

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR E SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

RICARDO COSTA DE MORAES JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE MICROEMULSÕES PARA VEICULAÇÃO DE
FRAGRÂNCIAS.**

Vitória da Conquista
2015

RICARDO COSTA DE MORAES JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DE
ESTABILIDADE DE MICROEMULSÕES PARA
VEICULAÇÃO DE FRAGRÂNCIAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Freire Leite

Vitória da Conquista
2015

AGRADECIMENTOS

Já dizia o filósofo grego Cícero (106 – 43 a.C): “Nenhum dever é mais importante que a Gratidão”. Mais do que resultados, conclusões ou protocolos, o presente trabalho representa a concretização de um sonho. Sonho o qual muitos fizeram parte. E é então chegado o momento de externar toda minha felicidade por terem compartilhado comigo esta estrada.

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família, meu “ouro de mina” e aconchego: Meu pai (**Ricardo**) e minha mãe (**Cláudia**), pela criação, pelos exemplos, pelo apoio, sacrifícios e todo suporte neste momento de pós-graduação e em toda a minha trajetória humana. Sem vocês, minha existência não faria sentido. À minha irmã (**Nadjla**) por todo companheirismo e às minhas amadas sobrinhas (**Maria Luísa** e **Maria Fernanda**) por tornar minha vida ainda mais alegre. Grato por serem as pessoas mais importantes da minha vida.

Agradeço ao meu orientador: **Professor Dr. Mateus Freire Leite**. Melhor exemplo do que almejo alcançar como pessoa e como profissional. Sinônimo de competência, honestidade, caráter e humildade. Grato pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e conselhos ministrados e pela paciência para com meus erros; por fomentar em mim e em todos os seus orientandos o crescimento de um espírito de curiosidade e de busca constante por inovação e evolução. Obrigado também pela coragem como voluntário nos testes das fragrâncias. Serei eternamente grato pelas contribuições fundamentais ao meu futuro.

Agradecimentos também ao **Professor Msc. Juliano Geraldo Amaral**, outro grande Mestre, por participar de maneira fundamental na minha formação, contribuindo com orientações e conselhos pertinentes ao trabalho e à vida. Obrigado por toda ajuda neste e em outros trabalhos.

E como não agradecer à amada **Família CentoInove** (Laboratório 109)? Melhor ambiente de trabalho não poderia haver para a realização deste projeto. A todos que trilharam seus caminhos no laboratório contribuindo com muito trabalho dedicação e claro, muitos momentos alegres, a minha gratidão. Obrigado a Thau, Palloma, às Milleninhas, Hévila, Lucimara, Eduardo Bruno, Ana Carolina e Danyo pela excelente convivência.

Agradecimentos especiais à Mai Mai, Lore, Mahala, Lary, Dan, Claudinha, Nina e Geu Rayanna pelos momentos maravilhosos e divertidos que guardarei para sempre na memória e pelas mais que valorosas ajudas nos diversos momentos da condução deste trabalho!

Agradecimentos a Biotenologista **Patrícia Guerra** pela ajuda na coleta do óleo fixo de *Spondias tuberosa* Arr. Cam. Muito obrigado Paty!!

Aos colegas da Pós-graduação em Biociências e grandes amigos: **Geysa (Geu), Cassynha, Denis, Rafa, Caline e Andressa**. Obrigado pelos momentos de estudos, pelas várias resenhas e pelo compartilhamento de expectativas, anseios e apreensões diversas nestes últimos dois anos.

Aos grandes amigos e parceiros **Denisar Palmito dos Santos** e **Mússio Pirajá Mattos** pelas tantas resenhas aflições compartilhadas na graduação e também na pós-graduação. Pelos conselhos, discussões e acima de tudo pela amizade sincera. Fica o meu agradecimento!

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA - IMS/CAT** por representar um importante papel na minha formação desde minha graduação em farmácia, e agora na minha pós-graduação. Agradecimento a todos os professores, coordenadores e equipe do **Programa de Pós-graduação em Biociências** pelas aulas e pela excelência com a qual é conduzido este curso.

Agradeço à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia** pelo suporte financeiro através da bolsa de mestrado concedida.

Obrigado a todos que participaram deste trabalho, de forma direta ou indireta! Este trabalho é reflexo da contribuição significativa de vocês.

*“O homem nasceu para aprender, aprender
tanto quanto a vida lhe permita.”*

Guimarães Rosa.

RESUMO

MORAES JÚNIOR, Ricardo Costa de. Desenvolvimento, caracterização e estudo de estabilidade de microemulsões para veiculação de fragrâncias. 104f. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

A utilização de fragrâncias mostra-se como um fenômeno antropológico mundial, sendo registrada a utilização de produtos aromáticos desde os primórdios da humanidade. Produtos de perfumaria fina são comumente comercializados, em diferentes concentrações, veiculados em álcool etílico. Observa-se uma tendência mercadológica de preferência por produtos cosméticos que promovam a substituição do etanol. Neste sentido, tem-se lançado mão de sistemas nanométricos para veiculação de fragrâncias, com destaque para as microemulsões. No presente trabalho, desenvolveu-se caracterizou-se e avaliou-se a estabilidade de microemulsões como veículo livre de álcool para produtos de perfumaria. Foi desenvolvida uma fragrância a partir das substâncias galaxolide; salicilato de amila; cedramber; ionona beta; geraniol; floralozone; essencia sintética de maracujá, bergamota base e óleo essencial de *Citrus limon*. Na análise por cromatografia gasosa, a fragrância foi caracterizada, sendo identificados 15 picos com tempos de retenção entre 5,565 e 40,116min. A análise permitiu definir como notas de cabeça as substâncias do óleo essencial de *Citrus limon* e bergamota base; salicilato de amila, ionona beta, floralozone e geraniol como notas de corpo e galaxolide e cedramber como notas de base. Para o desenvolvimento de microemulsões foram construídos 4 diagramas pseudo-ternários: 1. PEG 40 (óleo de rícino hidrogenado e etoxilado)/*Span* 80 (monooleato de sorbitano)/*Tween* 20 (monolaurato de sorbitano 20) (1:1:1), Óleo fixo de *Spondias tuberosas* Arr. Cam; 2. PEG 40/*Span* 80 /*Tween* 20 (1:1:1), ciclometicone; 3. PEG 40/*Span* 85 (trioleato de sorbitano) /*Tween* 20 (2:1:1), Miristato de Isopropila/Ciclometicone (8:2); 4. PEG 40/*Span* 80 /*Tween* 20 (1:1:1), Fragrância desenvolvida (T64). Foi selecionada uma microemulsão do Diagrama 4 como adequada para a veiculação da fragrância proposta, a qual foi caracterizada quanto ao tamanho de gotícula ($11,68\text{nm} \pm 0,061$), índice de polidispersividade ($0,148 \pm 0,004$), potencial zeta ($-7,94\text{mV} \pm 0,37$), reologia (fluido newtoniano), viscosidade ($7,510 \text{ cP} \pm 0,061$), pH ($6,61 \pm 0,045$), condutividade ($90,4 \mu\text{S/cm} \pm 0,70$), densidade relativa ($1,0269 \text{ g/ml} \pm 0,0003$), índice de refração ($1,3723 \pm 0,002$) e microscopia óptica de luz polarizada (sistema isotrópico). O sistema mostrou-se estável frente aos estudos de estabilidade preliminar (centrifugação e estresse térmico) e estudo de estabilidade acelerada. O ponto isoelétrico da emulsão se situou em pH 1,0. A formulação de produto foi desenvolvida com a adição de sistema conservante

composto de triclosano e BHT. O produto de perfumaria final apresentou potencial de irritação ocular moderada pelo método de HET-CAM. Os resultados obtidos convergem para um produto nanotecnológico de alto valor agregado, estável e capaz de substituir o álcool, preservando as características aromáticas inerentes à fragrância.

Palavras-chave: Microemulsão. Nanotecnologia. Fragrância, perfume livre de álcool.

ABSTRACT

MORAES JÚNIOR, Ricardo Costa de. Development, characterization and stability study of microemulsions as a vehicle for fragrances. 104pp. 2015. Dissertation (Master) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

The use of fragrances appears like a global anthropological phenomenon, being registered the use of aromatic products since the dawn of humanity. Fine perfumery products are commonly sold in different concentrations using ethanol as vehicle. It has been observed a marketing trend towards a preference for cosmetic products that promote the substitution of ethanol. In this context, it has been used nanometric vehicle systems for fragrances, especially microemulsions. In this study, it was developed, characterized and evaluated the stability of microemulsions as alcohol-free vehicle for perfumery products. A fragrance was developed from the substances galaxolide, amyl salicilate, cedramber, ionone beta, geraniol, floralozone, synthetic passion fruit essence, bergamot base and essential oil of *Citrus limon*. In the gas chromatography analysis, the fragrance was characterized, and were indentified 15 peaks with retention time raging from 5,565 to 40,116 min. The analysis set the substances of *Citrus limon* essential oil and bergamot base as top/head notes; amyl salicilate, ionone beta, floralozone and geraniol as middle notes and galaxolide and cedramber as base notes. For the microemulsion development were constructed 4 pseudo-ternary diagrams: 1. PEG 40 (hidrogenate and etoxylate castor oil)/ *Span* 80 (sorbitan monooleate)/ *Tween* 20 (sorbitan monolaurate 20) (1:1:1), *Spondias tuberosas* Arr. Cam. oil; PEG 40/*Span* 80 /*Tween* 20 (1:1:1), cyclomethicone; 3. PEG 40/*Span* 85 (sorbitan trioleate)/*Tween* 20 (2:1:1), Isopropyl myristate/ cyclomethicone (8:2); 4. PEG 40/ *Span* 80/ *Tween* 20 (1:1:1), developed fragrance (T64). It was selected a microemulsion from diagram 4 as suitable for fragrance vehicle, which was characterized as the droplet size ($11.68\text{nm} \pm 0.061$), polydispersity index (0.148 ± 0.004), zeta potential ($-7.94\text{mV} \pm 0.37$), reology (newtonian flow behavior), viscosity ($7.51\text{cP} \pm 0.06$), pH (6.61 ± 0.045), conductivity ($90.4 \mu\text{S}/\text{cm} \pm 0.70$), relative density ($1.0269 \text{g}/\text{ml} \pm 0.0003$), refraction index (1.3723 ± 0.002) and polarized light microscopy (isotropic system). The system appears to be stable in the preliminary stability studies (centrifugation and termical stress) and accelerated stability study. The isoelectric point of microemulsion stood at pH 1.0. The product formulation was developed with the addition of preservative system consisting of triclosan and BHT. The final perfumery product has shown moderate eye irritation potential by the HET-CAM method. The obtained results converge to a

nanotechnological product with high added value, stable and able to replace alcohol, preserving the aromatic characteristics of the fragrance.

Keywords: Microemulsion. Nanotechnology. Fragrance, alcohol-free perfume.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Anatomia do sistema olfato-sensorial . (Disponível em: <https://auladefisiologia.wordpress.com/2010/10/03/sistema-sensorial-orgaos-do-sentido>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2015) ----- 5
- Figura 2.** Estrutura neuronal do bulbo olfatório. (MENINI et al., 2004 – Modificado). ----- 6
- Figura 3.** Ativação de receptores olfatórios por odorantes (BUCK; AXEL, 1991 - Adaptado). ----- 7
- Figura 4.** Estrutura de perfumes proposta por Carles (1962). ----- 9
- Figura 5.** Avaliação de parâmetros de performance de fragrâncias. ----- 10
- Figura 6.** Perspectiva da nanoescala em relação a objetos naturais: (a) insetos; (b) fio de cabelo; (c) grãos de pólen; (d) eritrócitos; (e) nanocristais de cobalto; (f) vírus bacteriófago; (g) molécula de Ácido acetilsalicílico (MIHRANYAN et al., 2011). ----- 13
- Figura 7.** Separação de fases de 2 líquidos imiscíveis, em ausência de tensoativos. ----- 15
- Figura 8.** Tensão interfacial existente na superfície de dois líquidos imiscíveis. 16
- Figura 9.** Representação da estrutura geral dos tensoativos. ----- 17
- Figura 10.** Formação de Emulsões: A figura A mostra as fases hidrofílica e lipofílica inicialmente separada. O tensoativo é adicionado e interage com a fase aquosa e fase oleosa através de sua cabeça hidrofílica e cauda apolar, respectivamente (B). A fim de manter-se em conformação mais favorável energeticamente, as moléculas do tensoativo se posicionam na região de interface entre a fase aquosa e oleosa, estando a cabeça hidrofílica voltada para a fase aquosa e a cauda lipofílica para a fase oleosa (C). Após saturação da interface água/óleo, as moléculas de tensoativo livres migram para outras regiões de interface, como a região de interface líquido/recipiente e a interface ar/líquido (D). A adição de mais tensoativo faz também saturar estas duas interfaces, obrigando o tensoativo se organizar em micelas, isolando a porção insolúvel da molécula no interior (E). A esta concentração, dá-se o nome de Concentração Micela Crítica (CMC). O fornecimento de energia cinética, através de temperatura ou agitação em concentrações superiores à CMC permite a dispersão dos constituintes oleosos na água em gotículas, que são estabilizadas pelo tensoativo, formando emulsão.----- 18
- Figura 11.** Microemulsões óleo em água, água em óleo e bicontínua. ----- 19
- Figura 12.** Umbuzeiro. (Disponível em: https://www.embrapa.br/bme_imagens/o/58280040o.jpg). Acesso em 13 de

