conteúdo de polifenóis totais, superior a 75%, foi encontrado nas NEs incorporadas de ECV, possibilitando que as mesmas possam desempenhar um potencial antioxidante.

5.7 Avaliação da Atividade Sequestradora do Radical Livre DPPH das NEs Aditivadas de ECV

Para a avaliar a atividade antioxidante das NEs aditivadas com diferentes concentrações de ECV foi utilizado o método de DPPH. O resultado foi expresso em % da redução do radical DPPH (Figura 15), sendo que as NEs, assim como o ECV livre foram diluídos de modo que atingissem 50% da capacidade antioxidante analisada anteriormente para o extrato.

Figura 15 - Atividade sequestradora do radical DPPH do ECV livre e das NEs aditivadas em diferentes concentrações. *Diferença estatisticamente significativa em comparação com ECV livre ($p < 0,05$) e **Diferença estatisticamente significativa em comparação NE aditiva.



Fonte: O próprio autor.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15 foi observado uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da capacidade sequestradora de radical livre do ECV adicionado às NEs nas três concentrações testadas em relação ao ECV livre. Esses resultados mostram uma concordância com os valores obtidos de polifenóis totais, uma vez que foi verificado nesse teste a diminuição de compostos fenólicos e, conseqüentemente, uma menor capacidade antioxidante nos sistemas nanoemulsionados. Contudo, os valores encontrados de $48,41 \pm 0,12\%$ (NE 0,25% ECV), de $49,82 \pm 0,31\%$ (NE 0,5% ECV) e de $50,22 \pm 0,1\%$ (NE 1,0% ECV) se mostraram adequados para aplicação tópica antioxidante.

Mazzarino et al. (2017) observaram em seus estudos que o conteúdo de compostos fenólicos totais das NE aditivas de extrato de jabuticaba e seu extrato livre apresentaram mesmo comportamento quanto a capacidade antioxidante, concluindo que a capacidade antioxidante do extrato livre e das NEs contendo o extrato está associada aos seus componentes fenólicos.

Portanto, os resultados corroboram com estudos nos quais encontraram um coeficiente de correlação positivo entre o conteúdo fenólico total e o ensaio de

DPPH de extratos de plantas (CAI et al.,2004; DJERIDANE et al., 2006; QUINTÃO et al., 2013).

5.8 Teste de Estabilidade Preliminar (Ciclo Gela-Degela)

O estudo de estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (ANVISA, 2004). Segundo Monografia da *International Federation of Societies of Cosmetic Chemists – IFSCC* o teste de estabilidade é considerado um procedimento preditivo, baseado em dados obtidos de produtos armazenados em condições que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer nas condições de mercado. Como em todo procedimento preditivo os resultados não são absolutos, mas têm probabilidade de sucesso.

A sequência sugerida de estudos (preliminares, acelerados e de prateleira) tem por objetivo avaliar a formulação em etapas, buscando indícios que levem a conclusões sobre sua estabilidade. O chamado teste de estabilidade preliminar tem como objetivo auxiliar e orientar na escolha das formulações, o desenvolvimento e inovação do produto, utilizando-se diferentes formulações de laboratório e com duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes e o surgimento de sinais que devem ser observados e analisados conforme as características específicas de cada tipo de produto. Devido às condições em que é conduzido, este tipo de teste não tem a finalidade de estimar a vida útil do produto, mas sim de auxiliar na triagem das formulações ao longo da produção, antes de atingir o produto final (ANVISA, 2004).

O emprego de condições extremas de temperatura, como programado para o teste do ciclo gela-degela, tem o propósito de aumentar a velocidade de degradação química e promover modificações físicas de substância e/ou alterações na forma farmacêutica ou cosmética, empregando condições drásticas de armazenamento (VELASCO et al., 2008). Sendo assim, as NEs aditivadas e não de ECV foram submetidas ao processo de ciclo gela-degela, e avaliadas quanto a sua estabilidade frente às condições extremas de temperatura (Tabela 8).

Tabela 8 - Resultados dos testes de estabilidade preliminar das NEs, aditivadas e não de ECV, submetidas ao processo de ciclo gela-degela.

Formulação	Centrifugação ¹	Aspecto ²	pH		Condutividade (μ S)		DPPH (%)	
			Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Base	+	I	5,16 $\pm 0,04$	5,15 $\pm 0,04$	83,87 $\pm 0,49$	81,97 $\pm 0,06^*$	-	-
0,25% ECV	+	I	5,03 $\pm 0,02$	5,03 $\pm 0,01$	403,38 $\pm 2,52$	404,33 $\pm 2,08$	39,38 $\pm 1,02$	34,61 $\pm 0,75^*$
0,5% ECV	+	I	5,06 $\pm 0,03$	5,02 $\pm 0,01$	683,00 $\pm 3,46$	709,67 $\pm 0,58^*$	43,54 $\pm 0,73$	36,73 $\pm 0,81^*$
1,0% ECV	+	I	5,13 $\pm 0,02$	5,10 $\pm 0,01$	1234,33 $\pm 4,93$	1310,0 $\pm 1,00^*$	45,70 $\pm 0,89$	43,96 $\pm 1,33$

Legenda: ¹(+): em conformidade; ²I: inalterado. *Diferença estatisticamente significativa em comparação com a medida inicial ($p < 0.05$). **Fonte:** O próprio autor.

As NEs submetidas ao teste preliminar de ciclo gela-degela mantiveram suas características organolépticas sem modificação de aspecto, cor e odor. Além disso, não foi evidenciado cremação ou separação de fase frente ao teste de centrifugação (Tabela 8). Entre os mecanismos de desestabilização, como floculação, coalescência, *Ostwald ripening* e cremação, o fenômeno de *Ostwald ripening* é o mecanismo dominante de desestabilização para NEs, no entanto, outros fenômenos podem ocorrer posteriormente, levando à separação das fases (BAZANA et al., 2019). Assim, a estabilidade física observada nas NEs provavelmente foi contribuída pela capacidade dos tensoativos não-iônicos, Cremophor[®]40 e Span[®]80, de criar uma barreira estérica na interface O/A, reduzindo a tendência de colisão de gotículas (ROMES et al., 2020).

O valor de pH é um parâmetro de monitoramento da estabilidade, pois alterações no seu valor indicam a ocorrência de reações químicas ou crescimento bacteriano, que podem comprometer a qualidade do produto final. No caso de emulsões formuladas com óleos vegetais, é natural que ocorra uma diminuição do pH em decorrência da hidrólise dos ésteres de ácidos graxos, que geram ácidos graxos livres. Estes por sua vez, reduzem o pH das formulações, sendo empregados

como indicadores de estabilidade frente a diferentes condições de armazenamento (BENITA; LEVY, 1993; TAMILVANAN et al., 2001).

As NEs, no entanto, não apresentaram alterações significativas de pH ($p > 0,05$) após serem submetidas ao ciclo gela-degela. Além disso, os valores de pH permaneceram dentro da escala compatível com o pH cutâneo (4,6 – 5,8) (BORDAS, 2003; YILMAZ, 2016). Em estudo realizado por Maruno (2009), em NEs formuladas com óleo de gergelim e framboesa, o pH diminuiu progressivamente para menos de 4,0, sugerindo a degradação química dos componentes como liberação de ácidos carboxílicos tanto da fase oleosa quanto do conjunto de tensoativos, uma vez que ambos são compostos de ácidos graxos.

No que diz respeito aos valores obtidos de condutividade elétrica, foi verificado que NE base e NE 0,25% permaneceram estáveis após o ciclo gela-degela, contudo, com as NEs aditivadas com maior concentração de extrato (0,5 e 1,0%) houve um aumento estatisticamente significativo nesse parâmetro (Tabela 8). Bernardi et al. (2011), observaram mudanças de condutividade nas NEs desenvolvidas, no entanto consideraram as amostras estáveis devido à ausência de sinais de desestabilização dos sistemas. É relatado que é difícil avaliar a estabilidade apenas usando condutividade, pois não há relação linear entre este parâmetro e o processo de instabilidade (RIBEIRO et al., 2015).

A localização dos compostos fenólicos em uma emulsão desempenha papel importante na determinação de sua estabilidade física e oxidativa. Por exemplo, moléculas hidrofóbicas de catequina e quercetina, que ficam localizadas nas fases oleosas ou interfacial, têm sido relatadas por exercerem uma maior capacidade antioxidante em emulsões de azeite do que as moléculas hidrofílicas de ácido gálico, que estão localizadas principalmente na fase aquosa (DI MATTIA et al., 2009). De acordo com a teoria do “paradoxo polar”, as moléculas hidrofílicas apresentam menor capacidade antioxidante em emulsões O/A, devido à sua menor afinidade para a interface, onde a taxa de oxidação é maior (LAGUERRE et al., 2015). Em adição, a eficiência antioxidante é altamente correlacionada as propriedades hidrofóbicas dos polifenóis (SOCRIER et al., 2019).

Diante disso, foi observado que a NE adicionada de maior quantidade de ECV (1,0%) não apresentou diferença na sua atividade antioxidante após o 6º ciclo de armazenamento (Tabela 8). Esses resultados, podem sugerir que uma maior concentração de ECV e, conseqüentemente, uma maior quantidade de polifenóis foi

capaz de manter o potencial antioxidante da NE. Uma vez que em menores quantidade de ECV, os polifenóis presentes podem ter interagido com os componentes da NE, como o óleo e os tensoativos, reduzindo assim sua capacidade antioxidante (CHENG et al., 2019).

Portanto, com base nisso, ressalta-se que a temperatura de armazenamento pode influenciar na capacidade antioxidante de extratos (GEORGETTI et al., 2007; CAMPANINI et al., 2013). Ademais, alterações nas características físicas das NEs também foram observadas em condições de estresse térmico (ŠEVCÍKOVÁ et al., 2011; RIBEIRO et al., 2015; FADHILA et al., 2019).

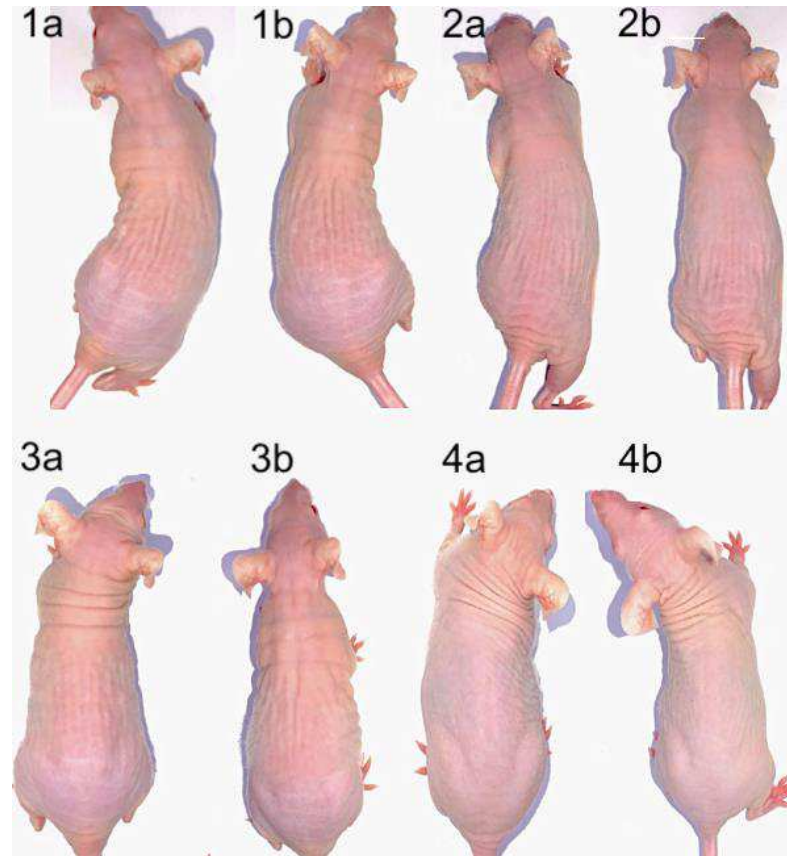
Considerando os resultados obtidos, foi conduzido a avaliação da capacidade protetora das NEs aditivadas e não de ECV contra danos oxidativos causados por RUVB em camundongos sem pelo. Contudo, anteriormente foi realizado uma análise do possível potencial de irritação das formulações para que uma aplicação tópica das mesmas fosse viável.

5.9 Teste de Irritação Aguda da Pele

A terapia convencional com produtos tópicos está associada a possível percepção de irritação na pele, o que restringe fortemente sua aplicabilidade e aceitabilidade pelos pacientes (HAN et al., 2012). Nesse contexto, avaliar o potencial irritante de substâncias e produtos cosméticos é extremamente necessário para garantir a eficácia e segurança aos consumidores (ANVISA, 2004). Portanto, o teste de irritação da pele foi realizado para confirmar a segurança das NEs adicionadas e não de ECV.

No que se refere a análise macroscópica das peles de camundongos tratadas com NEs aditivadas e não de ECV demonstradas na Figura 16, revelou que os componentes e as concentrações utilizadas no preparo das NEs são consideradas seguras, uma vez que não apresentaram sinais de irritação, vermelhidão, inchaço, inflamação ou quaisquer outras alterações incomuns na pele, ou seja, a aparência da pele dos camundongos se manteve inalterada em todos os tempos. Os resultados demonstraram uma boa tolerabilidade da pele em relação a aplicação tópica de todas as NEs desenvolvidas, indicando a possibilidade de uso tópico das mesmas.

Figura 16 - Imagens do teste de irritação aguda em camundongos tratados com a NE (1) sem ECV, (2) com 0,25%, (3) com 0,5% e (4) com 1,0% ECV; (a) imediatamente após a aplicação das NEs e (b) 72h após aplicação.



Fonte: O próprio autor.