Março de 2015). -----	21
Figura 13. Fruto do umbú. (Disponível em: < http://www.cerratinga.org.br/wp-content/uploads/2013/04/umbu-frutos.jpg > Acesso em 12 de Março de 2015.--	22
Figura 14. Metodologia de Desenvolvimento da Fragrância. -----	28
Figura 15. Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometro de massas Shimadzu QP2010 (Disponível em: < http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/gcms/images/gcms-qp2010ultra.jpg >. Acesso em 05 de abril de 2015). -----	29
Figura 16. Extração de óleo em aparelho soxleth. (Disponível em: < http://www.ebah.com.br/content/ABAAABN34AL/extracao-lipidios-alimentos > Acesso em 05 de abril de 2015). -----	30
Figura 17. Procedimento de Titulação no diagrama de fases. -----	32
Figura 18. Zetasizer Nano ZS - ZEN3601. (Disponível em: < https://www.ices.a-star.edu.sg/media/1186/cps14.jpg > Acesso em 05 de abril de 2015) -----	35
Figura 19. Reômetro <i>Brookfield</i> DV-III Ultra e spindle ULA. -----	36
Figura 20. Cromatograma obtido da análise da fragrância em CG-EM via <i>headspace</i> . A linha em vermelho corresponde ao perfil cromatográfico da fragrância em veículo alcoólico. A linha em preto corresponde ao perfil da fragrância veiculada em microemulsão. -----	40
Figura 21. Diagrama de fases pseudo-ternário 1, formado por PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1), Óleo fixo de <i>Spondias tuberosa</i> e Água. As regiões em vermelho, verde e azul indicam respectivamente sistemas bifásicos (SB), Emulsões (E) e Microemulsões (ME). -----	47
Figura 22. Diagrama de fases pseudo-ternário 2, formado por PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1), Silicone volátil e Água. As regiões em vermelho, verde e azul indicam respectivamente sistemas bifásicos (SB), Emulsões (E) e Microemulsões (ME). -----	48
Figura 23. Diagrama de fases pseudo-ternário 3, formado por PEG 40:Span 85:Tween 20 (2:1:1), Miristato de Isopropila:Silicone Volátil (8:2) e Água. As regiões em vermelho, verde e azul indicam respectivamente sistemas bifásicos (SB), Emulsões (E) e Microemulsões (ME). -----	49
Figura 24. Diagrama de fases pseudo-ternário 4, formado por PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1), Fragrância T64 e Água. As regiões em verde e azul indicam respectivamente emulsões (E) e microemulsões (M). -----	50
Figura 25. Microemulsões selecionadas do diagrama 4 para análises de	

tamanho de gotículas, índice de polidispersividade, aspecto macroscópico e centrifugação. (E) Emulsão e (M) Microemulsão, (1) Microemulsão 1, (2) Microemulsão 2, (3) Microemulsão 3 e (4) Microemulsão 4. -----	51
Figura 26. Apecto macroscópico das microemulsões desenvolvidas. Microemulsão 1 (1), Microemulsão 2 (2), Microemulsão 3 (3) e Microemulsão 4 (4). -----	52
Figura 27. Comportamento reológico da microemulsão desenvolvida. -----	53
Figura 28. Resultados de microscopia de luz polarizada da microemulsão 4 (triplicata). -----	54
Figura 29. Comportamento da condutividade da microemulsão selecionada com a adição gradativa de água. -----	54
Figura 30. Aspecto macroscópico da microemulsão antes (A) e após (B) centrifugação a 3000rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. -----	55
Figura 31. Avaliação das diferentes características físico-químicas da microemulsão durante o estresse térmico. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 3). (A) Tamanho de gotículas, (B) Índice de polidispersividade, (C) Mobilidade eletroforética, (D) Potencial zeta, (E) pH e (F) Condutividade. -----	56
Figura 32. Representação gráfica para identificação do ponto isoelétrico da microemulsão selecionada. Os valores são representados pela média e desvio padrão (n = 3). -----	57
Figura 33. Estabilidade Acelerada: Evolução do tamanho de gotículas nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C).-----	58
Figura 34. Estabilidade Acelerada: Evolução do índice de polidispersividade nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C). -----	59
Figura 35. Estabilidade Acelerada: Evolução do potencial zeta nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C). -----	60
Figura 36. Estabilidade Acelerada: Evolução da condutividade nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C). -----	61
Figura 37. Estabilidade Acelerada: Evolução da mobilidade eletroforética nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C). -----	62
Figura 38. Estabilidade Acelerada: Evolução do pH nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C). -----	63
Figura 39. Pirâmide olfativa de acordo com o perfil cromatográfico da fragrância T64..-----	68

Figura 40. Escala granulométrica das emulsões (ANSEL et al., 1999). ----- 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação proporcional das misturas de tensoativo/co-tensoativo e fase oleosa para construção de diagrama de fases pseudo-ternário. -----	32
Tabela 2. Composição dos diagramas de fases desenvolvidos. -----	33
Tabela 3. Formulação do produto com seus componentes e suas funções. -----	37
Tabela 4. Esquema da escala de irritação dos efeitos observados no método HET-CAM em decorrência do tempo. -----	38
Tabela 5. Classificação do potencial de irritação, adaptado de Luepke (1985). -----	39
Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento.-----	42
Tabela 7. Compostos identificados e quantificados nas análise por CG-EM. IRobs = Índice de retenção observado; IRref = Índice de retenção observado em referência (ADAMS, 1995). -----	46
Tabela 8. Composição percentual dos componentes das microemulsões selecionadas. -----	51
Tabela 9. Tamanho de gotículas e índice de polidispersividade das microemulsões selecionadas. -----	52
Tabela 10. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida. Os valores são representados pela média e desvio padrão (n = 3). -----	53
Tabela 12. Composição do produto de perfumaria desenvolvido. -----	64
Tabela 13. Escore dos fenômenos irritantes observados por meio do método HET-CAM e a classificação final do grau de irritação do produto de perfumaria das soluções controle NaCl 0,9% e NaOH 0,1M. -----	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/O	Emulsão Água em Óleo
AMPc	Adenosina Mono-fosfato cíclico
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina Tri-fosfato
BHT	Butil-Hidroxi-Tolueno
DENV-2	Dengue Vírus tipo 2
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à espectrômetro de massas
CMC	Concentração Micelar Crítica
CO₂	Dióxido de Carbono
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
HET-CAM	<i>Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane</i>
MCA	Membrana cório-alantóide
MTT	3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
O/A	Emulsão Óleo em água
O.E.	Óleo Essencial
PDI	Índice de polidispersividade
PEG 40	Óleo de Rícino Hidrogenado e Etoxilado
pH	Potencial hidrogenionico
PIB	Produto Interno Bruto
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
rpm	Rotações por minuto
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Percepção de odores e o sistema olfato-sensorial	4
2.2 Fragrâncias	8
2.3 Desenvolvimento e inovação em fragrâncias, fragrâncias livre de álcool e nanotecnologia	11
2.3.1 Microemulsões	14
2.4 <i>Spondias tuberosa</i> Arr. Cam.	20
3. JUSTIFICATIVA	24
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral	26
4.2. Objetivos específicos	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância	27
5.1.1 Desenvolvimento da Fragrância	27
5.1.2 Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometro de Massas (CG-EM).	29
5.2 Obtenção do óleo fixo de <i>Spondias tuberosa</i> Arr. Cam	29
5.3 Desenvolvimento e seleção de microemulsões	31
5.3.1. Construção de diagramas de fases pseudo-ternário	31
5.3.2 Seleção de microemulsões	33
5.4 Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida	34
5.4.1 Microscopia de luz polarizada	34
5.4.2 pH	34
5.4.3 Condutividade	34
5.4.4. Densidade Relativa	34
5.4.5 Índice de Refração	34
5.4.6 Tamanho de gotículas e índice de polidispersividade	35
5.4.7 Potencial zeta	35
5.4.8 Reologia	35
5.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida	36
5.5.1. Teste de estabilidade preliminar	36

5.5.1.1. Centrifugação -----	36
5.5.1.2 Estresse térmico -----	36
5.5.2. Avaliação do potencial zeta em função da variação de pH -----	36
5.5.3. Estudo da estabilidade acelerada -----	37
5.6. Obtenção de formulação de produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida -----	37
5.7. Avaliação <i>in vitro</i> da segurança do produto desenvolvido -----	37
5.7.1 Teste de irritabilidade ocular – teste em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM) -----	37
6. RESULTADOS -----	40
6.1 Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância -----	40
6.1.1 Desenvolvimento da fragrância -----	40
6.1.2. Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada á Espectrometro de Massas (CG-EM) -----	40
6.2. Obtenção do óleo fixo de <i>Spondias tuberosas</i> Arr. Cam. -----	46
6.3. Desenvolvimento e seleção de microemulsões -----	46
6.3.1. Construção de diagrama de fases pseudo-ternários -----	46
6.3.2. Seleção das microemulsões -----	50
6.4. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida -----	53
6.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida -----	54
6.5.1. Teste de estabilidade preliminar -----	54
6.5.1.1. Centrifugação -----	54
6.5.1.2. Estresse térmico -----	55
6.5.2. Avaliação do potencial zeta em função da variação de pH -----	57
6.5.3. Estudo da estabilidade acelerada -----	57
6.6 Obtenção de formulação de produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida -----	64
6.7. Avaliação <i>in vitro</i> da segurança do produto desenvolvido -----	64
6.7.1 Teste de irritabilidade ocular – teste em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM) -----	64
7. DISCUSSÃO. -----	66
7.1. Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância. -----	66
7.1.1. Desenvolvimento da Fragrância. -----	66

7.1.2. Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrômetro de Massas (CG-EM) -----	67
7.2. Obtenção do óleo fixo da semente de Spondias tuberosa Arr. Cam. -----	69
7.3. Desenvolvimento e seleção de microemulsões -----	70
7.3.1. Construção de diagramas de fases pseudo-ternário -----	70
7.3.2. Seleção de microemulsões -----	73
7.4. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida -----	76
7.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida -----	80
7.5.1. Teste de Estabilidade Preliminar -----	81
7.5.1.1. Centrifugação -----	82
7.5.1.2. Estresse térmico -----	82
7.5.2. Avaliação do potencial zeta em função do pH -----	83
7.5.3. Estudo de Estabilidade Acelerada -----	84
7.6. Obtenção de formulação de produto de perfumaria contendo a microemulsão desenvolvida -----	85
7.7. Avaliação in vitro da segurança do produto desenvolvido -----	86
7.7.1. Teste de irritabilidade ocular – teste em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM) -----	86
8. CONCLUSÃO -----	89
9. REFERÊNCIAS -----	91

1. Introdução

A busca pela beleza abrange um conjunto de padrões estéticos formados em diferentes contextos sociais e culturais, ocupando lugar de grande importância sobre diversos aspectos da vida humana (MIGUEL, 2012). A história do uso de cosméticos, nesse contexto, reflete a história da evolução da humanidade. O uso de cosméticos é registrado desde a pré-história, sendo propósitos de sua utilização a proteção do corpo às intempéries da natureza, bem como o uso com fins religiosos e ritualísticos (BUTLER, 2000). Os avanços científicos da era contemporânea, associado ao aumento da qualidade de vida e longevidade, tem fomentado a busca pela juventude como estado ideal de ser e transformando o uso de produtos de higiene e cosméticos num fenômeno universal, subsidiando o crescimento de um setor industrial que visa o atendimento das demandas de diversos segmentos sociais através de extenso investimento em inovação (CAPANEMA et al., 2007; GALEMBECK; CSORDA, 2015; HUF et al., 2013; PALÁCIOS, 2006).

O mercado de cosméticos, produtos de higiene pessoal e perfumaria, representa um importante setor econômico mundial arrecadando nos anos de 2012 e 2013 valores superiores a US\$ 440 bilhões. O mercado brasileiro contribui de maneira significativa para esta estatística, assumindo, em 2013 o posto de 3º maior mercado consumidor do mundo, atrás apenas dos mercados norte-americano e chinês, com uma arrecadação de US\$ 43,0 bilhões, respondendo por 9,5% das vendas mundiais. O setor industrial brasileiro apresenta crescimento médio nos últimos 18 anos igual a 9,8%, valor superior ao da média das indústrias e do produto interno bruto (PIB). Fatores como o aumento do acesso devido ao aumento de renda; participação da mulher no mercado de trabalho, aumento da produtividade e inovação tecnológica justificam tais resultados (ABIHPEC, 2014).

Os cosméticos podem ser classificados quanto ao seu uso em cosméticos para cuidados com a pele, cuidados capilares, orais e fragrâncias. No primeiro grupo incluem produtos de cuidados faciais e corpóreos como, protetores solares, bronzeadores. Dentro dos cosméticos capilares inserem-se produtos como xampu, condicionadores, tratamentos capilares entre outros. Os cosméticos orais são representados por dentifrícios e enxaguatórios bucais (MITSUI, 1997). Por fim, o último grupo é representado pelas fragrâncias. As fragrâncias podem ser classificadas, quanto à finalidade, em fragrâncias finas ou funcionais. A primeira classificação se refere a perfumes, colônias, pós-banho e fragrâncias para uso

cosmético; a segunda à fragrâncias usadas em produtos de limpeza, sabões, entre outros (SCHREIBER,1996).

Embora estímulos visuais e auditivos desempenhem um papel predominante na comunicação e percepção humana, outras modalidades sensoriais dão importantes contribuições para esta comunicação. Sensações olfativas demonstram trazer importantes informações sensoriais, que podem influenciar o modo como os seres humanos interpretam elementos baseados na visão como, por exemplo, a percepção facial (ABE, 2005). Além de alterações de percepção, as sensações olfativas podem também promover alterações fisiológicas. Característica explorada pela aromaterapia – terapia que consiste na aplicação de terapêutica de óleos essenciais para tratamento de diversos distúrbios, como o estresse (LYRA; NAKAI; MARQUES, 2010).

Neste sentido, ao longo da história, a utilização de fragrâncias, como forma de alteração da auto-percepção do seu usuário, tem se mostrado como um fenômeno antropológico universal (CLASSEN et al., 1994, LENOCHOVÁ et al., 2012). Há mais de 4000 anos, os mesopotâmios usaram o incenso como a primeira forma de perfume em rituais dedicados à Deuses e ancestrais. No Egito, desenvolveu-se a arte da perfumaria não somente para propósitos religiosos, mas também como cosmético através da utilização de óleos perfumados na pele. A expansão grega e romana na antiguidade tornou comum a prática do uso de perfumes pela população dos dois impérios e também permitiu acesso a uma maior variedade de matérias-primas. Na idade média, os árabes fizeram ligação entre o passado e a perfumaria moderna, através do desenvolvimento dos métodos de destilação de plantas. Italianos aprimoraram este mecanismo e montaram a primeira destilaria na cidade de Modena. Durante a renascença, a nobre de Florença Caterina de´ Medici casou-se com o Rei Francês Henry II e trouxe consigo para a França as artes de perfumaria da Itália Renascentista. A maioria das indústrias de perfumaria cresceram ao redor da cidade de Grasse, no sul da França, onde jasmims, rosas e lavandas eram cultivadas. No século XVI, a perfumaria foi associada à moda através da venda junto à artigos de couro e luvas. O século XVIII assistiu a um revolucionário avanço na perfumaria com a invenção do *eau de cologne*. Nos séculos XIX e XX, houve estabelecimento das casas de perfumes como empresas e aperfeiçoamento dos processos de extração de substâncias aromáticas termossensíveis (SCHILLING et al., 2010).

A inovação em perfumaria passa pela pesquisa de novas fontes de aromas a serem exploradas para tal fim. Com o avanço da química moderna no século XX, a produção de perfumes passou a ser feita através de ingredientes sintéticos. Entretanto, as fontes naturais de fragrâncias ainda despertam interesse da indústria de perfumaria pela grande variedade de

substâncias existentes de potencial inexplorado. O desenvolvimento de uma fragrância também deve observar aspectos como estabilidade do produto e a segurança para os seus usuários (CALKIN; JELLINEK, 1994; RASTOGI et al., 2003).

Embora na prática, os produtos de cosméticos sejam raramente associados a sérios danos à saúde, isto não significa que os mesmos sejam sempre seguros. Especialmente se usado em longo prazo (CHORILLI, et al., 2009). A legislação brasileira, definiu normas para registro e definiu o grupo de risco para produtos cosméticos, perfumes e produtos de higiene. Os produtos de perfumaria, excetos as colônias infantis, foram enquadrados dentro do grupo de risco 1, que compreende produtos com risco mínimo (BRASIL, 2015). Dentre os principais eventos adversos associados ao uso de produtos de perfumaria, destacam – se principalmente as respostas de hipersensibilidade a componentes aromáticos (SCHEINMAN, 1996; LARSEN, 2000; JOHANSEN, 2003; HEISTERBERG et al., 2013; ULKER, et al., 2014), embora exista uma preocupação com a utilização de álcool, devido ao seu potencial irritativo e de promoção de desidratação da pele (OPHASWONGSE; MAIBACH, 1993).

A busca pela substituição do álcool em produtos cosméticos tem encontrado na tecnologia de sistemas nanodispersos uma alternativa para o desenvolvimento de fragrâncias. A pesquisa e desenvolvimento em nanotecnologia incluem a manipulação, sob controle, das estruturas em nanoescala e sua integração em maiores materiais, sistemas e arquiteturas. A veiculação de ingredientes em sistemas nanoestruturados, vem apresentando propriedades superiores quanto à sua performance em comparação com produtos convencionais (FRONZA et al., 2007). A perfumaria, associada ao marketing, têm vislumbrado a utilização de nanotecnologia, com vistas a encapsulação de fragrância para o desenvolvimento de formas mais atrativas para o consumidor (ITEHPEC, 2013).

Dentre os sistemas nanodispersos, destacam-se os sistemas nanométricos emulsionados, a saber, nanoemulsões e microemulsões. As microemulsões representam um promissor sistema para o carregamento de substâncias ativas e ingredientes de cosméticos pela possibilidade de solubilizar componentes hidrofílicos e lipofílicos, sendo usualmente aplicado para sistemas de entrega de fragrâncias; alta estabilidade devido ao pequeno tamanho de gotícula; sua natureza transparente e fluida (em concentrações razoáveis de óleo); utilizando menores quantidades de tensoativos (THADROS et al., 2004; AZEEM et al., 2008;).

2. Revisão de Literatura

2.1 Percepção de odores e o sistema olfato-sensorial.

Se a comunicação permite nos relacionarmos com outros seres humanos, os sentidos corporais permitem a compreensão do mundo pelo homem. O ser humano é olfativo por natureza, interagindo com o ambiente através da interpretação de sensações odorantes, de acordo com suas características estéticas, e classificando-as como agradáveis ou desagradáveis (ARAUJO et al., 2011). O sistema olfatório tem sido constantemente conservado durante o processo de evolução em diversas espécies dos mais diferentes grupos taxonômicos como insetos, mamíferos, aves e peixes (CALKIN; JELLINEK, 1994).

O sentido da olfação é o menos desenvolvido dos sentidos humanos e também o menos conhecido (GUYTON; HALL, 2006), contudo, nossa espécie consegue distinguir aproximadamente 5.000 diferentes odores (MENINI et al., 2004). O odor é resultante da interação do sistema receptor olfativo com substâncias químicas, causando efeitos biológicos e psicofisiológicos em um organismo vivo. A volatilidade é condição necessária para a que estimulem o sistema olfato-sensorial (NEUNER-JEHLE; ETZWEILER, 1994).

O nariz é um órgão complexo funcional e estruturalmente situado na parte superior do trato respiratório, desempenhando a importante função de condicionar o ar inalado e ser o órgão envolvido na sensação de odores (HARKEMA et al., 2006). O sistema olfato-sensorial é demonstrado na figura 1. Duas estruturas tem papel chave na percepção de odores: a membrana olfatória e o bulbo olfatório. A membrana olfatória está anatomicamente localizada na parte superior das cavidades nasais, dobrando-se sobre a concha nasal superior em uma área de superfície de aproximadamente 1cm^2 . O epitélio olfatório consiste de duas membranas, a lâmina própria e a mucosa olfatória, separadas por uma membrana basal. A lâmina própria contém as glândulas de Bowman, responsável pela produção de muco, e por tecido conectivo. A mucosa olfatória é um epitélio pseudoestratificado e contém grande diversidade de células como os neurônios, células de sustentação e células que compõe a glândula de Bowman (TRISKA, 2003; HADLEY et al., 2004).

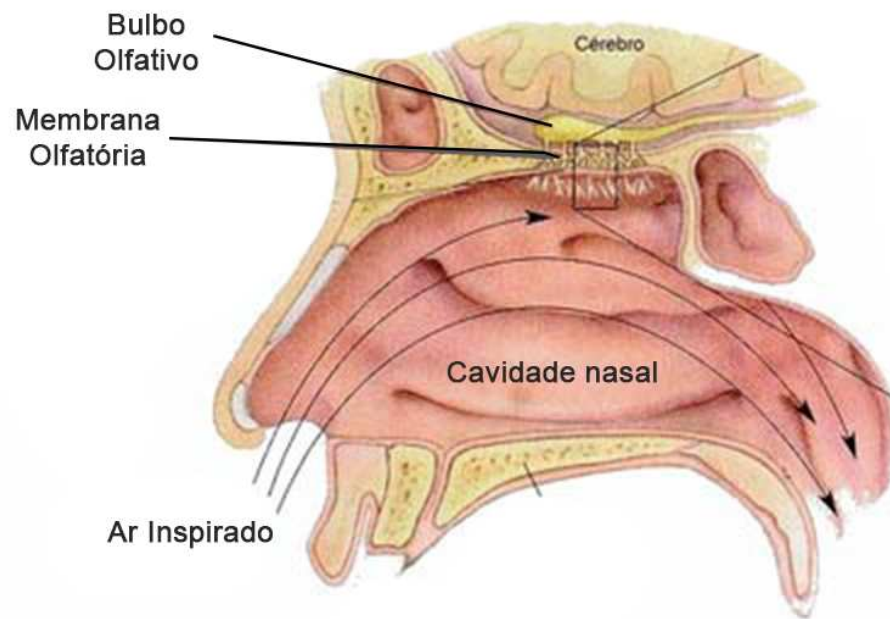


Figura 1. Anatomia do sistema olfativo. (Disponível em: <https://auladefisiologia.wordpress.com/2010/10/03/sistema-sensorial-orgaos-do-sentido>. Acesso em 15 de Fevereiro de 2015)

Os neurônios olfatórios (figura 2) são células bipolares projetando seus dendritos na forma de cílios imóveis para a superfície do epitélio olfatório e o axônio direcionado para o bulbo olfatório. A membrana olfatória contém entre 10 e 20 milhões de células olfatórias na cavidade nasal. Os cílios medem cerca de $0,3\mu\text{m}$ de diâmetro e se misturam ao muco, sendo responsáveis pela resposta aos odores através da interação dos odorantes com os receptores olfatórios (GUYTON; HALL, 2006; HADLEY et al., 2004).

O bulbo olfatório (figura 2) atua como ponte entre a mucosa olfativa e o córtex. O bulbo são estruturas pareadas localizadas acima e atrás das cavidades nasais e consiste em um nó emaranhado de dendritos das células mitrais e das células em tufo com axônios vindos dos neurônios olfatórios existentes na mucosa (PALHETA NETO, 2011). Os axônios dos nervos olfatórios são desmielinizados nesta região e interagem numa região denominada glomérulo olfativo, realizando sinapses para as células mitrais. Os axônios das células mitrais e em tufo emergem do bulbo formando o trato olfatório lateral (HADLEY et al., 2004).

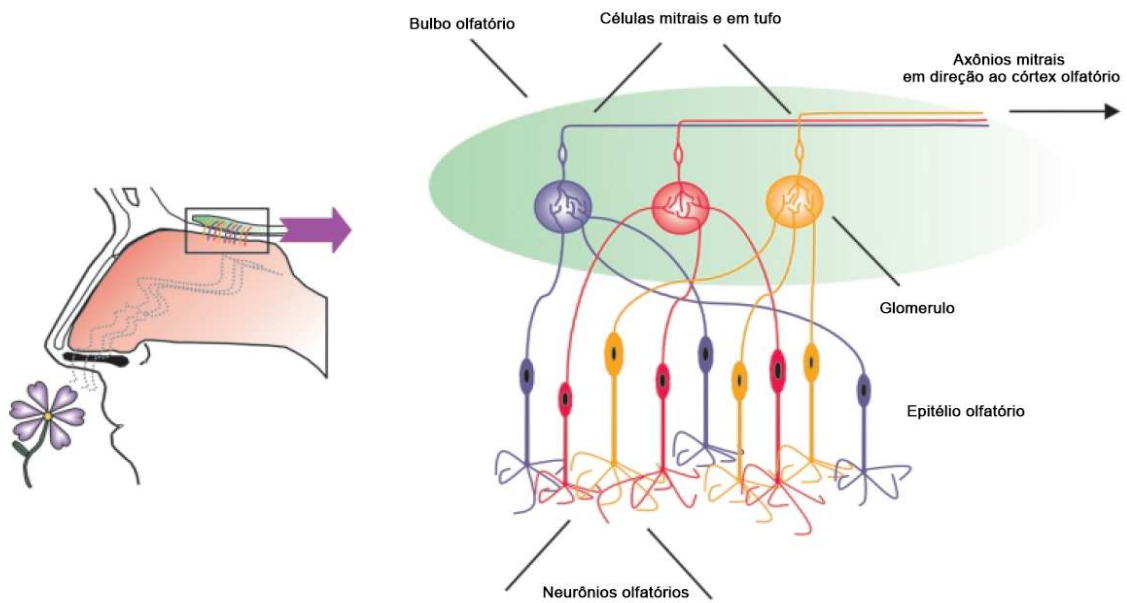


Figura 2. Estrutura neuronal do bulbo olfatório (MENINI et al., 2004 – Modificado).

Os Axônios das células mitrais atingem as células piramidais do córtex olfatório. O córtex olfatório é formado por diversas estruturas anatomicamente distintas, a saber: córtex piriforme, tubérculo olfatório, núcleo olfatório anterior e partes específicas da amígdala e córtex etorrínico (MENINI et al., 2004). Das quatro últimas regiões partem projeções para o tálamo, que envia projeções para o córtex orbitofrontal. As conexões com o lobo frontal nos permitem ter consciência e distinguir os cheiros ao nosso redor. As fibras que se projetam até a amígdala e o córtex etorrínico, responsáveis, respectivamente, pelas respostas de natureza emocional frente aos estímulos odoríferos e pela memória olfativa (MENINI et al., 2004; TRISKA, 2003, RODRIGUES, 2010).