5.10 Avaliação da Eficácia Antioxidante *In Vivo*

Antioxidantes de origem vegetal são apresentados como alternativas para gerenciar e evitar distúrbios oxidativos e mediados pelo estresse, dentre eles os originados na pele (AFAQ; MUKTHAR, 2006; CAMPANINI et al., 2013; FONSECA et al., 2011; CUELHO et al., 2018; MELO et al., 2021). Como a pele é a principal barreira à radiação solar, ela é profundamente afetada pelos efeitos nocivos da radiação solar, sendo os raios UVB de grande importância (ICHIHASHI et al., 2003). As duas consequências fundamentais da exposição à RUVB são o desenvolvimento de processo inflamatório mediado por uma superprodução de EROs e a depleção de antioxidantes endógenos. Além disso, o acúmulo de lesões por exposição prolongada à RUVB mostrou ser uma causa de câncer de pele e envelhecimento prematuro da pele (AFAQ; ADHAMI; MUKTAR, 2005). Ainda, é descrito que o uso de protetores solares não é totalmente eficaz contra a

RUVB, pois pode promover ainda mais a geração de EROs e causar reações alérgicas (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006; HEURUNG; RAJU; WARSHAW, 2014). Hanson, Gratton e Bardeen (2006), verificaram que quantidade de EROs induzidas por UV (20 mJ/cm²) geradas na epiderme nucleada são dependentes do tempo em que os filtros químicos, octocrileno, octilmetoxicinamato ou benzofenona-3, permaneceram na superfície da pele. Imagens de fluorescência de dois fótons mostraram que após 20 min. da aplicação de cada filtro UV na superfície da pele, o número de EROs geradas aumentou, embora permanecesse abaixo do número gerado no controle. Já, por tempo de 60 min., os filtros geraram EROs acima do controle. Os dados mostraram que quando todos os três filtros UV penetraram nas camadas nucleadas, os níveis de EROs aumentaram acima do produzido naturalmente pela epiderme sob iluminação UV.

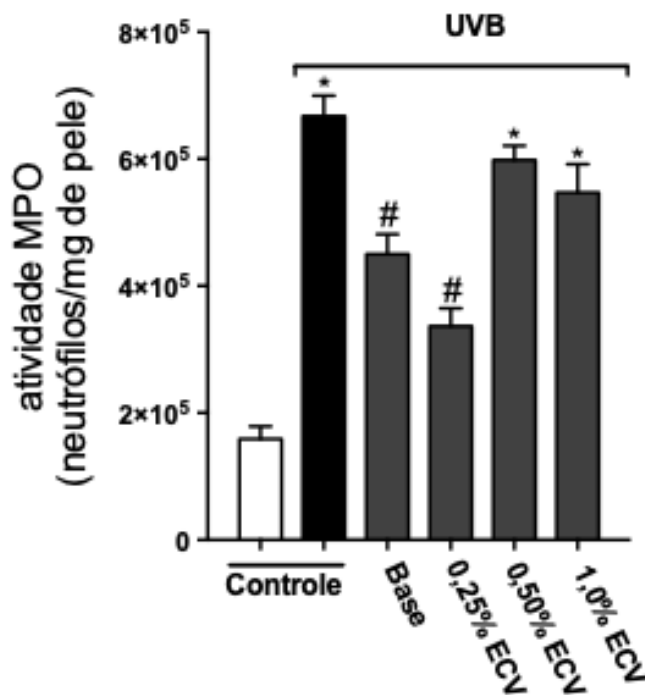
Embora bem estabelecido na literatura as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas da linhaça e do café, ainda não foi relatado na literatura evidências científicas do efeito terapêutico dos mesmos incorporados em uma NE O/A na inibição do processo oxidativo induzido pela RUVB.

A atividade da enzima MPO representa um teste indireto de recrutamento de neutrófilos para o local da lesão após RUVB (IVAN et al., 2014; CAMPANINI et al., 2013). A exposição excessiva à RUVB promove síntese de citocinas que recrutam neutrófilos e mediam a ação de suas enzimas metaloproteinases e MPO, enzimas estas associadas à degradação de fibras de colágeno e produção adicional de EROs, respectivamente (NAVARRO et al., 2006; ABBAS et al., 2016; MICHALAK et al., 2018).

Na Figura 17 pode-se verificar que a exposição a RUVB induziu um aumento expressivo da atividade da MPO de 4 vezes nos animais irradiados e não tratados em relação ao controle, que não sofreu exposição à radiação. Em adição, foi observado que o tratamento com as NEs Base e 0,25% ECV promoveu inibição significativa da atividade da MPO de 32 e 49%, respectivamente, comparado ao grupo irradiado e não tratado. Apesar da NE adicionada de 0,25% ECV apresentar uma maior capacidade em diminuir a migração leucocitária, avaliada pela atividade da MPO, esta não se mostrou estatisticamente significativa em relação a NE base. Em adição, apesar de verificar uma diminuição na atividade da MPO das NEs com maior conteúdo de extrato, estas

não se apresentaram com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle irradiado.

Figura 17 - Avaliação da atividade da MPO induzida pela RUVB. A inflamação da pele foi determinada em amostras coletadas 12h após o término da irradiação. As barras representam as médias \pm SEM de 6 camundongos por grupo e são representativas de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguido do teste de Tukey [\bullet $p < 0,05$ em relação ao grupo não irradiado (barra branca); $\#p < 0,05$ em relação ao grupo irradiado (barra preta)].



Fonte: O próprio autor.

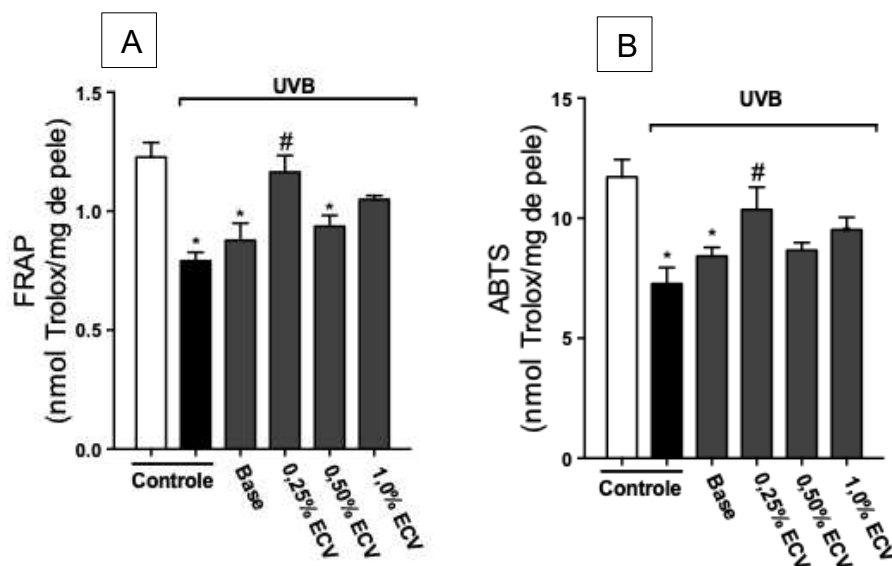
No que se refere ao potencial antioxidante, somente a NE 0,25% ECV apresentou uma resposta significativa em inibir a depleção da capacidade antioxidante da pele medido pelos ensaios FRAP e ABTS (Figura 18). Nestes ensaios não foi verificada atividade antioxidante da NE base, como também, das NEs aditivadas com 0,5 e 1,0% de ECV.

De acordo com resultados relatados por Ivan et al. (2014) e Martinez et al. (2015) de ensaios FRAP e ABTS *in vivo*, foi verificado que a RUVB levou à depleção da atividade antioxidante natural da pele, uma vez que as amostras

irradiadas demonstraram capacidade antioxidante significativamente menor do que as amostras não irradiadas por ambos os métodos.

Em adição, é relatado que o ensaio ABTS corresponde eficientemente com os níveis endógenos de glutathiona, enquanto o ensaio FRAP reproduziu com precisão os níveis plasmáticos de ácido ascórbico, ácido úrico e α -tocoferol (KATALINIC et al., 2005).

Figura 18 - Avaliação da capacidade antioxidante pelo ensaio de (A) FRAP e (B) ABTS. O potencial antioxidante foi determinado em amostras coletadas após 12h de irradiação. As barras representam as médias \pm SEM de 6 camundongos por grupo e são representativas de dois experimentos separados. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do teste de Tukey [$*p < 0,05$ em relação ao grupo não irradiado (barra branca); $\#p < 0,05$ em relação ao grupo irradiado (barra preta)].



Fonte: O próprio autor.

Os resultados encontrados na avaliação anti-inflamatória e antioxidante das NEs aditivadas e não de ECV, mostraram que as NEs contendo concentrações maiores (0,5 e 1,0%) de ECV não apresentaram respostas significativas quanto aos efeitos terapêuticos avaliados.

Com relação a inibição significativa do processo inflamatório promovida pela NE base, pode se sugerir que a presença dos ácidos graxos, ômega 3 e 6, proporcionaram uma capacidade anti-inflamatória efetiva na pele (PETROVIC et

al., 2012; BARABINO et al., 2003; RASHID et al., 2008; BABOOTA et al., 2012; SGRIGNOLI et al., 2013; PIORNOS et al., 2017).

Para que os compostos fenólicos sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixas concentrações, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir a auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS; MULLER; PAGANGA, 1996). Os resultados mostraram que a NE em menor concentração (0,25% ECV) apresentou maior capacidade de inibição de estresse oxidativo *in vivo* gerado na pele pela RUVB em camundongos sem pelo. Enquanto, em NEs contendo concentrações maiores de ECV (0,5 e 1,0%), esse efeito não foi observado, o que pode sugerir que concentrações superiores a 0,25% adicionado na NE desenvolvida com OL como fase interna de ECV pode causar efeito pró-oxidante. Contudo, permanecem abaixo dos níveis apresentados nos controles irradiados e não tratados.

Em estudo realizado por Di Mattia et al. (2009), foi avaliado a capacidade antioxidante de emulsões contendo diferentes concentrações de compostos fenólicos, e verificou que as emulsões contendo menores concentrações desses compostos apresentaram maior capacidade antioxidante, assim como observado neste estudo.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos foi possível desenvolver uma NE estável com potencial efeito terapêutico contra os danos oxidativos provocados pela RUVB. O valor de EHL_{req} para o OL foi 10,0, utilizando como par de tensoativos o SPAN®80 e Chremophor®RH40. A NE contendo 5% de OL foi a que apresentou menor tamanho de gotícula, sendo esta escolhida para ser aditivada de ECV.

As NEs aditivadas de diferentes concentrações de ECV apresentaram características típicas de NE, como fluidez, translucência e reflexo azulado. Quanto aos valores de tamanho de partícula, IP e potencial zeta, todas apresentaram tamanho de partícula <200 nm e distribuição monomodal, além de se mostrarem cineticamente estáveis. O valor de pH das NEs aditivadas e não de ECV apresentaram pH compatível com a da pele, e a condutividade mostrou que a adição do extrato nas NEs não provocou desestabilização do sistema. Em relação a

morfologia das NEs, as imagens demonstraram gotículas de formato esférico e distribuição uniforme das partículas na fase contínua da NE, além disso, a adição de 0,25% ECV não modificou a estrutura do sistema quando comparada com a NE sem ECV. Em adição, as NEs apresentaram comportamento reológico do tipo newtoniano.

O conteúdo de polifenóis totais e atividade antioxidante por DPPH das NEs contendo ECV apresentaram correlação positiva em seus resultados, uma vez que em ambos os ensaios foi observado uma diminuição no conteúdo fenólico e, conseqüentemente, uma menor capacidade antioxidante. Essa redução sugere que os componentes das NEs possam interagir por forças intermoleculares com os compostos fenólicos diminuindo sua disponibilidade.

Os resultados do teste preliminar mostraram que as NEs aditivadas e não de ECV mantiveram suas características organolépticas após estresse térmico, além disso não foi observado separação de fase pelo teste de centrifugação. Os valores de pH também permaneceram na faixa recomendada para a pele. No entanto, no que se refere a capacidade antioxidante do extrato aditivadas às NEs, foi verificado uma diminuição nos seus valores indicando uma possível influência da temperatura de armazenamento na atividade antioxidante do ECV.

Em relação ao teste de irritação aguda da pele, todas as NEs foram consideradas seguras para uso tópico, uma vez que não foi observado nenhum sinal de alteração na pele dos camundongos.

Por fim, os ensaios *in vivo* demonstram que a NE 0,25% ECV apresentou maior potencial anti-inflamatório e antioxidante na pele. Além disso, na avaliação da atividade da MPO, foi observado inibição significativa do processo inflamatório para a NE base, sugerindo que a presença de ácidos graxos do OL proporcionou atividade anti-inflamatório na pele. Contudo, foi verificado que as NEs em maiores concentrações de ECV (0,5 e 1,0%) não apresentaram efeito terapêutico significativo após exposição da pele a RUVB.

Portanto, os resultados permitem sinalizar que a administração tópica de ECV adicionado em NE contendo OL como fase oleosa demonstra ser uma abordagem promissora para proteger a pele dos efeitos deletérios da RUVB, contudo esses resultados também indicam a importância de mais estudos elucidando um possível papel desse produto em danos fotooxidativos na pele.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, S.; ALAM, S.; PAL, A.; KUMAR, M.; SINGH, D.; ANSARI, K. M. UVB exposure enhanced benzathrone-induced inflammatory responses in SKH-1 mouse skin by activating the expression of COX-2 and iNOS through MAP kinases/NF- κ B/ap-1 signaling pathways. **Food Chem. Toxicol.**, v.96, p.183-190, 2016.

ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G. F. A.; DUARTE, S. M. da S.; LIMA, A. R. L.; ALVARENGA, D. J.; FERREIRA, E. B. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciênc. Agrotec.**, v.34, n.2, p.414-420, 2010.

ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanoemulsion as edible coatings. **Current Opinion in Food Science**, v.15, p.43-49, 2017.

AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutar. Res. – Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v.571, p.153-173, 2005.

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Exp. Dermatol.**, v.15, n.5, p.678-84, 2006.