A percepção do odor começa a partir do momento em que ocorre a inspiração, quando uma fração do ar que atinge a mucosa, parcialmente se dissolve na fase aquosa e interage com receptores dos terminais pilosos das células sensoriais. A ativação dos receptores promove despolarização do neurônio olfativo, iniciando a cadeia de sinapses até o bulbo olfativo, sendo transmitido posteriormente ao córtex olfatório para a decodificação e interpretação dos sinais neuronais (GUYTON; HALL 2006; TRISKA, 2003, NEUNER-JEHLE; ETZWEILER, 1994; MENINI, 2004).

O sistema olfato-sensorial é similar aos sistemas auditivo e visual no sentido de detectar e discriminar uma ampla gama de estímulos. Contudo, os odores diferem-se da luz e som em sua característica, sendo sua interação muito mais complexa que parâmetros simples

como alterações em frequência ou comprimento de onda (SU et al., 2009). A forma como o sistema olfato-sensorial permite a distinção de diversos odores é ainda foco de discussões, contudo, é sabido que o mecanismo envolve a ligação dos odorantes a um grande repertório de receptores localizados nos cílios dos receptores olfatórios. Cada neurônio olfatório expressa um único tipo de receptor e projeta seus axônios para um único glomérulo. A informação então é passada pelas regiões do encéfalo, levando à percepção do odor (MALNIC, 2007).

Buck e Axel (1991) em trabalho pioneiro, definiram que os receptores olfatórios pertencem a uma grande família gênica caracterizadas por proteínas trans-membranas de sete domínios e que promovem a transdução de sinais através da interação com proteína G (figura 3) que promovem a ativação de segundos mensageiros, como o sistema adenilil ciclase que convertem ATP em AMPc que por sua vez ativam canais iônicos de sódio. O influxo de sódio promove o aumento do potencial de membrana e excitação do neurônio. A existência deste mecanismo garante a sensibilidade à excitação destes receptores em concentrações baixas de ligantes (GUYTON; HALL, 2006).

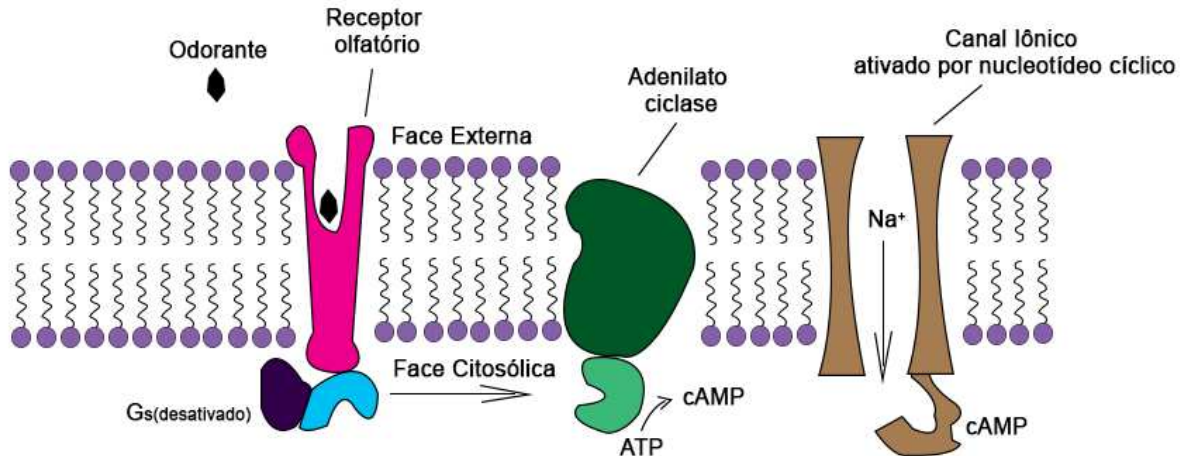


Figura 3. Ativação de receptores olfatórios por odorantes (Buck; Axel, 1991 - Adaptado).

O ser humano apresenta a capacidade de distinguir cerca de 5000 odores, baseado em cerca de 1000 genes de receptores olfativos. Neste sentido, assume-se que uma substância odorante interage com um pequeno número de receptores (STOCKHORT; PIETROWSKY, 2004). Embora os conhecimentos sobre a relação estrutura-odores sejam incompletos e fragmentados, é sabido que grupos polares dos odorantes exercem forte influência no odor

percebido, bem como a forma molecular e sua estrutura tridimensional (MORI et al., 2006). Os efeitos de estereoquímica também têm sido investigados (LASKA, 2004).

Um odor pode ser analisado a partir de quatro perspectivas, concentração (concentração em que determinado odor é perceptível), caráter (qualidade do odor), intensidade do odor e hedonicidade (agradabilidade do odor). O primeiro e terceiro parâmetros podem ser avaliados por meio de equipamentos denominados olfatômetros, enquanto o caráter e hedonicidade constituem-se análises de tom subjetivo, visto a individualidade da sensação olfativa (SCHIRMER et al., 2008).

Apesar de todos os progressos, existem questões importantes a serem respondidas, como o estabelecimento da correlação entre os receptores e as respostas específicas de percepção do sistema olfato-sensorial. Tais estudos são bastante complexos devido à grande diversidade de receptores odoríferos e a baixa expressão funcional dos mesmo em células comumente usadas para estudos científicos. Fazem-se necessários mais estudos para que se atinja a completa elucidação dos mecanismos envolvidos na percepção de odores em humanos (PEREIRA, 2008).

2.2 Fragrâncias

Fragrâncias são definidas como uma composição de matérias primas odoríferas, elaborada através de um talento criativo de um perfumista (GUERRA, 2002). As fragrâncias são criadas para uso em uma grande variedade de aplicações, que vão de caros perfumes de luxo, cosméticos e higiene pessoal à produtos de lavanderia, limpeza doméstica, entre outros, criados a partir seleção de ingredientes dentre uma variedade de milhares de materiais. As fragrâncias podem ser classificadas, quanto à finalidade, em fragrâncias finas ou funcionais. A primeira classificação se refere a perfumes, colônias, pós-banho e fragrâncias para uso cosmético; a segunda à fragrâncias usadas em produtos de limpeza, sabões, entre outros (SCHREIBER, 1996).

As fragrâncias são designadas de acordo com a sua concentração, podendo ser classificadas em *parfums* (fórmulas com maior concentração de fragrância, entre 15 e 30%), *eau de parfum* (8 a 15% de compostos aromáticos); *eau de toilette* (4 a 8% de fragrância) e o *eau de cologne* (2 a 5% de fragrância) (HERZ, 2011).

A arte da construção de um bom perfume vai muito além da ciência com suas intrincadas e complexas sínteses de novas fragrâncias (SPEZIALI, 2012). Os perfumes são misturas complexas de substâncias contendo propriedades químicas muito diferentes.

Considerada uma das mais importantes propriedades para a percepção dos perfumes, a volatilidade permite classificar as matérias primas em três grupos de notas aromáticas: as notas de cabeça, os compostos mais voláteis, que podem ser detectados em um perfume apenas alguns minutos após a aplicação; as notas de corpo, que caracterizam o perfume e podem durar por algumas horas e as notas de fundo ou base, os compostos menos voláteis que podem durar mais de 8 horas e são usadas como fixadoras das notas de cabeças e corpo (MATA, et al. 2005). Carles (1962) representou a estrutura de um perfume como um triângulo dividido horizontalmente em três partes, representando, as notas de cabeça, corpo e fundo, como mostrado na figura 4.



Figura 4. Estrutura de perfumes proposta por Carles (1962)

A classificação de fragrâncias tem sido amplamente discutida e diferentes formas de categorização têm sido propostas baseadas em distinções arbitrárias entre métodos empíricos, semiempíricos e estatísticos. Os perfumes têm sido classificados de acordo com as características das notas aromáticas dominantes em famílias, descritas brevemente a seguir (TEIXEIRA et al., 2010):

1. Família Cítrica: Frescor e leveza de frutas cítricas como limão ou laranja;
2. Família Floral: Remetem à flores (Ex.: gerânio, jasmim ou rosa). É uma das famílias mais usadas em fragrâncias femininas
3. Família Verde: Notas com aromas de folhas frescas ou talos e grammas cortadas com frescor remissente. São exemplos o verocitral ou hexenil-benzoato

4. Família Herbácea: Notas mais complexas que as verdes, quase sempre encontradas em plantas de baixo crescimento. Exemplos típicos são sálvia e menta.

5. Família Musk: Característica de cervos-almiscarado e bois-almiscarados. Atuam, quando usados, como fixadores.

6. Família Oriental: Associadas à espécies de âmbar, incluindo muitas vezes notas quentes. Classificações encontradas na literatura com picante, terra, balsâmico, tabaco, couro, cera, musgo foram incluídos nesta família.

7. Família Amadeirada: geralmente como madeiras como cedro, sândalo e patchouli. A classificação de fragrâncias como canforáceas são incluídas nesta família.

A performance de um perfume está relacionada com a medida da capacidade das mesmas em perdurarem ao longo do tempo após o início de sua evaporação e serem, portanto, percebidas no ambiente circundante ao longo do tempo e da distância à fonte de liberação. Para avaliação de desempenho, diversos parâmetros de performance podem ser avaliados como Impacto, Difusão, Tenacidade e Volume (figura 5). Impacto refere-se a notabilidade do produto nos primeiros minutos após a aplicação. Difusão corresponde à distância que uma fragrância é sentida após a aplicação. Tenacidade é conceituada como a efetividade de uma fragrância em longo prazo na superfície onde foi aplicada. O volume de uma fragrância é definido como a eficiência de uma fragrância em longo prazo, longe de sua fonte de aplicação (CALKIN; JELLINEK, 1994; CARNEIRO, 2012).



Figura 5. Avaliação de parâmetros de performance de fragrâncias

Atualmente, a forma de obtenção de fragrâncias é por via sintética, que apesar de ser mais barata, segundo Dias (1996) talvez nunca substituam completamente os naturais. Os perfumes mais caros usam os produtos sintéticos apenas para acentuar o aroma dos óleos naturais. Novos conceitos para composições de fragrâncias têm sido desenvolvidos, lançando mão não só de aspectos subjetivos inerentes à composição de um aroma como também à conceitos físico-químicos avançados. Nesse contexto, destacam-se os trabalhos de Mata et al. (2005) e Teixeira et al. (2009) na concepção de diagramas ternários e quaternários, respectivamente, para a composição de perfumes.

2.3 Desenvolvimento e inovação em fragrâncias, fragrâncias livre de álcool e nanotecnologia

A composição de um perfume envolve muito mais do que a simples mistura de substâncias odoríferas em um veículo apropriado. A composição deve ser encarada como a concepção de uma interessante e original forma olfatória. Os ingredientes escolhidos devem ser cuidadosamente definidos e o compositor de uma fragrância deve ter aptidões que vão além do olfato, como habilidades mentais e psicológicas, criatividade e bom gosto com uma constante vontade de desenvolvê-los. Aspectos adicionais na composição de fragrância devem ser observados quando as mesmas forem destinadas para uso funcional (incorporadas em outros produtos cosméticos). Sendo priorizadas, neste caso, as características funcionais do produto em detrimento do desempenho sensorial da fragrância. Para este último, devem ser levadas em conta no processo de desenvolvimento as características sensoriais associadas ao produto; os parâmetros de performances adequados e características físico-químicas como a volatilidade e a solubilidade em água (CALKIN; JELLINEK, 1994; ROUDNITSKA, 1994).

Além de sensorialmente agradável e tecnicamente sólida, composições de perfumaria devem atender certos requisitos para que se tornem produtos consumidos livre e amplamente. Fatores como a preocupação com a saúde dos consumidores e pessoas envolvidas com a produção; a minimização de danos ao meio ambiente em sua produção; respeitar as opiniões sobre o que é bom ou mau, certo ou errado em vigor; bem como estar de acordo com as demandas financeiras das casas de perfumaria e do público consumidor (CALKIN; JELLINEK, 1994).

Fatores importantes nos requerimentos para satisfação quanto à segurança de uso de artigos de perfumaria incluem a aquisição de matérias-primas em fornecedores confiáveis e a

constante vigilância, a fim de prever e eliminar quaisquer circunstância que impliquem em padrões de exposição incomuns deve servir como um alerta, atentando quanto à possibilidade de diminuição ou exclusão de ingredientes potencialmente nocivos (VAN ABBÉ, 2000).

Os químicos aromáticos, que tem sido utilizados no desenvolvimento de fragrância, tem sido alvo de extensos estudos acerca de seus riscos à saúde. Ingredientes como salicilato de benzila, ciclopentanona, álcool anísilico, acetilcedreno, entre outros têm sido extensivamente estudados acerca de seus potenciais irritativos ocular e da pele, fotoirritação e toxicidade aguda (LAPCZYNSKI et al., 2007; SCOGNAMIGLIO et al., 2012a; SCOGNAMIGLIO et al., 2012b; SCOGNAMIGLIO et al., 2013). Substâncias componentes dos veículos de fragrância também têm sido estudadas. Johansen et al. (1994) relataram um caso de dermatite de contato associada ao uso do solvente dipropilenoglicol para fragrância.

Os efeitos danosos associados do etanol na pele tem sido continuamente estudados. Conforme mencionado anteriormente, são conhecidos os efeitos irritativos e promotores de desidratação da pele (OPHASWONGSE; MAIBACH, 1993). Os efeitos dose-dependente do etanol na indução de apoptose de cultura de células epidermóides da pele e de células primárias de neonatos humanos foi evidenciado por Neuman et al. (2002) em mecanismo associado ao aumento dos efeitos da citocina Fator de Necrose tumoral alfa (TNF- α). Em estudo realizado por Laiko et al. (2007) foi observado que o potencial de sensibilização em modelo de linfonodo murino de determinados ingredientes de fragrância, como aldeído p-t-butil-metil-hidrocinâmico e o geraniol é aumentado em presença de etanol, em comparação com o solvente dietilftalato.

Em vista de tais problemas associados ao uso tópico de cosméticos com álcool em sua composição, é crescente a tendência de mercado por produtos livre deste solvente (GUÉNIN et al., 1995). Neste sentido, tem sido buscadas alternativas ao uso deste solvente. A utilização do dietilftalato tem sido comumente realizada. Embora sua segurança tenha sido comprovada em diversos estudos (API, 2001), foram encontradas evidências de que seu uso também pode potencializar efeitos de sensibilização de alguns ingredientes como o hidroxicitronelal (LAIKO et al., 2007). Outra opção utilizada tem sido a veiculação de fragrância em veículos nanotecnológicos.

O termo nanotecnologia vem revolucionando o mundo da ciência trazendo muita expectativa a esse setor que tem como principal característica a sua diversificação. A nanotecnologia define-se pela habilidade de caracterizar, manipular, organizar materiais em escalas nanométricas. O prefixo “nano” surge das dimensões dos objetos investigados, com tamanhos da ordem de até alguns nanômetros, ou seja, com dimensões de um milionésimo de

milímetro ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$) (figura 6) (KNOBEL, 2005; ZANETI-RAMOS; CRECZYNSKI-PASA, 2008; BARIL, et al., 2012).

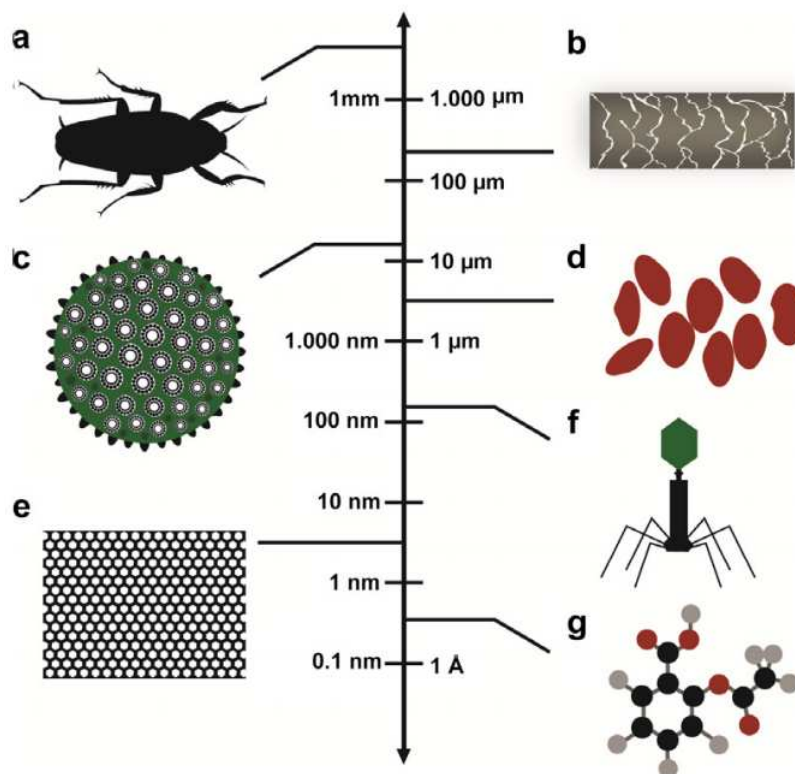


Figura 6. Perspectiva da nanoescala em relação a objetos naturais: (a) insetos; (b) fio de cabelo; (c) grãos de pólen; (d) eritrócitos; (e) nanocristais de cobalto; (f) vírus bacteriófago; (g) molécula de Ácido acetilsalicílico (MIHRANYAN et al., 2011)

A história da nanotecnologia é recente. O desenvolvimento de microscópio de tunelamento de força atômica permitiu avanços na pesquisa de manufatura molecular e atômica, e a partir da década de 80, a nanotecnologia ganha impulso na comunidade científica, avançando ainda mais na década de 90 com a descoberta dos nanotubos de carbono. O Brasil tem investimentos em projetos na área de nanotecnologia, contando com a maior infra-estrutura de pesquisa na América latina (GUTIERREZ et al., 2006; MARTINS, 2009). O mercado de nanotecnologia vem crescendo com o passar dos anos e a expectativa é de que esse mercado movimente mais de 2,5 trilhões de dólares em 2015 (GORDON, 2010).

As nanopartículas em geral são caracterizadas por (i) alta superfície de contato por volume; (ii) uma grande quantidade de partícula por unidade de massa e (iii) uma baixa quantidade de átomos por partículas. Tais características resultam em notáveis alterações nas propriedades, em comparação com o material organizado em partículas maiores, como por

exemplo, temperatura de ebulição, solubilidade, propriedades ópticas e magnéticas (MIHRANYAN et al., 2012).

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos com diversas aplicações. As nanotecnologias têm encontrado muitas aplicações nas ciências biomédicas no que concerne à engenharia de tecidos, diagnósticos ultrassensíveis e medicamentos mais eficazes e seguros (ROSSI-BERGMAN, 2008; BRASIL, 2010). No setor de cosméticos, a nanotecnologia é atualmente empregada no desenvolvimento de 3 áreas da produção: formulação, embalagem e em equipamentos de fabricação. A formulação de cosméticos usando nanopartículas tem por objetivo melhorar a eficiência do produto; reduzindo a quantidade de ingredientes utilizados e toxicidade associada; aumentando a permeação, estabilidade ou simplesmente conferindo ao produto um aspecto mais elegante (MIHRANYAN et al., 2012).

Na área de perfumaria, a nanotecnologia tem sido objeto de diversos estudos. Atualmente a encapsulação de fragrância em nanocarreadores tem sido uma estratégia adotada para retardar a evaporação das moléculas e prolongar a duração da fragrância. Hosseinkhani et al. (2015) estabilizaram nanocapsulas de ácido poli-L-lático com tamanho de partículas de aproximadamente 115nm, observando uma liberação de até 48 horas de substâncias hidrofóbicas, sem impactar na microbiota da pele. Tree-Udom et al. (2011) desenvolveram nanoesferas de quitosana através da reação de grupamentos aldeídos de constituintes aromáticos com grupamentos aminos de N-succinilquitosana, permitindo uma duração 85 vezes prolongada da fragrância, associada à boa dispersão em água. Tzhayik et al. (2012) obtiveram nanoesferas através de sonicação de uma substância aromática pura com albumina bovina.

2.3.1 Microemulsões

As microemulsões são estruturas nanométricas que podem ser utilizadas para o desenvolvimento de veículos não alcoólicos para fragrâncias. As microemulsões são definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, de dois líquidos imiscíveis estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água. Formando geralmente agregados esféricos e com diâmetros menores que 140 nanômetros, tipicamente da ordem de 10 nanômetros. Apesar da designação “micro”, o sistema envolve gotículas com tamanhos suficientemente pequenos para ser opticamente transparentes (OLIVEIRA et al., 2004).

O entendimento do processo de formação de microemulsões passa pelo entendimento da formação de emulsões. Quando dois líquidos imiscíveis (1) são agitados mecanicamente, ambas as fases tendem a formar gotículas (2). Cessando-se a agitação, as gotículas rapidamente coalescem (3) e os dois líquidos se separam (4) (Figura 7). Isso se deve ao tipo de interações intermoleculares divergentes. As moléculas de água apresentam polaridade e interagem com as outras moléculas de água por força intermoleculares do tipo dipolo-dipolo enquanto interagem com moléculas de hidrocarbonetos e outras substâncias apolares por forças de interações do tipo Van der Waals. A existência entre grandes forças de atração entre as moléculas de água, uma vez que a interação dipolo-dipolo é mais forte e estável, faz com que as mesmas se atraiam novamente, promovendo a separação (RIEGER, 2001; DALTIM, 2011).

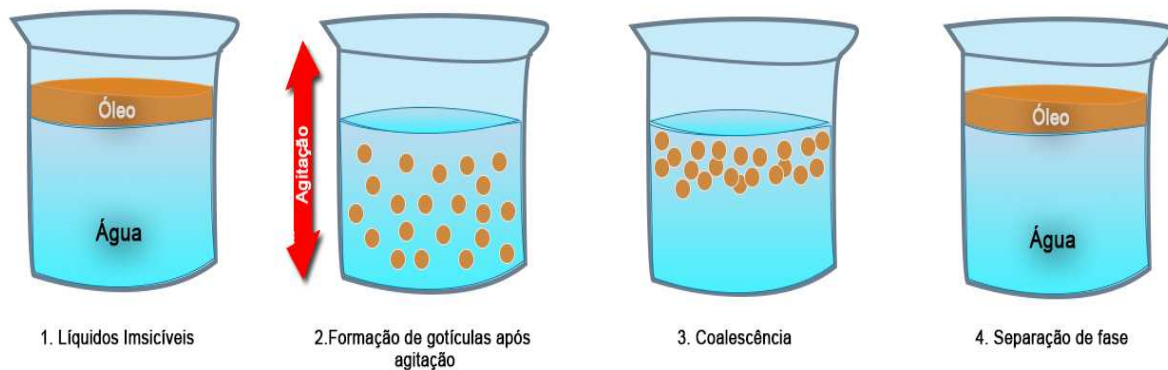


Figura 7. Separação de fases de 2 líquidos imiscíveis, em ausência de tensoativos.

O agrupamento das gotículas de água e óleo no processo de coalescência promove a diminuição da superfície de contato e conseqüentemente aumento da tensão superficial. A tensão superficial decorre de um desbalanço na força de interação existente na superfície de contato entre dois líquidos, uma vez que as forças exercidas pelas moléculas contidas no interior do líquido é maior que a existente na interface entre dois líquidos imiscíveis (Figura 8). A equação da energia livre de Gibbs para emulsões (Equação I) ilustra bem essa tendência de separação de fase entre dois líquidos imiscíveis. Sendo ΔG a energia livre; γ a tensão de superfície e ΔA a área de interface. Observa-se uma relação inversamente proporcional entre ΔA e γ e uma relação proporcional entre γ e ΔG . De forma que a quanto maior a área

interfacial, menor a tensão superficial e mais estável termodinamicamente é o processo (HEM, 2001; DALTIM, 2011).

$$\Delta G = \gamma \cdot \Delta A \quad (\text{Equação I})$$

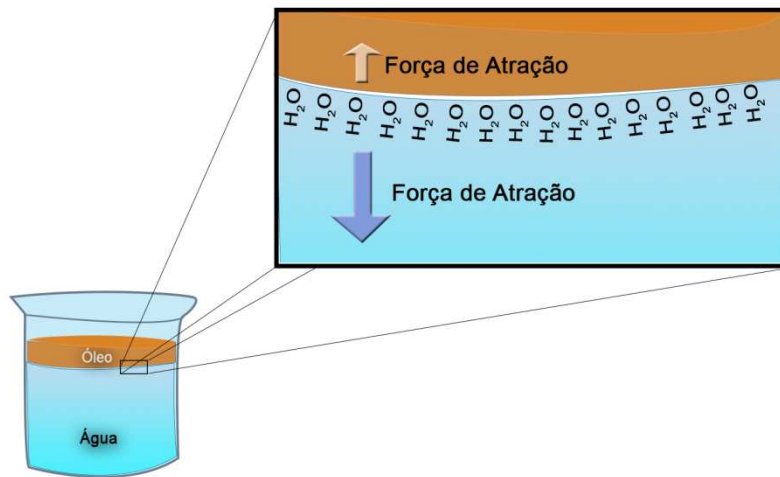


Figura 8. Tensão interfacial existente na superfície de dois líquidos imiscíveis.