AFAQ, F.; SYED, D. N.; MALIK, A.; HADI, N.; SARFARAZ, S.; KWEON, M. H.; KHAN, N.; ZAID, M. A.; MUKHTAR, H. Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis. **J. Invest. Dermatol.**, v.127, n.1, p.222-232, 2007.

AFFONSO, R. C. L.; VOYTENA, A. P. L.; FANAN, S.; PITZ, H.; COELHO, D. S.; HORSTMANN, A. L.; PEREIRA, A.; UARROTA, V. G.; HILLMANN, M. C.; VARELA, L. A. C.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, M. Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, and the Effect of the Aqueous Extract of Coffee (*Coffea arabica* L.) Bean Residual Press Cake on the Skin Wound Healing. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, 2016.

AFONSO, F. F.; SILVA, L. C. R.; SEBASTIÃO, A.; GALVÃO, F. Floristic Evolution in an agroforestry system cultivation in Southern Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, n.2, p.973-982, 2016.

AFORNALI, A; LORENCINI, M. Nanoemulsions to Prevent Photoaging. **Nanoscience in Dermatology**. Brazil: Elsevier, 2016. p.237-246.

AGOSTINHO, L. C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*, L) e café verde (*Coffea arabica*, L)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p.103. 2017.

AGUIAR, A. T. da E.; FAZUOLI, L. C.; SALVA, T. de J. G.; FAVARIN, J. L. Diversidade química de cafeeiros na espécie *Coffea canephora*. **Bragantia**, v.64, n.4, 2005.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicação na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, p.96, 2003.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v.33, v.10, 2010

ALVES, N. C. Penetration of actives on the skin: a literature review. **Revista Amazônia Science & Health**, v.3, n.4., p.36-43, 2015.

ALVES, G. de A. D.; SOUZA, R. O. de; ROGEZ, H.; MASAKI, H.; FONSECA, M. J. V. *Cecropia obtusa*, an Amazonian ethanolic extract, exhibits photochemoprotective effect in vitro and balances the redox cellular state in response to UV radiation. **Industrial Crops and Products**, v.94, p.893-902, 2016.

AL-SAKKAF, M. K.; ONAIZI, S. A. Rheology, characteristics, stability, and pH-responsiveness of biosurfactant-stabilized crude oil/water nanoemulsions. **Fuel**, v.307, p.1-13, 2022.

AMIRALIAN, L.; FERNANDES, C. R. Cremes e Loções. **Cosmetics & Toiletries**, v. 30, p.36-38, 2018.

ANANTH, D. A.; DEVIRAM, G.; MAHALAKSHMI, V.; SIVASUDHA, T.; TIETEL, Z. Phytochemical composition and antioxidant characteristics of traditional cold pressed seed oils in South India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.17, p.416-421, 2019.

ANANTHASWAMY, H. N.; PIERCEALL, W. E. Yearly Review Molecular Mechanisms of Ultraviolet. **Photochemistry and Photobiology**, v.52, n.6, p.1119–1136, 1990.

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

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nanoemulsification. **Int. J. Pharm.**, v.377, p.142-147, 2009.

ANTONIASSI, R. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS E GORDURAS. **Boletim Do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.19, n.2, 2001.

ANDRADE, P. de M. M.; RIBEIRO, B. G.; CARMO, M. das G. T. do. Suplementação de ácidos graxos ômega 3 em atletas de competição: impacto nos mediadores bioquímicos relacionados com o metabolismo lipídico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.12, n.6, p.339-344, 2006.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 2004. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf/view>. Acesso em: 01 dez. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. **Resolução-RDC Nº 270, DE SETEMBRO DE 2005.** Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0270_22_09_2005.html. Acesso em: 01 dez. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira 6ª Edição Volume I.** Brasília: ANVISA, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 01 dez. 2021.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos 1ª Edição.** Brasília: ANVISA, 2004. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+de+Estabilidade+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/49cdf34c-b697-4af3-8647-dcb600f753e2>. Acesso em: 01 dez. 2021.

AOCS, American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of AOCS.** 6.ed. Champaign: AOCS, 2009.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practice case. **Trends in Food Science & Technology**, n.11, p.419-421, 2000.

AROKIYARAJ, S.; ARASU, M. V.; VINCENT, S.; PRAKASH, N. U.; CHOI, S. H.; OH, Y.-K.; CHOI, K. C.; KIM, K. H. Rapid green synthesis of silver nanoparticles from *Chrysanthemum indicum* L and its antibacterial and cytotoxic effects: and in vitro study. **Int. J. Nanomedicine**, v.2014 n.9, p.379-388, 2014.

ARTECHE-GARCÍA, A. Y. **Fitoterapia: Vademecum de prescripción.** 2.ed. Barcelona: Cita S. A. 1994.

BABOOTA, S.; RAHMAN, M. U.; KUMAR, A.; SHARMA, S.; SAHNI, J.; ALI, J. Submicron Size Formulation of Linseed Oil Containing Omega-3 Fatty Acid for Topical Delivery. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.33, p.1259-1266, 2012.

BACCARIN, T.; LEMOS-SENNA, E. Pomegranate Seed Oil Nanoemulsions Encapsulating Pomegranate Peel Polyphenol-Rich Ethyl Acetate Fraction: Development and Antioxidant Assessment. **Journal of Nanopharmaceutics and Drug Delivery**, v.2, n.4, p.333-343, 2014.

BALATA, G. F.; SHAMARDL, A. E.-M.; ELMONEIM, A.; HAKAMI, A. A.; ALMODHWAHI, M. A. Propolis emulgel: A natural remedy for burn and wound. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p.1797-1808, 2018.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta : recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An. Bras. Dermatol.*, v. 84, n.4, p. 732–742, 2011.

BARABINO, S.; ROLANDO, M.; CAMICIONE, P.; RAVERA, G.; ZANARDI, S.; GIUFFRIDA, S.; CALABRIA, G. Systemic Linoleic and γ -Linolenic Acid Therapy in Dry Eye Syndrome With an Inflammatory Component. **Cornea**, v.22, n.2, p.97–101, 2003.

BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**, v.13, n.1., 2012.

BASPINAR, Y.; BORCHET, H. H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions - Is there a benefit of the positive charge?. **Int. J. Pharm.**, v.430, p.247–252, 2012.

BAZANA, M. T.; SILVA, S. S. da; CODEVILLA, C. F.; DEUS, C. de; LUCAS, B. N.; UGALDE, G. A.; MAZUTTI, M. A.; FLORES, E. M. M.; BARIN, J. S.; SILVA, C. de B. da; MENEZES, C. R. de. Development of nanoemulsions containing *Physalis peruviana* calyx extract: A study on stability and antioxidant capacity. **Food Research International**, v.125, 2019.

BECHER, P. **Emulsions: theory and practice**. Ed.3. New York: Oxford University Press, 2001.

BELGUIDOUM, K.; AMIRA-GUEBAILIA, H.; BOULMOKH, Y.; HOUACHE, O. HPLC coupled to UV-vis detection for quantitative determination of phenolic compounds and caffeine in different brands of coffee in the Algerian market. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.45, n.4, 1314-1320, 2014.

BLUME-PEYTAVI, U.; MASSOUDY, L.; PATZELT, A.; LADEMANN, J.; DIETZ, E.; RAZULEV, U.; GARCIA BARTELS, N. Follicular and percutaneous penetration pathways of topically applied minoxidil foam. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.76, n.3, p.450-453, 2010.

BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1-15, 2014.

BENITA, S.; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.82, n.11, p.1069-1079, 1993.

BORDAS O. X. Tratamiento tópico de la psoriasis. Revisión de publicaciones recientes. **Piel**, v.18, n.9, p.509–514, 2003.

BORDIGNON, B. C. S. **RELAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO COM A QUALIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DE CULTIVARES DE SOJA**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, p.90, 2009.

BORRIN, T. R.; GEORGES, E. L.; MORAES, I. C. F.; PINHO S. C. Curcumin-loaded nanoemulsions produced by the emulsion inversion point (EIP) method: An evaluation of process parameters and physico-chemical stability. **Journal of Food Engineering**, v.169, p.1-9, 2016.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nanoemulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 280, p. 241-251, 2004.

BOULAIZ, H.; ALVAREZ, P. J.; RAMIREZ, A.; MARCHAL, J. A.; PRADOS, J.; RODRIGUEZSERRANO, F.; PÉLAN, M.; MELGUIZO, C.; ARANEGA, A. Nanomedicine: application areas and development prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.5, p.3303-3321, 2011.

BOWDEN, G. T. Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signaling. **Nature Reviews Cancer**, v.4, n.1, p.23–35, 2004.

BRAND, R. M.; WIPF, P.; DURHAM, A.; EPPERLY, M. W.; GREENBERGER, J. S.; FALO JR, L. D. Targeting mitochondrial oxidative stress to mitigate UV-induced skin damage. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, p.1–10, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira 2ª Edição**. Brasília: ANVISA, 2012. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259372/FNFB+2 Revisao 2 COFAR s etembro 2012 atual.pdf/20eb2969-57a9-46e2-8c3b-6d79dccb0741](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259372/FNFB+2+Revisao+2+COFAR+s+etembro+2012+atual.pdf/20eb2969-57a9-46e2-8c3b-6d79dccb0741). Acesso em: 03 dez. 2021.

BREM, R.; GUVEN, M.; KARRAN, P. Oxidatively-generated damage to DNA and proteins mediated by photosensitized UVA. **Free Radical Biology and Medicine**, v.107,p.101–109, 2017.

BREZOVÁ, V.; SLEBODOVÁ, A.; STASKO, A. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. **Food Chemistry**, v.114, n.3, p.859-868, 2009.

BRICEÑO, M. I. **Pharmaceutical Emulsion and suspension**: Rheology of suspensions and emulsions. 1.ed. New York. p. 5557-5608. 2000.

BRODIN, A. F.; KAVALIUNAS, P. R.; FRANK, S. G. Prolonged drug release from multiple emulsions. **Acta Pharmaceutica Suecica**, v.15, n.1, p.111-118, 1978.

BROOKS, B. W.; RICHMOND, H. N.; ZERFA, M. Phase inversion and drop formation in agitated liquid-liquid dispersions in the presence of nonionic surfactants. *In*: BINKS, B. P. **Modern Aspects of Emulsion Science**, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1998. p.175-203.

CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J.-L.; MASCIO P. D. Sensitized formation of oxidatively generated damage to cellular DNA by UVA radiation. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.8, n.7, p.903-911, 2009.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 Chinese medicinal plants associates with anticancer. **Life Sci.**, v.74, p.2157-2184, 2004.

CAMARGO, M. F. P. de. **Desenvolvimento de nanoemulsão a base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica**. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p. 99. 2008.

CAMBRUSSI, A. A. C. O.; CONCEIÇÃO, I. D. da; FREITAS, A. R.; SANTOS, P. S. dos; SOUSA, R. R. M.; EIRAS, C.; RIBEIRO, A. B. The role of nanotechnology in reducing oxidative stress: a review. **Informative Geum Bulletin**, v.9, n.2, p.1-11, 2018.

CAMPANINI, M. Z.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; IVAN, A. L.; FERREIRA, V. S.; VILELA, F. M. P.; VICENTINI, F. T. M. C.; MARTINEZ, R. M.; ZARPELON, A. C.; FONSECA, M. J. V.; FARIA, T. J.; BARACAT, M. M.; VERRI JR, W. A.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Efficacy of topical formulations containing *Pimenta pseudocaryophyllus* extract against UVB-induced oxidative stress and inflammation in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.127, p.153–160, 2013.

CAMPOS, P .M. B. G. M.; GILLIAN, M. Vitamin A skin penetration. **Cosmet. Toil. (Ed. port.)**, v.113, p.69-72,1998.

CAPEK, I. Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid Interfacial Science**, v.107, p.125-155, 2004.

CARDOSO, L. G. V.; BARCELOS, M. F. P.; OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, J. A. R.; ABREU, W. C.; PIMENTEL, F. A.; CARDOSO, M. G.; PEREIRA, M. C. A. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31. n.1, p.127-136, 2010.

CARINI, M.; ALDINI, G.; PICCONE, M.; FACINO, R. M. Fluorescent probes as markers of oxidative stress in keratinocyte cell lines following UVB exposure. **Farmaco**, v.55, p.526–534, 2000.

CARNEIRO, H. C. F.; TONON, R. V.; GROSSO, C. R. F.; HUBINGER, M. D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v.115, n.4, p.443–451, 2013.

CARVALHO, A. C. de O.. **CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS PUROS E ADULTERADOS**. Monografia (Especialização em Química Licenciatura em Química) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, p.79, 2017.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; DORTA, D. J.; SANTOS, A. C. dos; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.84, n.1, p.21–27, 2006.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI-JR, W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. *In vitro* evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Ribeirão Preto, v.328, n.2, p.183-190, 2007.

CASTELI, V. C.; MENDONÇA, C. C.; CAMPOS, M. A. L. de; FERRARI, M.; MACHADO, S. R. P. Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminares de emulsão O/A contendo cetoconazol 2,0%. **Acta Sci. Health Science**, v.30, n.2, p.121-128, 2008.

CASTELO-BRANCO, V. N.; TORRES, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. **Rev. Nutr.**, v.24, n.1, 2011.

CASTRO, A. C. C. de. **AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE FENÓLICOS, DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DA TORTA DE SEMENTE DE *Coffea arabica* L. (RUBIACEAE)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, p.101, 2014.

ĆETKOVIĆ, G.; SAVATOVIĆ, S.; CANADANOVIĆ-BRUNET, J.; VULIĆ, J.; MANDIĆ, A.; CETOJEVIĆ-SIMIN, D. Valorization of phenolic composition, antioxidant and cell growth activities of tomato waste. **Food Chemistry**, v.133, p.938-945, 2012.

CHAITTIANAN, R.; SRIPANIDKULCHAI, B. Development of a nanoemulsion of *Phyllanthus emblica* L. branch extract. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.40, n.12, p.1520-5762, 2014.

CHAMANAI, R.; HORN, G.; McCLEMENTS, D. J. Influence of oil polarity on droplet growth in oil-in-water emulsions stabilized by a weakly absorbing biopolymer or a nonionic surfactant. **Journal of colloid Interface Science**, v.247, p. 167-176, 2002.

CHANIOTI, S.; KATSOULI, M.; TZIA, C. Novel Processes for the Extraction of Phenolic Compounds from Olive Pomace and Their Protection by Encapsulation. **Molecules**, v.26, n.6, p.1-18, 2021.

CHENG, C.; YU, X.; McCLEMENTS, D. J.; HUANG, Q.; TANG, H.; YU, K.; XIANG, X.; CHEN, P.; WANG, X.; DENG, Q. **Food Chemistry**, v.301, p.1-10, 2019.

CHEONG, M. W.; TONG, K. H.; ONG, J. J. M.; LIU, S. Q.; CURRAN, P.; YU, B. Volatile composition and antioxidant capacity of Arabica coffee. **Food Research International**, v.51, n.1, 2013.

CHIESA, M.; CARGA, J.; KANG, Y. T.; CHENA, G. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 326, n.1-2, p.67-72, 2008.

CHO, E. S.; JANG, Y. J.; HWANG, M. K.; KANG, N. J.; LEE, K. W.; LEE, H. J. Attenuation of oxidative neuronal cell death by coffee phenolic phytochemicals. **Mutat. Res.**, v.661, p.18–24, 2009.

CHOMA, I. M.; OLSZOWY, M.; STUDZINSKI, M.; GNAT, S. Determination of chlorogenic acid, polyphenols and antioxidants in green coffee by thin-layer chromatography, effect-directed analysis and dot blot – comparison to HPLC and spectrophotometry methods. **Journal of Separation Science**, v.42, n.8, 2019.

CHORADIYA, B. R.; PATIL, S. B. A comprehensive review on nanoemulsion as an ophthalmic drug delivery system. **Journal of Molecular Liquids**, v.339, 2021.

CHOO, W. S.; BIRCH, J.; DUFOUR, J. P. Physicochemical and quality characteristics of cold pressed flaxseed oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n.3, p.202-211, 2007.

CHU, Y.-F.; CHEN, Y.; BLACK, R. M.; BROWN, P. H.; LYLE, B. J.; LIU, R. H.; OU, B. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. **Food chemistry**, v.124, n.3, p.914-920, 2011.

CHUESIANG, P.; SIRIPATRAWAN, U.; SANGUANDEEKUL, R.; McLANDSBOROUGH, L.; McCLEMENTS, D. J. Optimization of cinnamon oil nanoemulsions using phase inversion temperature method: Impact of oil phase composition and surfactant concentration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.514, p.208-216, 2018.

CLIFFORD, M. N. The nature of chlorogenic acids. Are they advantageous compounds in coffee?. **Scientific Colloquium on Coffee**, p. 79–89, 1997.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Characterization of nanoparticles intended for drug delivery**. Humana press, 2011. p. 63-70.

COELHO, C.; RIBEIRO, M.; CRUZ, A. C. S.; DOMINGUES, M. R. M.; COIMBRA, M. A.; BUNZEL, M.; NUNES, F. M. Nature of phenolic compounds in coffee melanoidins. **J. Agric. Food Chem.**, v.62, p.7843–7853, 2014.

COMUNIAN, T. A.; RAVANFAR, R.; CASTRO, I. A. de; DANDO, R.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; ABBASPOURRAD, A. Improving oxidative stability of echium oil emulsions fabricated by microfluidics: Effect of ionic gelation and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.233, p.125-134, 2017.

CORREA, M. A.; KUREBAYASHI, A. K.; ISAAC, V. L. B. **Cosmetologia – Ciência e Técnica**. 1.ed. Medfarma. 2012.

CORTE, T. W. F. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia de emulsões cosméticas para xerose senil**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.138. 2006.

CORSO, M. P.; VIGNOLI, J. A.; BENASSI, M. de T. Development of an instant coffee enriched with chlorogenic acids. **J. Food Sci. Technol.**, v.53, n.3, p.1380-1388, 2016.

COSTA, F. Q. C.; CAGNON, J. A.; BATTAGLINI, N. M. P. Misturador para a análise de propriedades reológicas. **Revista Energia na Agricultura**, v.25, n.3, p.42-57, 2010.

COSTA, A. S. G.; ALVES, R. C.; VINHA, A. F.; BARREIRA, S. V. P.; NUNES, M. A.; CUNHA, L. M.; OLIVEIRA, B. P. P. Optimization of antioxidants extraction from

coffee silverskin, a roasting by-product, having in view a sustainable process. **Industrial Crops and Products**, v.53, p 350-357, 2014a.

COSTA, S. da; BASRI, M.; SHAMSUDIN, N.; BASRI, H. Stability of Positively Charged Nanoemulsion Formulation Containing Steroidal Drug for Effective Transdermal Application. **J. Chem.**, v.2014, p.1–8, 2014b.

COSTIN, J. W.; BARNETT, N. W.; LEWIS, S .W.; Mc-GILLIVERY, D. J. Monitoring the total phenolic/antioxidant levels in wine using flow injection analysis with acidic potassium permanganate chemiluminescence detection. **Anal Chim. Acta**, v.499, p.47–56, 2003.

COUTINHO, C. S. C.; SANTOS, E. P. Cremes e Loções: Visão Geral. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 26, p. 36-38, 2014.

CUELHO, C. H. F.; ALVES, G. de A. D.; LOVATTO, M. O.; BONILHA, I. F.; BARBISAN, F.; CRUZ, I. B. M. da; OLIVEIRA, S. M.; FACHINETTO, R.; CANTO, G. S. do; MANFRON, M. P. Topical formulation containing *Ilex Paraguariensis* extract increases metalloproteinases and myeloperoxidase activities in mice exposed to UVB radiation. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.189, p.95-103, 2018.

DAGLIA, M.; PAPETTI, A.; GREGOTTI, C.; BERTE, F.; GAZZANI, G. *In vitro* antioxidant and *ex vivo* protective activities of green and roasted coffee. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.1449-1454, 2000.

DAGLIA, M; RACCHI, M; PAPETTI, A; LANNI, C; GOVONI, S; GAZZANI, G. *In vitro* and *ex vivo* antihydroxyl radical activity of green and roasted coffee. **Journal of Agriculture Food Chemical**, v.52, p.1700 – 1704, 2004.

DAMIANI, E.; ULLRICH, S. E. Understanding the connection between platelet-activating factor, a UV-induced lipid mediator of inflammation, immune suppression and skin cancer. **Progress in Lipid Research**, v.63, p 14–27, 2016.

DATTA, H. S.; MITRA, S. K.; PATWARDHAN, B. Wound healing activity of topical application forms based on Ayurveda. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, India, v.2011, p.1-10, 2011.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.3698–3703, 2002.

DESAI, J.; MALLYA, R. Development of Green Coffee Beans Extract Loaded Anti-aging Liposomal Gel. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 55, n.4, 2021.

DEVASAGAYAM, T. P. A.; KAMAT, J. P.; MORHAN, H.; KESAVAN, P. C. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reaction oxygen species. **Biochemical Biophysical Acta**, v.1282, p.63-70, 1996.

DIAS, R. C. E. **Discriminação de espécies de café (*Coffea arabica* e *Coffea canephora*) em diferentes graus de torra**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, p.106, 2005.

DIAS, D. de O.; COLOMBO, M.; KELMANN, R. G.; KAISER, S.; LUCCA, L. G.; TEIXEIRA, H. F.; LIMBERGER, R. P.; VEIGA JR, V. F.; KOESTER, L. S. Optimization of Copaiba oil-based nanoemulsions obtained by different preparation methods. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.154–162, 2014.

DIOS, C. A. D. **Recomendaciones sobre el manejo y postcosecha del girasol**. Pergamino: Estación Experimental Agropecuária de Pergamino, INTA, p.251-261, 1984.

DI MATTIA, C D.; SACCHETTI, G.; MASTROCOLA, D.; PITTIA, P. Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. **Food Research International**, v.42, n.8, p.1163-1170, 2009.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; JENKINS, S. N.; FAHEY, J. W.; YE, L.; WEHAGE, S. L.; LIBY, K. T.; STEPHENSON, K. K.; WADE, K. L.; TALALAY, P. Protection against UV-light-induced skin carcinogenesis in SKH-1 high-risk mice by sulforaphane-containing broccoli sprout extracts. **Cancer Letters**, v.240, n.2, p.243-252, 2006.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chem.**, v.97, p.654-660, 2006.

DODEIGENE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, R. Chemiluminescence as a diagnostic tool. A review. **Talanta**, v.51, p.415-439, 2000.

D'ORAZIO, J.; JARRET, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV Radiation and the Skin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 12222–12248, 2013.

DUDONNÉ, S.; VITRAC, X.; COUTIÉRE, P.; WOILLET, M.; MÉRILLON, J. M. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.5, p.1768–1774, 2009.

EPAMINONDAS, P. S. **Caracterização físico-química e termo-oxidativa das sementes de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e de seus óleos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, p.100. 2009.

FADHILA, M.; IM, A. M.; JUFRI, M. A PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND IN VITRO SKIN PENETRATION OF MORUS ALBA ROOT EXTRACT NANOEMULSION. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v.12, p.292–296, 2019.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Braz. J. Plant. Physiol.**, v.18, p.23-36, 2006.

FENNEMA, O. R. **Química de los alimentos**.2.ed. Zaragoza: Acríbia, 2000. p.1258.

FERK, F.; HUBER, W.W.; GRASL-KRAUPP, B.; SPEER, K.; BUCHMANN, S.; BOHACEK, R.; MIŠÍK, M.; EDELBAUER, L.; KNASMÜLLER, S. Protective effects of coffee against induction of DNA damage and pre-neoplastic foci by aflatoxin B1. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.58, p.229-238, 2014.

FERNANDES, S. M.; PEREIRA, R. G. F. A.; PINTO, N. A. V. D.; NERY, M. C.; PÁDUA, F. R. M. de. Constituintes químicos e teor de extrato aquoso de cafés arábica (*Coffea arabica* L.) e conilon (*Coffea canephora* Pierre) TORRADOS. **Ciênc. Agrotec.**, v.27, n.5, p.1076-1081, 2003.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver. Ass. Med. Brasil**, v.43, n.1, p.61–68, 1997.

FERRARI, M; ROCHA-FILHO, P. A. Multiple emulsion containing amazona oil: açai oil (*Euterpe oleraceae*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.4, p.737-743, 2011.

FIGUEIRAS, A. R. R.; COIMBRA, A. B.; VEIGA, F. J. B. Nanotechnology in healthcare: applications and perspective. **Informative Geum Bulletin**, v.5, n.2, p.14-26, 2014.

FIGUEIREDO, S. A.; VILELA, F. M. P.; SILVA, C. A. da; CUNHA, T. M.; SANTOS, M. H. dos; FONSECA, M. J. V. *In vitro* and *in vivo* photoprotective/photochemopreventive potential of *Garcinia brasiliensis* epicarp extract. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.131, p.65–73, 2014.

FIRESTONE, D. **AOCS catalog, physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**. 2.ed. Boulder, USA: AOCS Press, 2006. p.237.

FIRESTONE, D. **AOCS catalog, physical and chemical characteristics of oils, fats, and waxes**. 3.ed. Boulder, USA: AOCS Press, 2013. p.335.

FIRMINO, L. de A. **Avaliação da qualidade de diferentes marcas de chá verde (*Camellia sinensis*) Comercializadas em Salvador-Bahia**. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, p.111, 2011.

FONSECA, Y. M.; MARQUELE-OLIVEIRA, F.; VICENTINI, F. T. M. C.; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, J. P. B.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the potential of Brazilian propolis against UV-induced oxidative stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-8, 2010.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; CARDOSO, J. C.; ALBUQUERQUE JR, R. L. C. de; FONSECA, M. J. V. Efficacy of Marigold Extract-Loaded Formulations Against UV-induced Oxidative Stress. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.100, n.6, 2011.

FORGIARINI, A.; ESQUENA, J.; GONZÁLEZ, C.; SOLANS, C. Formation of Nanoemulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v.17, n.7, p.2076-2083, 2001.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, v.4, n.7, p.220-225, 1993.

FRANKEL, W. N.; MEYER, A. S.: Review: The problems of using one-dimensional methods to evaluated multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, n.13, p.1925-1941, 2000.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polímeros**, v.25, p.1-9, 2015.

FRIBERG, S. E.; GOLDSMITH, L. B.; HILTON, M. L. Theory of emulsions. *In*: LIEBERMAN, H. A.; RIEGER, M. M.; BANKER, G. S. **Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems**. New York: Marcel Dekker Inc., 1988. p.49-91.

FRIEDMANN, P. S.; STRICKLAND, I.; MEMON, A. A.; JOHNSON, P. M. Early time course of recruitment of immune surveillance in human skin after chemical provocation. **Clin. Exp. Immunol.**, v.91, n.3, p.351–36., 1993.

FUKAGAWA, S.; HARAMIZU, S.; SASAOKA, S.; YASUDA, Y.; TSUJIMURA, H.; MURASE, T. Coffee polyphenols extracted from green coffee beans improve skin properties and microcirculatory function. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, v.81, n.9, p.1814-1822, 2017.

FUKUI, M.; KANG, K. J.; OKADA, K.; ZHU, B. T. EPA, an omega-3 fatty acid, induces apoptosis in human pancreatic cancer cells: Role of ROS accumulation, caspase-8 activation, and autophagy induction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.114, n.1, p.192–203, 2013.

DADHAVE, A. Determination of Hydrophilic-Lipophilic Balance Value. **International Journal of Science and Research**, v.3, n.4, p.573-575, 2014.

GADKARI, P. V.; BALAMARAM, M. Extraction of catechins from decaffeinated green tea for development of nanoemulsion using palm oil and sunflower oil based lipid carrier systems. **Journal of Food Engineering**, v.147, p.14-23, 2015.