É neste contexto que se inserem os tensoativos. Os tensoativos são utilizados visando a diminuição da tensão superficial de emulsões, tornando-as termodinamicamente mais estáveis por consequência (HEM, 2001). A adsorção de tensoativos na área interfacial promove uma pressão bidimensional π que promove a redução da tensão superficial do sistema, conforme demonstrada na Equação II, onde γ_i é a tensão superficial após adição de tensoativo, $\gamma_{(o/a)}$ é a tensão interfacial óleo em água e π é a pressão bidimensional. A pressão bidimensional promovida pelo tensoativo abaixa a tensão favorecendo a dispersão de uma fase na outra (DAMASCENO, 2011). Quimicamente, os tensoativos são como moléculas anfífilas possuindo uma região polar e outra apolar, convenientemente representado por uma estrutura de cabeça e cauda, conforme figura 9 (AKHTAR, 1996).

$$\gamma_i = \gamma_{(o/a)} - \pi \quad (\text{Equação II})$$

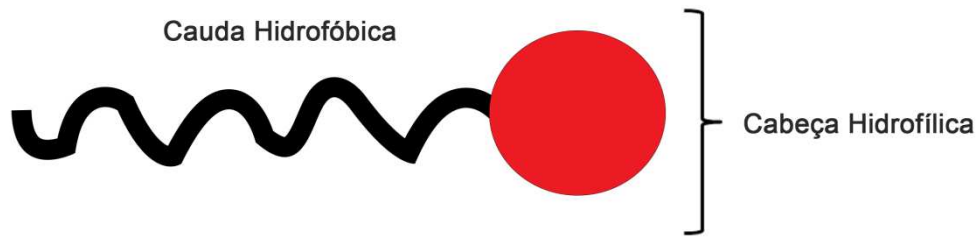


Figura 9. Representação da estrutura geral dos tensoativos

Ao ser misturado a um sistema imiscível de água e óleo, o tensoativo se distribui entre as duas fases. A aproximação da região de interface entre óleo e água faz com que as moléculas de tensoativos se posicionem de maneira perpendicular, onde se encontra mais estável. A saturação desta interface, bem como das interfaces sólido-líquido e ar-líquido em virtude do aumento da concentração de tensoativo, levará ao aumento da quantidade de tensoativo livre (DALTIM, 2011).

O tensoativo livre, por possuir apenas solubilidade parcial nos líquidos do sistema, tende a se organizar em estruturas micelares, onde expõe a região molecular solúvel ao líquido, isolando a porção imiscível em seu interior. A concentração em que esse processo começa ocorrer é denominado concentração micelar crítica (CMC). A figura 10 ilustra todo o processo narrado. A agitação de um sistema imiscível água/óleo com tensoativo em concentração superior à CMC leva ao surgimento de novas gotículas de óleo em água (e vice-versa) que desta vez são estabilizadas pelo tensoativo livre organizado em micelas, sendo agora denominadas gotículas dispersas em uma fase contínua. A presença do tensoativo provoca um grau de repulsão entre as gotículas (por mecanismos eletrostáticos ou de impedimento estérico), impedindo a aproximação, evitando a coalescência e estabilizando a emulsão (DALTIM, 2011).

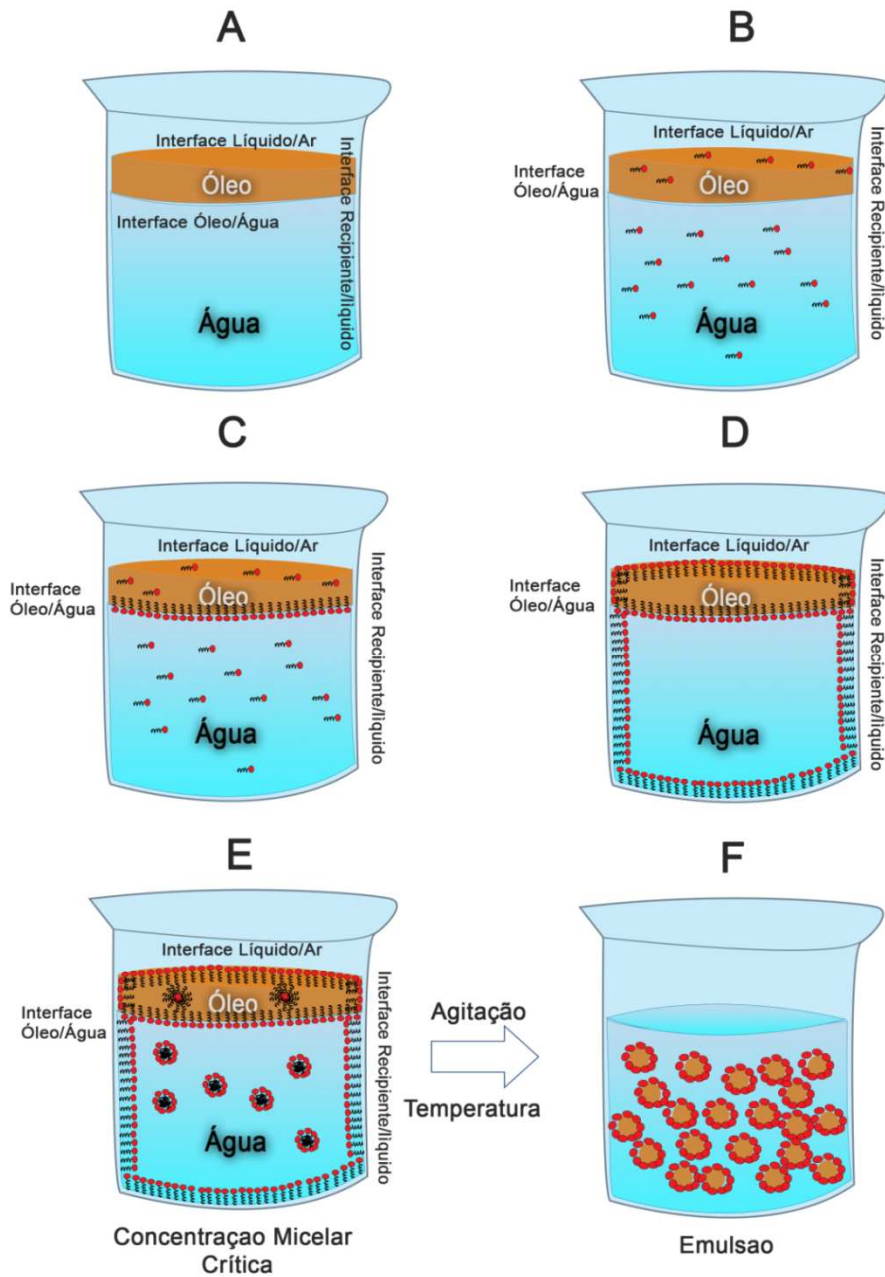


Figura 10. Formação de Emulsões: A figura A mostra as fases hidrofílica e lipofílica inicialmente separadas. O tensoativo é adicionado e interage com a fase aquosa e fase oleosa através de sua cabeça hidrofílica e cauda apolar, respectivamente (B). A fim de manter-se em conformação mais favorável energeticamente, as moléculas do tensoativo se posicionam na região de interface entre a fase aquosa e oleosa, estando a cabeça hidrofílica voltada para a fase aquosa e a cauda lipofílica para a fase oleosa (C). Após saturação da interface água/óleo, as moléculas de tensoativo livres migram para outras regiões de interface, como a região de interface líquido/recipiente e a interface ar/líquido (D). A adição de mais tensoativo faz também saturar estas duas interfaces, obrigando o tensoativo a se organizar em micelas, isolando a porção insolúvel da molécula no interior (E). A esta concentração, dá-se o nome de Concentração Micela Crítica (CMC). O fornecimento de energia cinética, através de temperatura ou agitação em concentrações superiores à CMC permite a dispersão dos constituintes oleosos na água em gotículas, que são estabilizadas pelo tensoativo, formando a emulsão.

As composições de microemulsões, por sua vez, apresentam uma tensão superficial muito baixa, o que garante uma alta estabilidade termodinâmica. A orientação da emulsão para água em óleo (A/O) ou Óleo em água (O/A) ou bicontínua (figura 11) é dependente das características dos tensoativos e dos óleos utilizados no sistema. A formulação de microemulsões geralmente envolve a associação de três a quatro componentes: O óleo, água, tensoativo, cotensoativo. Os co-tensoativos podem ser usados para promover uma redução adicional da tensão superficial e maior estabilidade termodinâmica da microemulsão (CUNHA JÚNIOR et al., 2003, FORMARIZ, 2005, ROSSI et al., 2007).

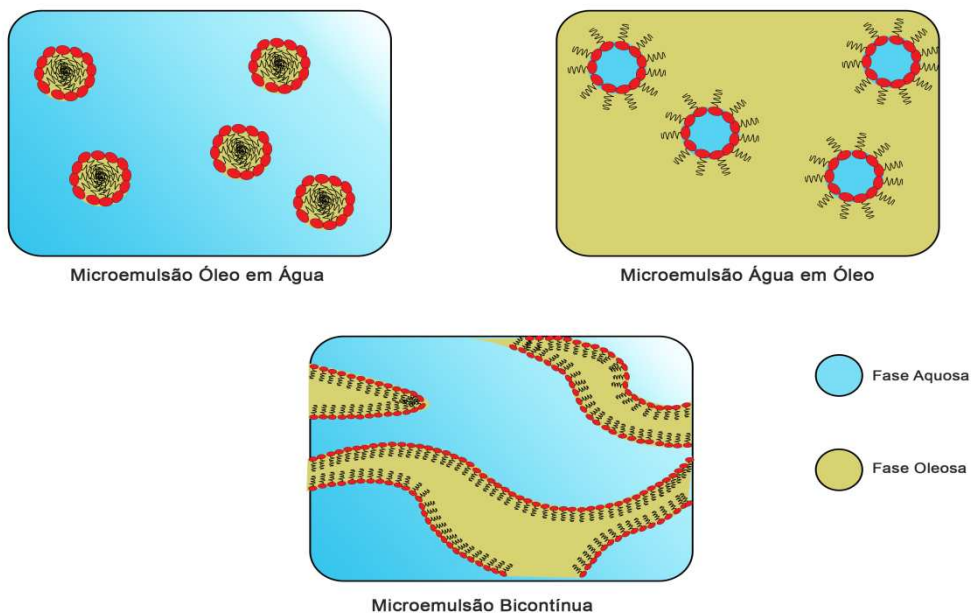


Figura 11. Microemulsões óleo em água, água em óleo e bicontínua.

Os sistemas microemulsionados são normalmente desenvolvidos através de diagramas de fase, que consiste numa representação gráfica da análise de diversos sistemas compostos de água, óleo tensoativos e/ou co-tensoativo. A partir de um diagrama é possível determinar “regiões” onde serão favorecidas a formação de emulsões, sistemas bifásicos (separação de fase) e microemulsões. Os diagramas podem ser ternários (representação triangular onde cada vértice representa a concentração de fase aquosa, fase oleosa e tensoativos) quaternário (quadrilátero onde cada vértice representa a concentração de fase aquosa, fase oleosa, tensoativos e co-tensoativos) ou pseudo ternários (representação triangular onde tensoativos e co-tensoativos são representados no mesmo vértice). A caracterização das microemulsões é

feita através de diversas técnicas, onde se obtém diversas informações, como o tamanho da partícula, isotropia do sistema ou sua estrutura interna. Adicionalmente, podem ser realizados estudos que caracterizem densidade, comportamento reológico, índice de refração, condutividade elétrica e potencial-zeta (DAMASCENO et al., 2010).

Diversos usos de microemulsões em cosméticos são relatados na literatura. As aplicações incluem cuidados com a pele e cabelos com vistas a melhorar a eficiência e estabilidade do produto (BOONME, 2007). As propriedades das microemulsões as tornam atrativas para as formulações cosméticas sob diversos pontos de vista. As microemulsões podem melhorar uma formulação, uma vez que a alta estabilidade termodinâmica das microemulsões aumenta o tempo de prateleira dos produtos. Quanto à eficácia, os sistemas nanométricos podem favorecer o contato com a superfície da região aplicada, bem como a penetração de determinados ativos em camadas mais profundas da pele devido ao seu pequeno tamanho de partículas (THADROS et al., 2004).

A utilização de microemulsões em fragrâncias é capaz de produzir soluções transparentes sem a utilização de álcool etílico (AIKENS; FRIBERG, 1999). Diversos trabalhos tem relatado a utilização de sistemas anfífilos na produção de sistemas para fragrâncias. Zhang et al. (2000a) avaliaram a evaporação de três sistemas microemulsionados utilizando o tensoativo álcool láurico (5% em peso), água (85% em peso) e 15% de um ingrediente aromático em cada formulação (álcool fenilético, limoneno e benzaldeído). Em trabalho anterior (ZHANG et al., 2000b), os mesmos autores descreveram uma microemulsão com menos de 5,0% de aldeído fenilético e limoneno. Trabalhos similares envolvendo as mesmas substâncias foram desenvolvidos por Friberg et al. (1998; 1999) obtendo microemulsões com boa estabilidade, bem como um aumento da pressão do vapor para o álcool fenilético. A veiculação de fragrância em microemulsões também tem sido objeto de diversos pedidos de propriedade intelectual (TAKASAGO PERFUMERY CO LTD, 2011; WIEDMANN et al., 2012; FIRMENICH & CIE, 2014) demonstrando o potencial de inovação tecnológica do segmento.

2.4 *Spondias tuberosa* Arr. Cam.

A família Anacardiaceae destaca-se por agrupar diversas espécies frutíferas importantes, como o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), mangueira (*Mangifera indica* L.) e o gênero *Spondias*. Este último foi criado por Linnaeus em 1753, contendo apenas a espécie

Spondias mombim (cajá). Atualmente o gênero é compreendido por 18 espécies, das quais 6 tem ocorrência na região nordeste do Brasil (LIMA, 2009; BRITO, 2010).