GAWLIK-DZIKI, U.; SWIECA, M.; DZIKI, D.; KOWALSKA, I. Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee-mechanism of action in the light of potential bioaccessibility. **Food Research International**, v.61, p.48-55, 2014.

GELSE, K.; PÖSCHL, E.; AIGNER, T. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.55, n.12, p.1531–1546, 2003.

GEORGE, K. C.; HEBBAR, S. A.; KALE, S. P.; KESAVAN, P. C. Caffeine protects mice against whole-body lethal dose of γ -irradiation. **Journal of Radiology Protection**, v.19, p.171-176, 1999.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; DI MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method. **AAPS Pharm Sci**, v.5, n.2, p.210-214, 2003.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F.T.M.C.; VERRI-JR, W.A.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of the activity of soybean extract by different *in vitro* methods and investigation of this activity after its incorporation in topical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 64, p.99-106, 2006.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VERRI-JR, W. A.; BORIN, M. F.; RAFAEL, J.A.; JABOR, J. R.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activity of two plant extracts containing isoflavonoids by different *in vitro* methods. **Lat Am J Pharm**, v.26, p.252- 57, 2007.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA. Recent Advances and Uses of Grape Flavonoids as Nutraceuticals. **Nutrients**, v.6, n.1, p.391-415, 2014.

GFELLER, W.; KOBEL, W.; SEIFERT, G. Overview of animal test methods for skin irritation. **Food Chem. Toxicol.**, v.23, p.165-168, 1985.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.338–344, 2013.

GIANETI, M. D.; WAGEMAKER, T. A. L.; SEIXAS, V. C.; CAMPOS, P. M. B. G. M. The use of nanotechnology in cosmetic formulations: the influence of vehicle in the vitamin A skin penetration. **Current Nanoscience**, v.8, p.526-534, 2012.

GIBBS, N. K.; NORVAL, M. Photoimmunosuppression : a brief overview. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.29, p.57–64, 2013.

GHOSH, V.; MUKHERJEE, A.; CHANDRASEKARAN, N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.20, p.338–344, 2013.

GOSH, D.; MONDAL, S.; RAMAKRISHNA, K. A topical ointment formulation containing leaves extract of *Aegialitis rotundifolia* Roxb., accelerates excision, incision and burn wound healing in rats. **Wound Medicine**, n.26, p.1-15, 2019.

GÓMEZ-RUIZ, J. A.; LEAKE, D. S.; AMES, J. M. *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **J. Agric. Food Chem.**, v.17, p.6962–6969, 2007.

GONZALEZ, H.; FRABROT, A.; LARKO, O.; WENNBERG, A.-M. Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole body applications - with and without UV irradiation. **British Journal of Dermatology**, v.154, p.337-340, 2006.

GIROTTI, S.; BOLELLI, L.; BUDINI, R.; ARFELLI, G. Comparison of analytical methods in determining total antioxidant capacity in red wine. **Analytical Letters**, v. 35, p.747–758, 2002.

GOVERNO DO BRASIL. Exportação de cafés chega a 45,6 milhões de sacas e bate recorde histórico. **Gov.br**, 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/07/exportacao-de-cafes-chega-a-45-6-milhoes-de-sacas-e-bate-recorde-historico>>. Acesso em: 06 dez. 2021.

GRIFFIN, W.C. Classification of Surface-Active Agents by "HLB". **Journal of The Society of Cosmetic Chemists**, v. 1, p. 311-326, 1949.

GRZESIK, M.; NAPARLO, K.; BARTOSZ, G.; SADOWSKA-BARTOSZ, I. Antioxidant properties of catechins: Comparison with other antioxidants. **Food Chemistry**, v.241, p.480-492, 2018.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v.30, p.206-213, 2007.

GUSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA A. J. Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. *In*: WALIA, M.; RAWAT, K.; BHUSHAN, S.; PADWAD, Y. S.; SINGH. **The lipid handbook**. 3.ed. London: CRC Press, 2007. p. 929-934.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4.ed. Oxford: Oxford University Press. 2007.

HALLIWELL, B. The wanderings of a free radical. **Free Radical Biology and Medicine**, v.46, n.5, p.531-542, 2009.

HAN, F.; YIN, R.; CHE, X., Yuan, J., Cui, Y., Yin, H., & Li, S. Nanostructured lipid carriers (NLC) based topical gel of flurbiprofen: Design, characterization and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.439, n.1-2, p.349–357, 2012.

HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Observation and quantification of UV induced ROS generation in ex vivo human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.76, p.57–63, 2002.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology and Medicine**, v.41, n.8, p.1205–1212, 2006.

HARTMAN, L, ESTEVES, W. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. *In*: FUNDAÇÃO TROPICAL DE PESQUISAS E TECNOLOGIA - Tecnologia agroindustrial. São Paulo, 1982. p.67-131.

HATANAKA, E.; CURI, R. Fatty acids and wound healing: a review. **Rev. Bras. Farm.**, v.88, n.2, p.53-58, 2007.

HAYDEN, C. G. J.; ROBERTS, M. S.; BENSON, H. A. E. Systemic absorption of sunscreen after topical application. **Lancet**, v.350, p.863–864, 1997.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: Innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Nature Immunology**, v.14, n.10, p.978–985, 2013.

HECIMOVIĆ, I.; BELSCAK-CVITANOVIĆ, A.; HORZIC, D.; KOMES, D. Comparative study of polyphenols and caffeine in different coffee varieties affected by the degree of roasting. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.991-1000, 2011.

HEURUNG, A.R.; RAJU, S. I.; WARSHAW, E. M. Adverse reactions to sunscreen agents: Epidemiology, responsible irritants and allergens, clinical characteristics, and management. **Dermatitis**, v.25, n.6, p.289-326, 2014.

HILDESHEIM, J.; AWWAD, R. T.; FORNACE, A. J. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Inhibitor Protects the Epidermis Against the Acute Damaging Effects of Ultraviolet Irradiation by Blocking Apoptosis and Inflammatory Responses. **Journal of Investigative Dermatology**, v.122, n.2, p.497–502, 2004.

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. de M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.23, n.3, p.418-424, 2004.

HO, C. C.; AHDMADE, K. Electrokinetic Behavior of Palm Oil Emulsions in Dilute Electrolyte Solutions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.216, n.1, p.25-33, 1999.

HU, M.-L.; CHEN, Y.-K.; CHEN, L.-C.; SANO, M. PABA scavenges reactive oxygen species and protects DNA against UV and free radical damage. **J. Nutr. Biochem.**, v.6, p.504–508; 1995.

HUANG, D.; BOXIN, O. U.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.6, p.1841–1856, 2005.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal of Food Science**, v.75, n.1, p.50–R57, 2010.

HUPEL, M.; POUPART, N.; AR GALL, E. Development of a new in vitro method to evaluate the photoprotective sunscreen activity of plant extracts against high UV-B radiation. **Talanta**, v.86, n.1, p.362–371, 2011.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos 4ª Edição**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em: http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf. Acesso em: 09 dez. 2021.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v.189, n.1-2, p.21-39, 2003.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, 2008.

INBARAJ, J. J.; BILSKI, P.; CHIGNELL, C. F. Photophysical and photochemical studies of 2-phenylbenzimidazole and UVB sunscreen 2-phenylbenzimidazole-5-sulfonic acid. **Photochem. Photobiol.**, v.75, p.107–116, 2002.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2020 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 09 dez. 2021.

ISHII, F.; SASAKI, I.; OGATA, H. Effect of phospholipid emulsifier on physicochemical properties of intravenous fat emulsions and/or drug carrier emulsions. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.42, p.513-515, 1990.

IVAN, A. L. M.; CAMPANINI, M. Z.; MARTINEZ, R. M.; FERREIRA, V. S.; STEFFEN, V. S.; VICENTINI, F. T. M. C.; VILELA, F. M. P.; MARTINS, F. S.; ZARPELON, A. C.; CUNHA, T. M.; FONSECA, M. J. V.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity in vitro. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.138, p. 124–133, 2014.

IZQUIERDO, P.; FENG, J.; ESQUENA, J.; TADROS, T.; DEDEREN, J.C.; Garcia, M.J.; AZEMAR, N.; SOLANS, C. The influence of surfactant mixing ratio on nanoemulsion formation by the PIT method. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 285, p.388-394, 2005.

JAFARI, S. M.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation of Nanoparticles of d-Limonene by Spray Drying: Role of Emulsifiers and Emulsifying Techniques. **Drying Technology**, v.25, n.6, p.1079 – 1089, 2007.

JEONG, M.W.; OH, S. G.; KIM, Y. C. Effects of amine oxide compounds on the zeta potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 181, p.247-256, 2001.

JEONG, J. H.; JEONG, H. R.; JO, Y. N.; KIM, H. J.; LEE, U.; HEO, H. J. Antioxidant and neuronal cell protective effects of Columbia arabica coffee with different roasting conditions. **Preventive Nutrition and Food Science**, v.18, p.30-37, 2013.

JUNG, S.; KIM, M. H.; PARK, J. H.; JEONG, Y.; KO, K. S. Cellular Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Coffee Extracts with Different Roasting Levels. **Journal of Medical Food**, South Korea, v.20, n.6, p.1-10, 2017.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2013.

JUZENIENE, A.; MOAN, J. Beneficial effects of UV radiation other than via vitamin D production. **Dermato-Endocrinology**, v.4, n.2, p.109–117, 2012.

KAITHWAS, G.; MAJUMDAR, D. K. Effect of *L. usitatissimum* (Flaxseed/Linseed) Fixed Oil against Distinct Phases of Inflammation. **ISRN Inflammation**, v.2013, p.1-4, 2013.

KAMIDATE, T.; KIDA, N.; ICHIHASHI, H.; WATANABE, H. Role of amino thiols as radical quenchers in chemiluminescence of luminol catalyzed by horseradish peroxidase. **Analytical Sciences**, v.11, p.169-173, 1995.

KAPPES, U. P.; LUO, D.; POTTER, M.; SCHULMEISTER, K.; RUNGER, T. M. Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, n.3, p.667–675, 2006.

KATALINIC, V.; MODUN, D.; MUSIC, I.; BOBAN, M. Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by reducing antioxidant power (FRAP) assays. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.140, p.47–52, 2005.

KATIYAR, S. K.; MEERAN, S. M. Obesity increases the risk of UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF-KappaB signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v.42, n.2, p.299–310, 2007.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology Facial. **Plastic Surgery Clinics of North America**, v.19, n.2, p.229-234, 2011.

KILDACI, I.; BUDAMA-KILINC, Y.; GUNDUZ, S. K.; ALTUNTAS, E. Linseed Oil Nanoemulsions for treatment of Atopic Dermatitis disease: Formulation, characterization, in vitro and in silico evaluations. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v.64, p. 1-14, 2021.

KIM, M.-B.; PARK, J.-S.; LIM, S.-B. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurized liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. **Food Chemistry**, v.122, p.546-552, 2010.

KIM, T. I.; KIM, T. G.; LIM, D. H.; KIM, S. B.; MIN, P. S.; HUR, T. Y.; KI, K.-S.; KWON, E. G.; VIJAYAKUMAR, M.; KIM, Y.-J. Preparation of Nanoemulsions of Vitamin A and C by Microfluidization: Efficacy on the Expression Pattern of Milk-Specific Proteins in MAC-T Cells. **Molecules**, v. 24, n.2566, p.1-11, 2019.

KNORR, F.; LADEMANN, J.; PATZELT, A.; STERRY, W.; BLUME-PEYTAVI, U.; VOGT, A. Follicular transport route-research progress and future perspectives. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.71, n.2, p.173-180, 2009.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A., SAWA, Y., SHIBATA H. Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chloro- genic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. **Biochimica et Biophysica Acta—General Subjects**, v.1335, n.3, p.335–342, 1997.

KOUAMÉ, K. J. E. P.; BORA, A. F. M.; LI, X.; SUN, Y.; LIU, L. Novel trends and opportunities for microencapsulation of flaxseed oil in foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v.87, p.1-11, 2021.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n.3, p. 217-233, 2011.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, p.329-339, 2004.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **The Theory and Practice of Industrial Pharmacy**. 3.ed. Philadelphia : Lea & Febiger, 1986.

LADEMANN, J.; OTBERG, N.; JACOBI, U.; HOFFMAN, R. M.; BLUME-PEYTAVI, U. Follicular penetration and targeting. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, v.10, p.301-303, 2005.

LAGUERRE, M.; BAYRASY, C.; PANYA, A.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J.; LECOMTE, J.; DECKER, E. A.; VILLENEUVE. What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.55, n.2, p.183-201, 2015.

LEONARDI, G. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Influence of glycolic acid as a component of different formulations on skin penetration by vitamin a palmitate. **J. Cosmet. Sci.**, v.49, n.1, p.23-32, 1998.

LELOUP, V. Evaluation of the nutritive value of soluble coffee. **Proceedings of ASIC**, p.80–87, 2006.

LI, Y.; SHI, W.; ZHOU, Y.; HU, X.; SONG, C.; MA, H.; WANG, C.; LI, Y. Neuroprotective effects of chlorogenic acid against apoptosis of PC 12 cells induced by methylmercury. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.26, p.13-21, 2008.

LI, Z., MING, T.; WANG, J.; NGAI, T. High internal phase emulsions stabilized solely by microgel particles. **Angewandte Chemie**, v.121, n. 45, p. 8642-8645, 2009.

LIU, W.; SUN, D.; LI, C.; LIU, Q.; XU, J. Formation and stability of paraffin oil-in-water nanoemulsions prepared by the emulsion inversion point method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.303, n.2, p.557–63, 2006.

LIMA, C. G.; VILELA, A. F. G.; SILVA, A. A. D. da; PIANNOVSKI, A. R.; SILVA, K. K.; CARVALHO, V. F. M.; DE MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P.; FERRARI, M.

Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões O/A contendo óleo de babaçu (*Orbignya oleifera*). **Rev. Bras. Farm.**, v.89, n.3, p.239-245, 2008.

LONNI, A. A. S. G.; MUNHOZ, V. M.; LOPES, G. C.; LONGHINI, R.; BORGHI-PANGONI, F. B.; SANTOS, R. S. dos; JUNQUEIRA, M. V.; NATALI, M. R. M.; LEITE-MELLO, E.; GUIMARAES, F. B.; BAESSO, M. L.; SCARMINIO, I. S.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. de. Development and characterization of multiple emulsions for controlled release of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract. **Pharmaceutical Development and Technology**, Londrina, v.8, n.21, p.933-942, 2015.

LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. D.; NAGEM, T. J.; PINTO, A. D. S. Flavonoides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v.3, n.14, 2010.

LÓPEZ-GALILEA, I.; PEÑA, M. P. de; CID, C. Correlation of selected constituents with the total antioxidant capacity of coffee beverages: Influence of the brewing procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.6110–6117, 2007.

LORENCINI, M.; BROHEM, C. A.; DIAMANTE, G. C.; ZANCHIN, N. I. T.; MAIBACH, H. I. Active ingredients against human epidermal aging. **Ageing Research Reviews**, v.15, p.100-115, 2014.

LU, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, n.4, p.840–860, 2010.

LU, M.; TAN, X.-G.; ZHOU, Z.-L.; YANG, Q.; ZHU, J.-N. CHEN, J.-N.; LUO, H.-R.; WU, G.-S. Secoisolariciresinol diglucoside delays the progression of aging-related diseases and extends the lifespan of *Caenorhabditis elegans* via DAF-16 and HSF-1. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2020, p.1-13, 2020.

LUDWIG, I. A.; SANCHEZ, L.; CAEMMERER, B; KROH, L. W.; PENA, M. P. de; CID, C. Extraction of coffee antioxidants: impact of brewing time and method. **Food Res. Int.**, v.48, n.1, p.57–64, 2012.

LYRA, L. P. da S. **DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO DE GERANIOL E ÓLEO ESSENCIAL DA PALMAROSA (*Cymbopogon martinii*) E SUA AÇÃO INIBITÓRIA SOBRE LINHAGENS DE *Cutibacterium acnes***. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, p.129, 2019.

MACHADO G. C.; CHAVES, J. B. P.; ANTONIASSI R. Composição em ácidos graxos e caracterização físico-química de óleos hidrogenados de coco babaçu. **Ceres**, v.53, n.308, p.463-470, 2006.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v.27, n.1/2, p.33-39, 2008.

MADDODI, N.; JAYANTHY, A.; SETALURI, V. Shining Light on Skin Pigmentation: The Darker and the Brighter Side of Effects of UV Radiation. **Photochem. Photobiol.**, v.88, n.5, p.1075–1082, 2012.

MAESTRO, A.; SOLÉ, I.; GOZÁLEZ, C.; SOLANS, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Influence of the phase behavior on the properties of ionic nanoemulsions prepared by the phase inversion composition method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.327, n.2, p.433-439, 2008.

MAHDI, E.; NOOR, A.; SAKEENA, M.; ABDULLAH, G.; ABDULKARIM, M.; SATTAR, M. Formulation and *in vitro* release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. **Int. J. Nanomedicine**, v.6, p.2499–2512, 2011.

MALODE, G. P.; CHAUHAN, S. A.; BATARE, S. A.; MALODE, L. M.; MANWAR, J. V.; BAKAL, R. L. A critical review on nanoemulsion: Advantages, techniques and characterization. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research**, v.4, n.3. 2022.

MAINARDES, R. M.; EVANGELISTA, R. C. PLGA nanoparticles containing praziquantel: effect of formulation variables on size distribution. **International Journal Pharmaceutical**, v. 290, p. 137-144, 2005.

MANIASSO, N. Micellar media in analytical chemistry. **Quím. Nova**, v.24, n.1, P.87-93, 2001.

MARQUES, S. R.; PEIXOTO, C. A.; MESSIAS, J. B.; ALBUQUERQUE, A. R. SILVA JR, V. A. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta Cirur. Bras.**, v.19, n.3, p.196-209, 2004.

MARQUES, T. Z. da S.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, L. B. de O. de; CARDOSO, V. da S.; FREITAS, Z. M. F. de; BARROS, R. de C. da S. A.; VILLA, A. L. V.; MONTEIRO, M. S. de S. de B.; SANTOS, E. P. dos; RICCI JR, E. Development and characterization of a nanoemulsion containing propranolol for topical delivery. **Int. J. Nanomedicine**, n.13, p.2827-2837, 2018.

MARQUELE, F. D.; MAMBRO, V. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y. M. L.; FONSECA, M. J. V. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extractis of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3-4, p.455-462, 2005.

MARQUES, A. C.; HAUTRIVE, T. P.; MOURA, G. B. de; CALLEGARO, M. da G. K.; HECKTHEUER. Effect of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) prepared by different methods on the biological response of rats. **Rev. Nutr.**, v.24, n.1, p.131-141, 2011.

MARQUES, T. Z. da S.; SANTOS-OLIVEIRA, R.; SIQUEIRA, L. B. D. O. de; CARDOSO, V. da S.; FREITAS, Z. M. F. de; ASCENÇÃO, R. D. C. da S. Development and Characterization of a Nanoemulsion Containing Propranolol for Topical Delivery. **Int. J. Nanomed.**, 2018, v.13, p.2827–2837, 2018.

MARTINI, F. H.; TIMMONS, M. J.; TALLITSCH, R. B. **Anatomia Humana**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

MARTINEZ, R. M.; RIBEIRO, F. A. P.; STEFFEN, V. S.; CAVIGLIONE, C. V.; VIGNOLI, J. A.; BARBOSA, D. S.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R. Naringenin Inhibits UVB Irradiation-Induced Inflammation and Oxidative Stress in the Skin of Hairless Mice. **Journal of Natural Products**, v.78, n.7, p.1647–1655, 2015.

MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; SAITO, P.; MELO, C. B. P.; BORGHI, S. M.; PINTO, I. C.; BUSSMANN, A. J. C.; BARACAT, M. M.; GEORGETTI, S. R.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R. Lipoxin A4 inhibits UV radiation-induced skin inflammation and oxidative stress in mice. **Journal of Dermatological Science**, v.91, p.164–174, 2018.

MARTINEZ, R. M.; SOUZA, C. R. de; MELO, C. P. B.; BARACAT, M. M.; ARAKAWA, N.S .; DUARTE, J. C.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R. Prevention of UVB radiation-induced oxidative stress in mice by topical administration of *Azadirachta indica* (neem) extract. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 41, n.633, p.1-14, 2020.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.195, n.3, p.298–308, 2004.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, p.158, 2009.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. da. O/W Nanoemulsion After 15 Years of Preparation: A Suitable Vehicle for Pharmaceutical and Cosmetic Applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.31, p.17-22, 2010.

MARZUKI, N. H. C.; WAHAB, R. A.; HAMID, M. A. An overview of nanoemulsion: concepts of development and cosmeceutical applications. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.33, p.779-797, 2019.

MASSON, D. S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes**. Dissertação (Mestrado em Faculdade de Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 163. 2005.

MASZEWSKA, M.; FLOROWSKA, A.; DLUZEWSKA, E.; WRONIAK, M.; MARCINIAK-LUKASIAK, K.; ŻBIKOWSKA, A. Oxidative Stability of Selected Edible Oils. **Molecules**, v.23, n.7, p.1746, 2018.

MAVERAKIS, E.; MIYAMURA, Y.; BOWEN, M. P.; CORREA, G.; ONO, Y.; GOODARZI, H. Light, including ultraviolet. **Journal of Autoimmunity**, v.34, n.3, 2010.

MAZZARINO, L.; PITZ, H. da S.; VOYTENA, A. P. L.; TREVISAN, A. C. D.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; MARASCHIN, M. Jaboticaba (*Plinia peruviana*) extract nanoemulsions: development, stability and in vitro antioxidant activity. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.44, n.4, 2017.

McCLEMENTS, D. I.; DECKER, E. A. Lipídios. *In*: DAMORARAM, S; PARKIN, K. L., FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto alegre: Artmed, 2010. p.131-178.

MEHARI, B.; REDI-ABSHIRO, M.; CHANDRAVANSI, S.; COMBRINCK, S.; ATLABACHEW, M.; McCRINDLE, R. Profiling of phenolic compounds using UPLC-MS for determining the geographical origin of green coffee beans from Ethiopia. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.45, p.16-25, 2016.

MEIDAN, V.M. Methods for quantifying intrafollicular drug delivery: a critical appraisal. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v.7, n.9, p.1095-1108, 2010.

MEINHART, A. D.; CALDEIRÃO, L.; DAMIN, F. M.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Analysis of chlorogenic acids isomers and caffeic acid in 89 herbal infusion (tea). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.73, p.76-82, 2018.

MELLO, L.; PINHEIRO, M. Aspectos Físico-químicos de Azeites de Oliva e de Folhas de Oliveira Provenientes de Cultivares do RS, Brasil. **Alim. Nutr., Araraquara**, v.23, n.4, p.537-548, 2012.

MELO; C. B.; SAITO, P.; VALE, D. L.; RODRIGUES, C. C. A.; PINTO, I. C.; MARTINEZ, R. M.; BEZERRA, J. R.; BARACAT, M. M.; VERRI JR, W. A.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R. Protective effect of oral treatment with *Cordia verbenacea* extract against UVB irradiation deleterious effects in the skin of hairless mouse. **J. Photochem Photobiol B.**, v.216, p.1011-1344, 2021.

METROHM. **Catálogo: 892 Professional Rancimat**. 2012. Disponível em: <https://www.metrohm.com/pt-br/produtos-geral/estabilidade-oxidativa/rancimat/>. Acesso em: 18 dez. 2021.

MICHALAK, K. M.; BIEDERMANN, T.; REICHMANN, E.; MEULI, M.; KLAR, A. S. Induction of angiogenic and inflammation-associated dermal biomarkers following acute UVB exposure on bio-engineered pigmented dermo-epidermal skin substitutes in vivo. **Pediatr. Surg. Int.**, v.35, p.129-136, 2018.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v.28, p.637-641, 2005.

MORAIS, G. C.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Attainment of O/W Emulsions Containing Liquid Crystal from Annatto Oil (*Bixa orellana*), Coffee Oil, and Tea Tree Oil (*Melaleuca alternifolia*) as Oily Phase Using HLB System and Ternary Phase Diagram. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.29, p. 297-206, 2008.

MORAIS, J. M. de. **Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

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

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos Vegetais e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. p.150.

MORI, H.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; USHIDA, J.; FUJII, K.; HARA, A.; TANAKA, T.; MURAI, H. Chemopreventive effects of coffee bean and rice constituents on colorectal carcinogenesis. **Biofactors**, v.12, p.101-105, 2000.

MOURA, C. V. R.; SILVA, B. C.; CASTRO, A. G.; MOURA, E. M.; VELOSO, M. E. C.; SITTOLIN, I. M.; ARAUJO, E. C. E. Caracterização Físico-Química de Óleos Vegetais de Oleaginosas Adaptáveis ao Nordeste Brasileiro com Potenciais para Produção de Biodiesel. **Rev. Virtual Quim.**, v.11, n.3, 2019.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Spain, v. 72, n.2, p.145-171, 2001.

MÜLLER, R. H.; JACOBS, C.; KAYSER, O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. **Advanced drug delivery reviews**, v.47, n.1, p.3-19, 2001.

NAIDU, M. M.; SULOCHANAMMA, G.; SAMPATHU, S. R.; SRINIVAS, P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, v.107, p.377–384, 2008.

NARITA, Y.; INOUE, K. Chlorogenic Acids from Coffee. **Coffee in Health and Disease Prevention**, p.189-199, 2015.

NAVARRO, V. P.; NELSON FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; FREITAS, A. C. A participação das metaloproteinases da matriz nos processos fisiológicos da cavidade bucal. **Rev. Odontol. Da UNESP**, v.35, p.233-248, 2006.

NAWAR, W. Lipideos. *In*: FENNEM, O. R. **Química de los alimentos**. 2.ed. Massachusetts: Acribia S.A., 2000. p.270-375.

NICOLI, M. C.; ANESE, M.; MANZOCCO, L.; LERICI, C. R. Antioxidant Properties of Coffee Brews in Relation to the Roasting Degree. **LWT – Food Science and Technology**, v.30, n.3, p.292-297, 1997.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Archives of Dermatological Research**, v.302, p.71–83, 2010.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, n.4, p.503-515, 2010.

NORCINO, L. B.; MENDES, J. F.; NATARELLI, C. V. L.; OLIVEIRA, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Pectin films loaded with copaiba oil nanoemulsions for potential use as bio-based active packaging. *Food Hydrocolloids*, v.106, 2020.

NOORAZWANI, Z.; NURFITTRAH, A. H. S.; NORZALINA, O.; SOLEH, R.; ALYANI, M. S.; NORASIAH, S. Characteristic of local Robusta cherries upon fermentation and roasting during wet coffee processing. **AIP Conference Proceedings**, v.2347, n.1, 2021.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e subprodutos. **B. CEPPA**, v.29, p.317-330, 2011.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (*Linum usitatissimum* L.). **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.71, n.2, p.291-300, 2012.

OLIVEIRA, B. R. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões de *Carapaguianensis* e *Copaiferasp.* e estudo de ação repelente frente a *Aedes aegypti***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

OLIVEIRA, A. C. de; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, 2009.

OLIVEIRA, D. M. de; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos, **Química Nova**, v.34, n.6, 2011.

OLIVEIRA, J. S.; AGUIAR, T. A.; MEZADRI, H.; SANTOS, O. D. H. Attainment of hydrogel-thickened nano-emulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinylpalmitate. **Afr. J. Biotech**, v.10, p.13014–13018, 2011.

OLIVEIRA, J. C.; MAIA, L. O.; SOUZA, E. C. O.; TESCAROLLO, I. L. Avaliação sensorial e físico-química de fitocosmético hidratante formulado com óleo de buriti. **Visão Acadêmica**, v.17, n.1, 2016.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Human Nutrition and Metabolism. **J. Nutr.**, v.131, p.66-71, 2001.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v.237, n.1-2, p.241-249, 2002.