Conhecido popularmente como umbuzeiro, *Spondias tuberosa* Arr. Cam. é uma espécie geograficamente endêmica do semi-árido tropical distribuindo-se pelos estados de Pernambuco, Sergipe, Bahia, o sul do Piauí e o norte de Minas Gerais (BORGES et al., 2007; SANTOS, 1999). É uma árvore de pequeno porte, com altura variando entre 4 e 6 metros e copa umbeliforme, que pode atingir de 10 a 15 metros de diâmetro e longevidade de mais de 100 anos (figura 12). A raiz do umbuzeiro é adaptada às condições de estresse hídrico característico de seu habitat natural. As folhas do umbuzeiro são verdes, alternadas, pecioladas, imparipinada, com 3 a 7 folíolos oblongos e ovalados. As flores são periféricas, brancas e perfumadas, melíferas e actinomorfas (LIMA,2009).



Figura 12. Umbuzeiro. (Disponível em: <https://www.embrapa.br/bme_images/o/58280040o.jpg>. Acesso em 13 de Março de 2015).

O umbuzeiro perde totalmente suas folhas durante o período de estiagem anual, com vistas a reduzir a sua superfície transpiratória, logo após as primeiras chuvas, ocorre o florescimento, e posteriormente, o surgimento de novas folhas. A frutificação é abundante, iniciando-se aproximadamente à floração e maturação, em torno de 120 dias. O fruto é denominado popularmente de umbu ou imbú (figura 13) e são constituídos em média por 22% de casca, 68% de polpa e 10% de caroço. É uma drupa de coloração amarelo-esverdeado de peso entre 20 e 30g. O endocarpo é muito resistente e nele está contido a semente, que é

formado por três camadas denso-fibrosas, pesando de 1 a 2 gramas, com forma entre arredondado e ovalados (MENDES, 1990; LIMA, 2009).

O umbuzeiro é de grande importância ambiental, pois seu fruto saboroso e rico em nutrientes, colhido de forma extrativista, é utilizado na alimentação humana e animal como também para a geração de renda, a partir da venda do umbu *in natura* e/ou processado. Embora o uso alimentício se destaque, são relatados os usos para fins madeireiros e medicinais, como tratamento de diabetes, hipocolesterolêmico, congestão e diarreia (LINS NETO, 2008).

Na área biomédica, recentes estudos tem avaliado o potencial de constituintes dos extratos de *S. tuberosa* em diversos modelos de avaliação de atividade biológica. Silva et al. (2011) também avaliaram o efeito do extrato metanólico de *S. tuberosa*, *S. mombim* e seus principais componentes fenólicos contra o vírus DENV-2 observando atividade significativa para a rutina, sugerindo um potencial anti-dengue da espécie. Além disso, têm sido descritos na literatura atividade antioxidante (SILVA et al., 2012).



Figura 13. Frutos do umbú. (Disponível em: <<http://www.cerratinga.org.br/wp-content/uploads/2013/04/umbu-frutos.jpg>> Acesso em 12 de Março de 2015.

A polpa do fruto de *Spondias tuberosa* dispõe de poucos estudos acerca de sua composição fitoquímica. Silva et al. (2012) identificaram flavonoides como principais metabólitos de ocorrência na folha desta espécie, sendo majoritárias os flavonóides rutina, quercetina e ácido elágico. Ainda para as folhas, foram identificado o hexan-3-ol, α -copaeno, β -cariofileno e δ -cadineno no óleo essencial (LEMOS et al., 1995). Para as sementes, a composição é majoritariamente de Lipídios, com destaque para os ácidos graxos essenciais ácido oleico e linoleico (BORGES et al., 2007).

A despeito da importância e representatividade do fruto de *S. tuberosa* para a economia local, diversos trabalhos tem demonstrado o potencial desta espécie para exploração tecnológica da mesma, com vistas a fomentar o desenvolvimento das regiões produtoras. O uso popular como alimento justifica estudos de desenvolvimento de novos produtos alimentícios como geleias, compotas ou bebidas fermentadas para um possível aproveitamento industrial do fruto (FOLLEGATTI et al., 2003; PAULA, 2011). A entrada do umbuzeiro para a lista de espécies ameaçadas de extinção em 2013 (BARTABURU, 2013) exprime a necessidade de investigação de possíveis potenciais de usos tecnológicos, com vistas a fomentar sua conservação.

3. Justificativa

O Brasil vive atualmente uma situação paradoxal. Apresentado como o primeiro mercado mundial em perfumaria e desodorantes (ABIHPEC, 2014) mostrando-se este um setor notável pela riqueza gerada, pelos postos de trabalho que cria e pelas possibilidades de contribuir para melhorar o saldo da balança comercial. O país apresenta posições de pouco destaque como exportador, além da dificuldade de apresentar novos depósitos de patentes (SILVA, 2009). Mesmo com o crescente número de publicações na área de plantas aromáticas, principalmente no norte e nordeste, a contribuição efetiva para a geração de renda no país ainda é muito pequena (MATTOSSO, 2005).

Alguns exemplos bem sucedidos têm evidenciado a necessidade de inovação tecnológica através do surgimento de produtos destinados ao setor de aromas e fragrâncias, bem como sua rentabilidade comercial. O lançamento da linha Ekos pela empresa brasileira Natura, formada por cosméticos com ativos extraídos de matéria primas da floresta amazônica é um dos casos de destaque. Em 2004, a linha respondeu por 10% do faturamento da empresa, que chegou à casa de R\$ 2,5 bilhões. Entre os produtos da linha Ekos encontra-se perfumes à base breu branco (resina extraída de *Protium pallidum*) e priprioica (extraída do rizoma *Cyperus articulatus*) (BARATA, 2005).

Atualmente, o grupo de pesquisa sob a liderança do Prof. Dr. Mateus Freire Leite, instalado no laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia, vem se dedicando ao desenvolvimento de fragrâncias inovadoras a partir de compostos aromáticos obtidos de fontes naturais e sintéticas, tendo já identificado espécies de plantas aromáticas promissoras para o desenvolvimento de fragrâncias, inclusive com patente de fragrância depositada junto ao INPI (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2012). No entanto, até o presente momento, utilizando-se de veículos alcoólicos.

A tendência do mercado de perfumaria pela preferência de produtos livre de solventes orgânicos como álcool, associado ao caráter fortemente hidrofóbico das matérias primas das fragrâncias, gerou um problema no desenvolvimento de fórmulas destes produtos. A saída encontrada foi solubilização de fragrâncias em estruturas de associação com água-tensoativos (FRIBERG et al., 1999).

Ao contrario da crença que apenas fragrâncias finas alcoólicas apresentam boa elevação, as fragrâncias veiculadas em água também apresentam boa difusão. A

substantividade (tenacidade e volume) de um produto aromático aquoso é comparável ao de fragrâncias alcoólicas (DIXIT, 2003). Observa-se através das patentes depositadas um grande interesse de produzir fragrâncias de base aquosa a partir da tecnologia de sistemas nanotecnológicos microemulsionados.

Os princípios da nanotecnologia foram introduzidos na área cosmética há alguns anos. No período entre 1994 e 2005, a L'oreal foi classificada como a quinta empresa no mundo com base no número de patentes relacionadas à nanotecnologias depositadas. No Brasil, a empresa “O boticário” tem investido no setor a partir de linhas de tratamento anti-envelhecimento (DAUDT et al., 2013).

A Nanotecnologia está concentrando investimentos vultosos em todo o mundo. Grande parcela do crescimento do mercado de nanotecnologia provém da capacidade de alguns segmentos, especialmente o farmacêutico, de transformar nanomateriais básicos em produto de alto valor conceituado (PISCOPO et al., 2013). No Brasil, o interesse por nanocosméticos é recente, entretanto, tem atraído o foco de muitas empresas e pesquisadores de universidades brasileiras conceituadas (FAPESP, 2008).

Neste sentido, esse trabalho se justifica pela necessidade de se oferecer alternativas inovadoras de veículos não alcoólicos para o setor de fragrâncias e perfumaria, sob um enfoque nanotecnológico, que proporcione ao produto de características similar ou superior aos existentes e que atendam às demandas de estabilidade; performance aromática e segurança aos usuários exigidas.

4. Objetivos

4.1. Objetivo Geral

Desenvolver, caracterizar e avaliar estabilidade e segurança de sistemas nanométricos emulsionados como veículos de produtos de perfumaria fina.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Desenvolver e caracterizar Fragrâncias a partir de matérias primas aromáticas naturais e sintéticas;
- 4.2.2. Obter óleo fixo de *Spondias tuberosa* Arr. Cam para uso como insumo no desenvolvimento de microemulsões;
- 4.2.3. Desenvolver e selecionar microemulsões para veiculação de fragrâncias;
- 4.2.4. Caracterizar físico-quimicamente a microemulsão selecionada;
- 4.2.5. Avaliar a estabilidade da microemulsão selecionada;
- 4.2.6. Obter formulação de um produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida;
- 4.2.7. Avaliar *in vitro* a segurança do produto desenvolvido pelo método HET-CAM.

5. Material e Métodos

5.1 Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância.

5.5.1 Desenvolvimento da fragrância.

As matérias primas aromáticas utilizadas no presente trabalho foram óleos essenciais de diferentes espécies e substâncias químicas aromáticas de origem sintética. Óleo essencial de Lavandim (*Lavandula hybrida*) foi obtido da BioEssencia[®]. O óleo essencial de Alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) foi obtidos de Lazlo[®]. Óleos de Limão Siciliano (*Citrus limon*), Patchouli (*Pogostemon cablin*) e Sândalo (*Amiris balsamifera*) foram obtidos de Oficina de ervas[®]. Maracujá sintético e galaxolide foram obtidos de Oficina de ervas[®]. Bergamota base, Musgo de carvalho, Geraniol, Cumarina, Salicilato de amila, Floralozone, Musk – T, Nerol, Cedramber, Rosetone, Ionona beta, Linalol, Metil ionona gama, Vertenex foram adquiridos de Sene´s fragrância.

O desenvolvimento da fragrância ocorreu em três etapas. Na primeira, os óleos e matérias primas sintéticas foram solubilizados em veículo alcoólico, a fim de conhecer as características odoríferas dos componentes isolados. As soluções tiveram constituição de 10% da matéria prima, 5% de propilenoglicol e 85% de álcool absoluto e foram armazenadas por 3 dias para maturação (figura 14).

Na segunda etapa, foram realizados teste a partir misturas de misturas em diferentes proporções das soluções preparadas na primeira etapa avaliando-se as características sensoriais obtidas em cada teste. Nesta etapa, foi definida a proporção de cada substância para a composição da fragrância. A terceira etapa consistiu na obtenção da fragrância a partir da formulação escolhida. Foram feitas as misturas dos óleos e matérias-primas puras, obedecendo às proporções definidas na segunda etapa, a fim de observar a reprodutibilidade das características sensoriais alcançadas (figura 14).

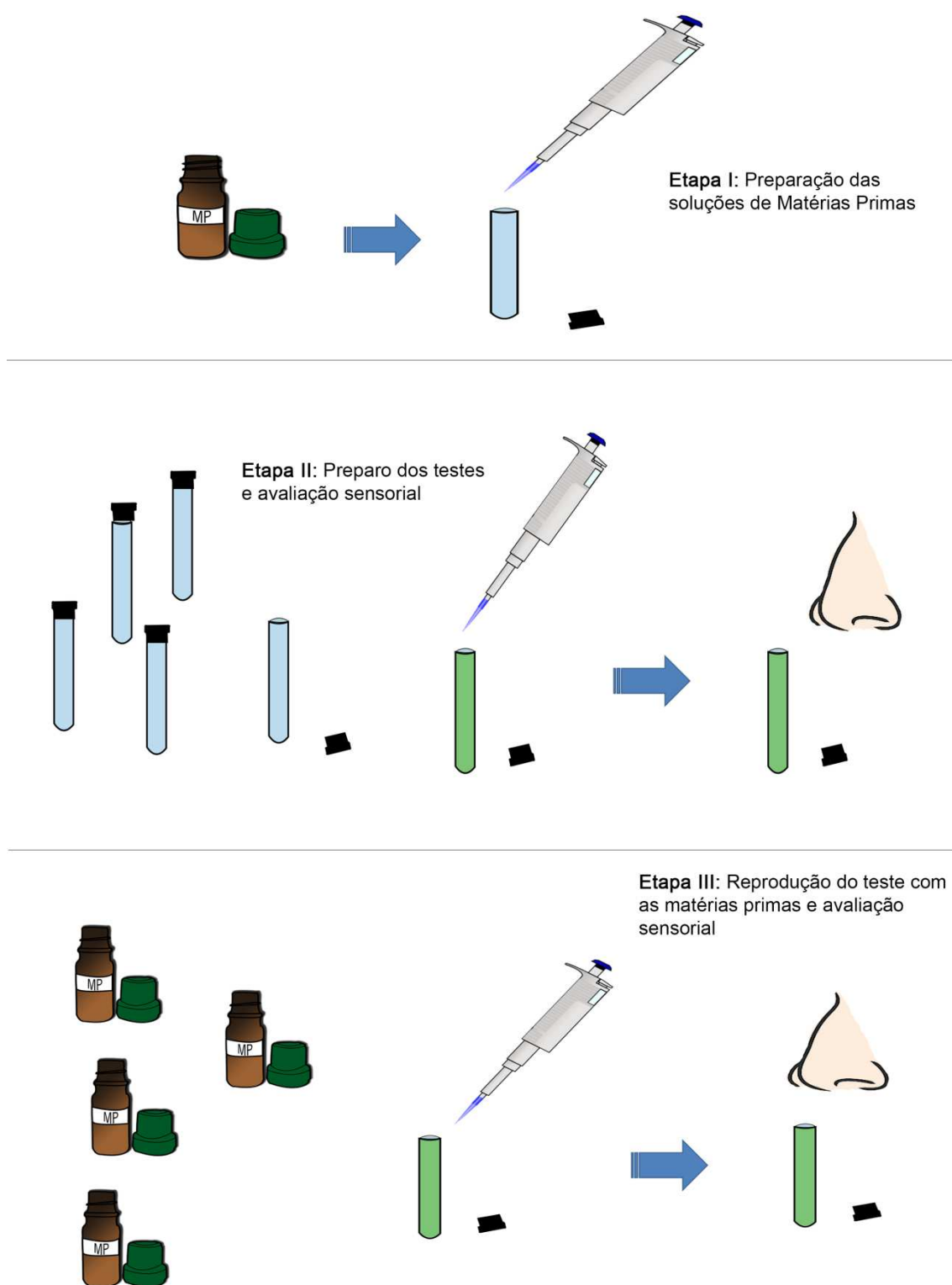


Figura 14. Metodologia de Desenvolvimento da Fragrância

5.1.2 Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometro de Massas (CG-EM).