OTBERG, N.; RICHTER, H.; SCHAEFER, H.; BLUME-PEYTAVI, U.; STERRY, W.; LADEMANN, J. Variations of hair follicle size and distribution in different body sites. **J. Invest. Dermatol.**, v.122, p.14-19, 2004.

OTRANTO, M.; NASCIMENTO, A. P.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Effects of supplementation with different edible oils on cutaneous wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, v.18, p.629-636, 2010.

PALMIERI, M. G. S.; CRUZ, L. T.; BERTGES, F. S.; HÚNGARO, H. M.; BATISTA, L. R.; SILVA, S. S. da; FONSECA, M. J. V.; RODARTE, M. P.; VILELA, M. P.; AMARAL, M. da P. H. do. Enhancement of antioxidant properties from green coffee as promising ingredient for food and cosmetic industries. **Biocatalysis and Agriculture Biotechnology**, v.16, p.43-48, 2018.

PANUSA, A.; ZUORRO, A.; LAVECCHIA, R.; MARROSU, G.; PETRUCCI, R. Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. **Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.17, p.4162-4168.

PASQUALI, R. C.; TAUROZZI, M. P.; BREGNI, C. Some considerations about the hydrophilic-lipophilic balance system. **International Journal of Pharmaceutics**, v.356, n.1-2, p.44-51, 2008.

PASQUALI, R. C.; SACCO, N.; BREGNI, C. The studies on hydrophilic-lipophilic balance (HLB): sixty years after William C. Griffin's pioneer work (1949-2009). **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, n.2, p.313-317, 2009.

PAUR, I.; BALSTAD, T. R.; BLOMHOFF, R. Degree of roasting is the main determinant of the effects of coffee on NF-kappaB and EpRE. **Free Radic. Biol. Med.**, v.48, n.9, p.1218-1227, 2010.

PEREIRA, T. A.; GUERREIRO, C. M.; MARUNO, M.; FERRARI, M.; ROCHA-FILHO, P. A. Exotic Vegetable Oils for Cosmetic O/W nanoemulsions: *In Vivo* Evaluation. **Molecules**, v.21, n.3, 2016.

PERGOLIZZI, S.; D'ANGELO, V.; ARAGONA, M.; DUGO, P.; CACCIOLA, F.; CAPILLO, G.; DUGO, G.; LAURIANO, E. R. Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory activity of green coffee beans methanolic extract in rat skin. **Natural Product Research**, v.34, n.11, p.1-7, 2018.

PERRONE, D.; DONANGELO, R.; DONANGELO, C. M., FARAH, A. Modeling weight loss and chlorogenic acids content in coffee during roasting. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.12238-12243, 2010.

PETROVIC, M.; GACIC, M.; KARACIC, V.; GOTTESTEIN, Ž.; MAZIJA, H.; MEDIC, H. Enrichment of eggs in n-3 polyunsaturated fatty acids by feeding hens with different amount of linseed oil in diet. **Food Chemistry**, v.135, p.1563-1568, 2012.

PINHO, J. J. R. G.; STORPIRTS, S. Formação e estabilidade física das emulsões, **Cosmetic & Toiletries (Ed. port.)**, v.10, n.6, p.44-56, 1998.

PIORNOS, J. A.; BURGOS-DÍAZ, C.; MORALES, E.; RUBILAR, M.; ACEVEDO, F. Highly efficient encapsulation of linseed oil into alginate/lupin protein beads: Optimization of the emulsion formulation. **Food Hydrocolloids**, v.63, p.139–148, 2017.

POLETTA, G. L.; SIMONIELLO, M. F.; MUDRY, M. D. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in Caiman latirostris blood. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v.179, p.29–36, 2016.

PORTER, C. J.; KAUKONEN, A. M.; BOYD, B. J.; EDWARDS, G. A.; CHARMAN, W. N. Susceptibility to lipase-mediated digestion reduces the oral bioavailability of danazol after administration as a medium-chain lipid-based microemulsion formulation. **Pharm. Res.**, v.21, p.1405-1412, 2004.

PORTO, L. do C. G. **CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS E PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO GRÃO DE CAFÉ VERDE**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, p.53, 2015.

POUTON, C. W.; PORTER, C. J. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.60, n.6, p.625-637, 2008.

PRIFTIS, A.; STAGOS, D.; KONSTANTINOPOULOS, K.; TSITSIMPIKOU, C.; SPANDIDOS, D. A.; TSATSAKIS, A. M.; TZATZARAKIS, M. N.; KOURETAS, D.

Comparison of antioxidant activity between green and roasted coffee beans using molecular methods. **Mol. Med. Rep.**, v.12, n.5, p.7293–7302, 2015.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Agric. Food Chem.**, v.53, p.4290-4302, 2005.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/biactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.797-810, 2015.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 1992. p.147-171.

QUINTÃO, F. J. O.; TAVARES, R. S. N.; VIEIRA FILHO, S. A.; SOUZA, G. H. B.; SANTOS, O. D. H. Hydroalcoholic extracts of *Vellozia squamata*: study of its nanoemulsions for pharmaceutical or cosmetic applications. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p.101-107, 2013).

RAMBARAN, T. F. A patent review of polyphenol nano-formulations and their commercialization. **Trends in Food Science & Technology**, v.120, p.111-122, 2022.

RAMALAKSHMI, K.; RAO, L. J. M.; TAKANO-ISHIKAWA, Y.; GOTO, M. Bioactivities of low-grade green coffee and spent coffee in different *in vitro* model systems. **Food Chemistry**, v.115, n.1, p.79-85, 2009.

RAPHAELLI, C. de O.; AZEVEDO, J. G.; PEREIRA, E. dos S.; VINHOLES, J. R.; CAMARGO, T. M.; HOFFMANN, J. F.; RIBEIRO, J. A.; VIZZOTTO, M.; ROMBALDI, C. V.; WINK, M. R.; BRAGANHOL, E.; NORA, L. Phenolic-rich apple extracts have photoprotective and anti-cancer effect in dermal cells. **Phytomedicine Plus**, v.1, n.4, 2021.

RAMOS-E-SILVA, M.; CELEM, L. R.; RAMOS-E-SILVA, S.; FUCCI-DA-COSTA, A. P. Anti-aging cosmetics: Facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v.31, n.6, p.750-758, 2013.

RAI, V. K.; MISHRA, N.; YADAV, K. S.; YADAV, N. P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of Controlled Release**, v.270, p.203-225, 2018.

RAO, M. A. **Rheology of fluid and semisolid food: principles and applications**. Aspen Publishers, 1999.

RAO, M. A. **Rheology of fluid, semisolid, and solid foods: principles and applications**. New York: Springer Science & Business Media, 2013.

RASHID, S.; JIN, Y.; ECOIFFIER, T.; BARABINO, S.; SCHAUMBERG, D. A.; DANA, M. R. Topical omega-3 and omega-6 fatty acids for treatment of dry eye. **Arch Ophthalmol.**, v.126, p.210-225, 2008.

RAY, P. D.; HUANG, B.-W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v.24, n.5, p.981–990, 2013.

REBOUÇAS, L. M. **NANOEMULSÕES À BASE DE ÁCIDO BETULÍNICO E ÓLEO DE LINHAÇA: UMA PROPOSTA PARA O TRATAMENTO DE CARCINOMA COLORRETAL**. Dissertação (Pós-Graduação em Química) - Universidade Federal do Ceará, p.106, 2019.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n.27, p.60-67, 2007.

REDDY, G. M.; RAO, V.; SARMA, D.; REDDY, T. K.; SUBRAMANYAM, P.; NAIDU, M. D. Evaluation of antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method of 40 medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, n.24, p.4082-4086, 2012.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H. de; PELUZIO, M. do C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P. da; QUEIROZ, M. E. L. R. de. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v.21, n.3, p.133–149, 2005.

RIBEIRO, R. C. de A.; BARRETO, S. T. A. G.; OSTROSKY, E. A.; ROCHA FILHO, P. A. da; VERÍSSIMI, L. M.; FERRARI, M. Production and Characterization of Cosmetic Nanoemulsions Containing *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill Extract as Moisturing Agent. **Molecules**, v.20, p.2492-2509, 2015.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RIEDIGER, N. D.; OTHMAN, R.; FITZ, E.; PIERCE, G. N.; SUH, M.; MOGHADASIAN, M. H. Low n-6: n-3 fatty acid ratio, with fish or flaxseed oil, in a high fat diet improves plasma lipids and beneficially alters tissue fatty acid composition in mice. **European Journal of Nutrition**, v.47, n.3, p.153-160. 2008.

RIGON, C.; GIULIANI, L. M.; STANGARLIN, M. F. L.; MATTIAZZI, J.; GOMES, F. P.; PEGORARO, N. S.; CRUZ, L.; FERREIRA, L. M. SISTEMAS NANOESTRUTURADOS CONTENDO ÓLEO DE LINHAÇA: desenvolvimento tecnológico e caracterização físico-química de nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas. **Santa Maria**, v.43, n.1, p.153-161, 2017.

ROCHA, F. D.; PEREIRA, R. C.; KAPLAN, M. A. C.; TEIXEIRA, V. L. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.17, n.4, 2007.

RODRIGUES, N. P.; SALVA, T. de J. G.; BRAGAGNOLO, N. Influence of Coffee Genotype on Bioactive Compounds and the In Vitro Capacity to Scavenge Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.4815-4826, 2015.

ROESLER, R.; MALTA, L.G.; CARRASCO, L.C.; HOLANDA, R.B.; SOUSA, C.A.S.; PASTORE, G.M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v.263, n.1-2, p.85-94, 2003.

ROMES, N. B.; WAHAB, R. A.; HAMID, M. A.; HASHIM, E. D-optimal design assisted *Elaeis guineensis* leaves extract in olive oil-sunflower seed nanoemulsions: development, characterization, and physical stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, p.1-14, 2020.

ROSADO, C.; TOKUNAGA, V. K.; SAUCE, R.; OLIVEIRA, C. A. de; SARRUF, F. D.; PARISE-FILHO, R.; MAURÍCIO, E.; ALMEIDA, T. S. de, VELASCO, M. V. R.; BABY, A. R. Another Reason for Using Caffeine in Dermocosmetics: Sunscreen Adjunvant. **Frontiers in Physiology**, v.10, n.519, 2019.

ROVER JR, L.; HOEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v.24, n.1, p.112-119, 2001.

RUDNIK, A.; SZSUCINSKA, A.; GWARDIAK, H.; SZULC, A.; WINIARSKA, A. Comparative studies of oxidative stability of linseed oil. **E. Thermochemica Acta**, v.370, n.1, p.135-140, 2001.

RUSSO, P. A. J.; HALLIDAY, G. M. Inhibition of nitric oxide and reactive oxygen species production improves the ability of a sunscreen to protect from sunburn, immunosuppression and photocarcinogenesis. **Br. J. Dermatol.**, v.155, n.2, p.408-415, 2006.

SADURNÍ, N.; SOLANS, C.; AZEMAR, N.; GARCÍA-CELMA, M. J. Studies on the formation of O/W nanoemulsions, by low-energy emulsification methods, suitable for pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.26, n.5, p. 438-445, 2005.

SAFAYA, M.; ROTLIWALA, Y. C. Nanoemulsions: A review on low energy formulation methods, characterization, applications and optimization technique. **Material Today: Proceedings**, v.27, n.1, p.454-459.

SAITO, P.; MELO, C. P. B.; MARTINEZ, R. M.; FATTORI, V.; CEZAR, T. L. C.; PINTO, I. C.; BUSSMANN, A. J. C.; VIGNOLI, J. A.; GEORGETTI, S. R.; BARACAT, M. M.; VERRI JR, W. A.; CASAGRANDE. The Lipid Mediator Resolvin D1 Reduces the Skin Inflammation and Oxidative Stress Induced by UV Irradiation in Hairless Mice. **Frontiers in Pharmacology**, v.9, p.1–15, 2018.

SAJJADI, S.; ZEFRA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with non-ionic surfactant pair sorbitanmonolaurate/polyoxyethylenesorbitanmonolaurate (Span20/Tween20). **Colloids and Surfaces**, v.218, p. 241 – 254, 2003.

SAMPAIO, C. I.; BOURBON, A. I.; GONÇALVES, C.; PASTRANA, L. M.; DIAS, A. M.; CERQUEIRA, M. A. Low energy nanoemulsions as carriers of thyme and lemon balm essential oil. **LWT**, v.154, 2022.

SANTOS, M. H. dos; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; GOUVÊA, C. M. C. P. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, v.30, n.3, 2007.

SANTOS, O. D. H.; MORAIS, J. M.; ANDRADE F. F.; AGUIAR, T. A.; ROCHA, F. P. A. Development of vegetable oil emulsion with lamellar liquid-crystalline structures. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.32, n.3, p.433-438, 2011.

SANTOS, A. C. F. dos; KALSCHNE, D. L.; VIEGAS, M. C.; VANINI, L. S.; BENASSI, M. de TOLEDO; LONNI, A. A. S. G. DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO

COSMECÊUTICA PARA REGIÃO DOS OLHOS COM EXTRATO PADRONIZADO DE CAFÉ VERDE. **Visão Acadêmica**, v.18, n.3, 2017.

SHIMODA, H.; SEKI, E.; AITANI, M. Inhibitory effect of green coffee bean extract on fat accumulation and body weight gain in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.6, n.9, p.1-9, 2006.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v.14, p.111- 125, 2015.

SCHMIDTS, T.; DOBLER, D.; GULDAN, A.-C.; PAULUS, N.; RUNKEL, F. Multiple W/O/W emulsions – Using the required HLB for emulsifier evaluation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.372, n.1-3, p.48-54, 2010.

SCHUCH, A. P.; MORENO, N. C.; SCHUCH, N. J.; MENCK, C. F. M. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. **Free Radical Biology and Medicine**, v.107, p.110–124, 2017.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharm. Res.**, v.12, p.687–692, 1995.

SEIBERT, J. B. **DESENVOLVIMENTO DE NANOEMULSÃO A PARTIR DO ÓLEO ESSENCIAL DE FLOHAS DE *Cymbopogon densiflorus* (Steud.) Stapf: AVALIAÇÃO DA SAZONALIDADE E ATIVIDADES BIOLÓGICAS**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Ouro Preto, p.83, 2015.

SELBACH, S. L. **Desenvolvimento e avaliação do potencial antioxidante de uma nanoemulsão de uso tópico**. Dissertação (Mestrado profissional em Biotecnologia Farmacêutica) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p.73. 2017.

ŠEVCÍKOVÁ, P.; VLATAVSKÁ, P.; KASPÁRKOVÁ, V.; KRECJČÍ, J. **Formation, Characterization and Stability of Nanoemulsions Prepared by Phase Inversion.**

In Proceedings of the 13th WSEAS International Conference on Mathematical and Computational Methods in Science and Engineering, Catania, Sicily, Italy, 2011.

SGRIGNOLI, M. R.; YAMASAKI, L.; SANCHES, O. de C.; GIUFFRIDA, R.; RICCI, C.L.; SANTOS, G. de C.; VALLE, H. F. D. do; ZULLIM, L. F. da C.; SILVA, D. A.; BASSO, K. M.; SILVA, M. C. A.; ANDRADE, F. A. Comparison of Topical 0.03% Tacrolimus in Almond and Linseed Oil to Treat Experimentally Induced Keratoconjunctivitis Sicca in Rabbits. **Int. J. Ophthalmic Pathol.**, v.2, n.3, p.1-5, 2013.

SHAHID, F.; ZHONG, Y. Measurement of antioxidant activity. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.757-781, 2015.

SHIVAKUMAR, A.; KUMAR, M. S. Y. Critical Review of the Analytical Mechanistic Steps in the Evaluation of Antioxidant Activity. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.48, p.214-236, 2018.

SILVA, E. C.; SOARES, I. C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toiletries (Ed. port.)**, v.8, n. 5, p.38-45, 1996.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SILVA JR., E. da S.; ZANON JR, G. B.; ZANELLA, I.; RAFFIN, R.; CIELO, V.; ROSSATO, J.; BULHÕES, L. O. S. FORMAÇÃO DE NANOEMULSÕES DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA CONTENDO ÓLEO DE SEMENTE DE ROMÃ. Ciências Naturais e Tecnológicas, **Santa Maria**, v.14, n.1, p.115-122, 2013.

SILVANDER, M.; HELLSTROM, A.; WARNHEIM, T.; CLAEISSON, P. Rheological properties of phospholipid-stabilized parenteral oil-in-water emulsions – effects of

electrolyte concentration and presence of heparin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.252, n.1-2, p.123-132, 2003.

SINGH, M.; SINGH, S. P.; RACHANA, R. Development, characterization and cytotoxicity evaluation of *Gingko biloba* extract (EGB761) loaded microemulsion for intra-nasal application. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v.7, n.1, p.24-34, 2017.

SMITH, E. H.; MALBACH, H. I.; SUBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions as suspensions**. New York: Macel Dekker, 2000.

SOCRIER, L.; QUÉRO, A.; VERDU, M.; SONG, Y.; MOLINIÉ, R.; MATHIRON, D.; PILARD, S.; MESNARD, F.; MORANDAT, S. Flax phenolic compounds as inhibitors of lipid oxidation: Elucidation of their mechanisms of action. **Food Chemistry**, v.274, p.651-658, 2019.

SOLANS, C.; ESQUENA, J.; FORGIARINI, A. M.; USON, N.; MORALES, D.; IZQUIERDO, P.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. In: MITTAL, K. L.; SHAH, D. O. **Adsorption and Aggregation of Surfactants in Solution**.1.ed. 2003. p. 525–554.

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

SOLÉ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M. Study of nanoemulsion formation by dilution of microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.**, v.376, p.133–139, 2012.

SONNEVILLE-ABRUN, O.; SIMONNET, J.T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsion: a new vehicle for skincare products. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.108-109, p.145-149, 2004.

SOTO, M.; FALQUÉ, E.; DOMÍNGUEZ, H. Relevance of Natural Phenolics from Grape and Derivative Products in the Formulation of Cosmetics. **Cosmetics**, p.259–276, 2015.

SOUZA, R. O. de; ALVES, G. de A. D.; AGUILLERA, A. L. S.; ROGEZ, H.; FONSECA, M. J. V. Photochemoprotective effect of a fraction of a partially purified extract of *Byrsonima crassifolia* leaves against UVB-induced oxidative stress in fibroblasts and hairless mice. **J. Photochem. Photobiol. B.**, v.178, p.53-60, 2018.

STEFANELLO, N.; SPANEVELLO, R. M.; PASSAMONTI, S.; PORCIÚNCULA, L.; BONAN, C. D.; OLABIYI, A. A.; ROCHA, J. B. T. de; ASSMANN, C. E.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. Coffee, caffeine, chlorogenic acid and the purinergic system. **Food and Chemical Toxicology**, v.123, p.298-313, 2019.

STEFFE, J. F. **Rheological methods in food process**. Engineering. East Lansing: Freeman Pres, 1992.

STELMACH, E.; POHL, P.; MADEJA, A. S. The content of Ca, Cu, Fe, Mg and Mn and antioxidant activity of green coffee brews. **Food Chemistry**, v.182, p.302- 308, 2015.

STORPIRTS, S.; GONÇALVES, J. E.; CHIANN, C. **Ciências Farmacêuticas: Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v.8, n.6, p.583–599, 1990.

SUTRADHAR, K. B.; AMIN, M. L. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. **Euro. J. Nanomed.**, v.97, 2013.

SYMONIUK, E.; RATUSZ, K; KRYGIER, K. **Oxidative stability and the chemical composition of market cold-pressed linseed oil**. European Journal of Lipid Science and Technology, v.119, 2017.

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

TAMILVANAN, S.; KHOURY, K.; GILHAR, D.; BENITA, S. Ocular delivery of cyclosporin A I. Design and characterization of cyclosporin A-loaded positively-charged submicron emulsion. **S. T. P. Pharma Science**, v.11, n.6, p.421-426, 2001.

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

TEO, B. S. X.; BASRI, M; ZAKARIA, M. R. S.; SALLEH, A. B.; RAHMAN, R. N. Z. R. A.; RAHMAN, M. B. A. A potential tocopherol acetate loaded palm oil esters-in-water nanoemulsion for nanocosmeceuticals. **Journal of nanobiotechnology**, v.8, p.1-11, 2010.

TEWARI, A.; LAHMANN, C.; SARKANY, R.; BERGEMANN, J.; YOUNG, A. R. Human erythema and matrix metalloproteinase-1 mRNA induction, in vivo, share an action spectrum which suggests common chromophores. **Photochemical & Photobiological Sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology**, v.12, p.95–103, 2013.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. **Food Chem.**, v.15, p.219-228, 1984a.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R. Chlorogenic acid composition of instant coffees. **Analyst**, v.109, p.263–266, 1984b.

TZANG, B. S.; YANG, S. F.; FU, S. G., YANG, H. C.; SUN, H. L.; Chen, Y. C. Effects of dietary flaxseed oil on cholesterol metabolism of hamsters. **Food Chemistry**, v.114, n.4, p.1450-1455, 2009.

VAISEY-GENSER, M. e MORRIS, D. H. History of the cultivation and uses of flaxseed. In: ALISTER, D. M.; WESTCOTT, N. D. Flax: The Genus *Linum*. New York, v.34, 307p. 2003.

VEGA, A.; LEÓN, J. A. de; REYES, S. M. Determinación del Contenido de Polifenoles Totales, Flavonoides y Actividad Antioxidante de 34 Cafés Comerciales de Panamá. **Inf. Tecnol.**, v.28, n.4, 2017.

VELASCO, M. V. R.; MACIEL, C. O. M.; SARRUF, F. D.; PINTO, C. A. S. O.; CONSIGLIERI, V. O.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Desenvolvimento e Teste Preliminar da Estabilidade de formulações cosméticas acrescidas de extrato comercial de *Trichilia catigua* Adr. Juss (e) *Ptychopetalum olacoides* Benth. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.29, n.2, p.181-196, 2008.

VIEIRA, L. do C. G. **Características fotoquímicas e propriedades antioxidantes do grão de café verde**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, p.41. 2015.

VIGNOLI, J. A.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. Antioxidant activity, polyphenols, caffeine and melanoidins in soluble coffee: The influence of processing conditions and raw material. **Food Chemistry**, v.124, p.863-868, 2011.

VIGNOLI, J. A.; VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. de T. Roasting process affects differently the bioactive compounds and the antioxidant activity of arabica and robusta coffees. **Food Research International**, v.61, p.279-285, 2014.

VIGNOLI, J. A.; VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T.; VIGNOLI, J. A.; VIEGAS, M. C.; BASSOLI, D. G.; BENASSI, M. T. **Coffee Brews Preparation: Extraction of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity**. In: John L. Massey. (Org.). Coffee: Production, Consumption and Health Benefits. Series: Food and Beverage Consumption and Health, v.1, p.29-50, 2016.

VINSON, J. A.; BURNHAM, B. R.; NAGENDRAN, M. V. randomized, double-blind, placebo controlled, linear dose, crossover study to evaluate the efficacy and safety of

a green coffee bean extract in overweight subjects. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v.5, p.21-27, 2012.

XAVIER, M. B. **COMPOSTOS BIOATIVOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA DE DUAS CULTIVARES DO CAFÉ ARÁBICA (*Coffea arabica* L.)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, p.101, 2017.

WAGNER, H. et al. Interrelation of permeation and penetration parameters obtained from in vitro experiments with human skin and skin equivalents. **Journal of controlled release**, v.75, n 3, p.283-295, 2001.

WALIA, M.; RAWAT, K.; BHUSHAN, S.; PADWAD, Y. S.; SINGH, B. Fatty acid composition, physicochemical properties, antioxidant and cytotoxic activity of apple seed oil obtained from apple pomace. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.94, p.929-934, 2014.

WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. **Percutaneous absorption of sunscreens**. In: BRONAUGH, R. L.; MAIBACH, H. I. Topical absorption of dermatological products. New York: Dekker, p.465–481. 2002.

WANG, J. J.; SUNG, K. C.; HU, O. Y.-P.; YEH, C.-H.; FANG, J.-Y. Submicron lipid emulsion as a drug delivery system for nalbuphine and its prodrugs. **Journal of Controlled Release**, v.115, p.140-149, 2006.

WANG, L.; MUTCH, K. J.; EASTOE, J.; HEENAN, R. K.; DONG, J. Nanoemulsions prepared by a two-step low-energy process. **Langmuir: The ACS Journal of Surfactants and Colloids**, v.24, n.12, p.6092-6099, 2008.

WANG, S.; MARCONE, M. F.; BARBUT, S.; LIM, L. T. Fortification of dietary biopolymers based packaging material with bioactive plant extracts. **Food Research International**, v.49, p.80-91, 2012.

WANG, S.; SARRIÁ, B.; MATEOS, R.; GOYA, L.; BRAVO-CLEMENTE, L. TNF- α -induced oxidative stress and endothelial dysfunction in EA.hy926 cells is prevented by mate and green coffee extracts, 5-caffeoylquinic acid and its microbial metabolite, dihydrocaffeic acid. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.70, n.3, p.267-284, 2018.

WILSON, R. J.; LI, Y.; YANG, G.; ZHAO, C.-X. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, v.64, p.85-97, 2022.

WOLLINGER, A.; PERRIN, ÉLODIE.; CHAHBOUN, J.; JEANNOT, V.; TOURAUD, D.; KUNZ, W. Antioxidant activity of hydro distillation water residues from *Rosmarinus officinalis* L. leaves determined by DPPH assays. **Comptes Rendus Chimie**, v.19, n.6, p.754–765, 2016.

YI, J.; LI, Y.; ZHOUNG, F.; YOKOYAMA, W. The physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of beta-carotene in oil-in-water sodium caseinate emulsions. **Food Hydrocolloids**, v.35, p.19–27, 2014.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H.-H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema: an in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, n. 232, 2006.

YILMAZ, M. D. Layer-by-layer hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte coated mesoporous silica nanoparticles as pH-responsive nanocontainers for optical bleaching of cellulose fabrics. **Carbohydrate Polymers**, v.146, p.174–180, 2016.

YOUNG, A. R.; CLAVEAU, J.; ROSSI, A. B. Ultraviolet radiation and the skin: Photobiology and sunscreen photoprotection. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.76, p.100–109, 2017.

YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOU-CHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v.38, p.13-24, 2016.

ZAID, M. A.; AFAQ, F.; SYED, D. N.; DREHER, M.; MUKTAR, H. Inhibition of UVB-mediated Oxidative Stress and Markers of Photoaging in Immortalized HaCaT Keratinocytes by Pomegranate Polyphenol Extract POMx. **Photochem. Photobiol.**, v.83, n.4, p.882–888, 2007.

ZAIN, M. Z. M.; BABA, A. S.; SHORI, A. B. Effect of polyphenols enriched from green coffee bean on antioxidant activity and sensory evaluation of bread. **Journal of King Saud University – Science**, v.30, n.2, p.278-282, 2018.

ZHANG, Z.; McCLEMENTS, D. J. Overview of Nanoemulsion Properties: Stability, Rheology, and Appearance. **Nanoemulsions**. United States: Elsevier, 2018. p.21-49.

ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA, A. B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, v. 3, p. 13-18, 2002.

ZORZI, G. K.; CARAGNATO, F.; MOREIRA, J. C. F.; TEIXEIRA, H. F.; CARVALHO, E. L. S. Antioxidant Effect of Nanoemulsions Containing Extract of *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C.—*Asteraceae*. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v. 17, n.4, 2016.

ÇINAR. A review on nanoemulsions: Preparation methods and stability. **Journal of Engineering Science**, v.18, n.1, p.73-83, 2017.