A fragrância foi caracterizada por cromatografia gasosa acoplada à Espectrometro de massas via headspace. Para análise da amostra, foi transferido 1ml da fragrância veiculada em álcool e 1ml da fragrância veiculada em microemulsão (cujo desenvolvimento e caracterização serão explicados em itens 5.3 e 5.4 da metodologia) em concentrações semelhantes para *vials* de 10ml com tampa e septo. As amostras foram aplicadas via headspace estático (Injetor automático A0C – 5000 Shimadzu). A temperatura de aquecimento da amostra foi de 55°C, com tempo de aquecimento de 30 minutos e agitação de 250rpm durante 60 segundo, com intervalo de 5 segundos. Foram aplicados 1,5ml da fração volátil da amostra. Os componentes da fragrância foram identificados por CG-EM de acordo com a metodologia adaptada de Sousa (2007). A identificação foi feita pela determinação dos índices de retenção, comparação com dados da literatura (ADAMS, 1995) e bancos de dados da biblioteca Wiley. A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo gasoso Shimadzu QP2010 acoplado à espectrômetro de massas (figura 15). Foi utilizada coluna EN5MS de dimensões 30m x 0,25mm x 0,25mm, usando Hélio como gás de arraste com fluxo de 1,30ml/min, pressão de 79,7 kPa e programa de temperatura de 60° a 310°C. Os espectros foram obtidos por impacto eletrônico em 70ev.



Figura 15. Cromatógrafo a gás acoplado a espectrometro de massas Shimadzu QP2010 (Disponível em: <<http://www.shimadzu.com.br/analitica/produtos/gcms/images/gcms-qp2010ultra.jpg>>. Acesso em 05 de abril de 2015).

5.2 Obtenção do óleo fixo de *Spondias tuberosa* Arr. Cam

Frutos de *Spondias tuberosa* Arr. Cam foram obtidos no comércio da cidade de Vitória da Conquista no período entre dezembro de 2013 e fevereiro de 2014. As sementes foram despulpadas; limpas; secas em temperatura ambiente por 5 dias e posteriormente trituradas.

O óleo fixo de *Spondias tuberosa* foi obtido através de extração em aparelho soxhlet das sementes trituradas. Foram pesadas 70 gramas das sementes e acondicionadas em cartuchos de papel filtro, que em seguida foram alocados na câmara de extração do soxhlet. À parte inferior do soxhlet acoplou-se um balão de fundo redondo de 1000ml contendo em seu interior 500ml de Éter de Petróleo, enquanto na parte superior, conectou-se um condensador. O sistema foi colocado em aquecimento através de uma manta térmica, que fornecendo calor suficiente para ebulição do éter de petróleo (aproximadamente 60°C), o fez evaporar passando pela tubulação atingindo o condensador. O resfriamento do solvente o faz cair na câmara de extração do aparelho, permanecendo na mesma até enchimento ao nível do sifão, quando então o solvente, contendo o óleo extraído, retorna ao balão. O processo foi repetido pelo tempo de 2 horas (figura 16).

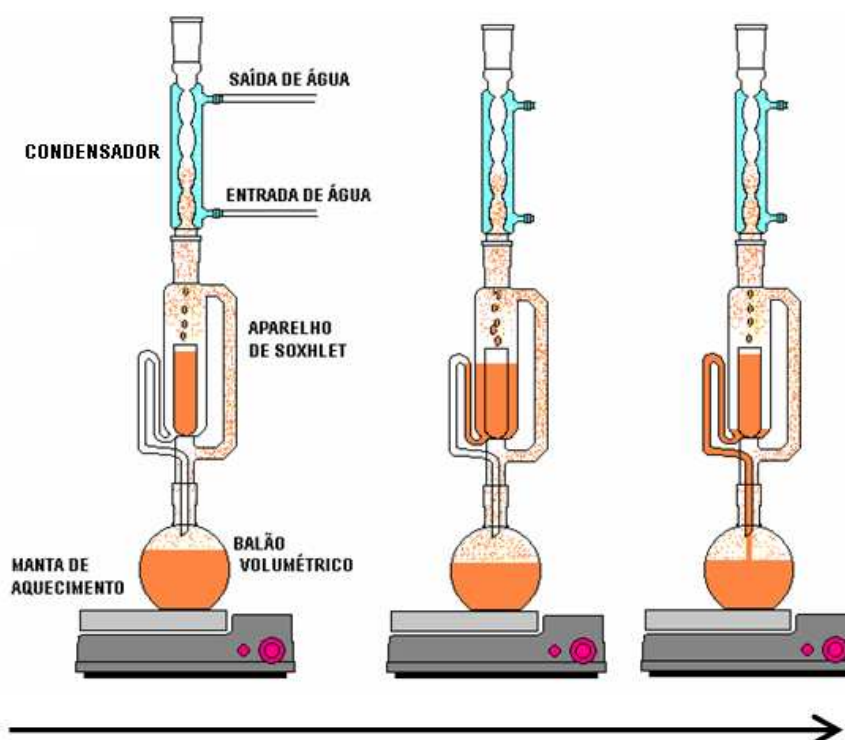


Figura 16. Extração de óleo em aparelho soxhlet. (Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAABN34AL/extracao-lipidios-alimentos>> Acesso em 05 de abril de 2015).

Ao término da extração, o balão foi desacoplado do extrator e submetido à evaporação rotativa para remoção do solvente. Após esse processo, o óleo foi ainda acondicionado em

estufa à 70°C a fim de eliminação completa do solvente, antes da utilização no desenvolvimento de microemulsões.

5.3 Desenvolvimento e seleção de microemulsões

5.3.1 Construção de diagramas de fases pseudo-ternário

A construção de diagramas de fase pseudo-ternário se deu a partir da titulação de misturas de tensoativos/co-tensoativos e componentes de fase oleosa com água, à temperatura ambiente. As misturas de tensoativos/co-tensoativos e componentes de fase oleosa para a construção de cada diagrama seguiram as proporções determinadas de acordo com a tabela 1. A seleção dos componentes foi embasada nos EHL dos tensoativos (*Span* 85: 1,8; *Span* 80: 4,3; PEG 40: 14,0 – 16,0; *Tween* 20: 16,7) e nas características das matérias primas, e foi guiada pelo objetivo de se obter microemulsões A/O ou O/A com sensorial de toque seco, baixa viscosidade, transparência e rápida secagem, condições desejadas para um produto destinado à perfumaria fina.

Foram preparadas 5,0 gramas de misturas definidas na tabela 1. Em seguida, deu-se início ao processo de titulação de água, inicialmente em volumes de 125µL(2 adições), seguido de um aumento para 250µL (19 adições) e por fim para 500µL (30 adições). Após cada adição de água, o sistema era homogeneizado e deixado em repouso em tempo padronizado em 10 minutos, quando então era avaliado, quanto ao aspecto, como um sistema bifásico, um sistema emulsionado ou um sistema microemulsionado (figura 17). Foram realizadas, no total, 51 adições de água somando um volume de 15,0ml de água ao fim de cada titulação e uma massa final de 20,0g para cada mistura. A construção do diagrama foi feita no software *SigmaPlot 10* a partir dos dados obtidos das 468 formulações avaliadas nas titulações. Foram realizados 4 diagramas no presente trabalho, cujas composições estão dispostas na tabela 2.

Tabela 1. Relação proporcional das misturas de tensoativo/co-tensoativo e fase oleosa para construção de diagrama de fases pseudo-ternário.

Misturas	Composição
1ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (1:9)
2ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (2:8)
3ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (3:7)
4ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (4:6)
5ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (5:5)
6ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (6:4)
7ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (7:3)
8ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (8:2)
9ª Mistura	Tens./Co-Tens : Fase Oleosa (9:1)

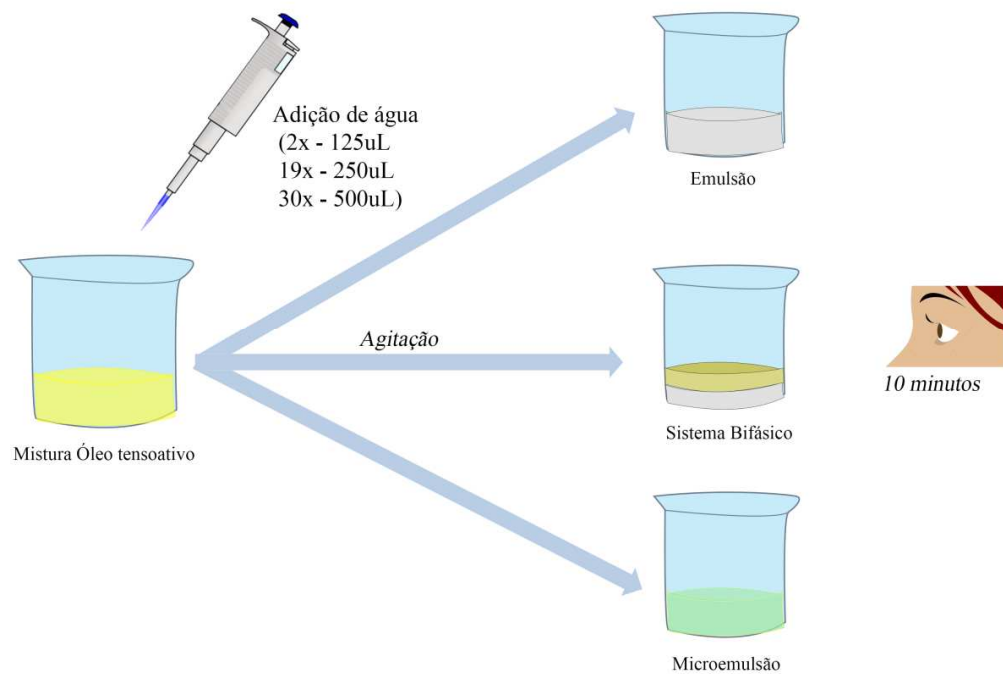


Figura 17. Procedimento de Titulação no diagrama de fases

Tabela 2. Composição dos diagramas de fases desenvolvidos.

Diagramas	Fase aquosa	Fase Oleosa	Tensoativos
<i>Diagrama 1</i>	Água	Óleo de <i>Spondias tuberosa</i>	PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1)
<i>Diagrama 2</i>	Água	Silicone Volátil	PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1)
<i>Diagrama 3</i>	Água	Miristato de Isopropila : Silicone volátil (8:2)	PEG 40:Span 85:Tween 20 (2:1:1)
<i>Diagrama 4</i>	Água	Fragrância T64	PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1)

5.3.2 Seleção de microemulsões

Após a construção dos diagramas de fases pseudo-ternários e da definição por análise macroscópica de suas respectivas faixas de microemulsão, alguns sistemas foram selecionados para serem reproduzidos a partir das quantidades exatas de água, óleo, tensoativos/cotensoativos apontadas pelos diagramas a fim de verificar a influência da porcentagem de óleo e da mistura de tensoativos nas características desejáveis para um sistema nanométrico emulsionado quanto ao: tamanho de partícula (inferior à 100nm para ser caracterizado como nanométrico); homogeneidade na distribuição granulométrica de partículas (com um baixo índice de polidispersividade) e estabilidade (comportando-se como sistema de fase única após centrifugação) (BRASIL, 2004).

Com base nesses resultados, bem como de dados obtidos a partir da análise macroscópica, sensorial e da avaliação quantitativa da composição da microemulsão foi escolhido o sistema com melhor perfil de qualidade para caracterização mais detalhada, avaliação da estabilidade, desenvolvimento do produto e avaliação de segurança.

5.4 Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida

5.4.1 Microscopia de luz polarizada

A microemulsão contendo a fragrância selecionada foi observada em microscopia de luz polarizada a fim de avaliar a isotropia do sistema. A microemulsão foi disposta em uma lâmina de microscopia, coberta por lamínula e posteriormente observada em microscópio de luz polarizada (Olympus BX-50). A análise foi realizada em triplicata, observando três campos em cada replicata.

5.4.2 pH

A microemulsão selecionada teve o seu valor de pH determinado por um pHmetro (MS- Tecnopom®, modelo mpA-210).

5.4.3 Condutividade

A condutividade (em $\mu\text{S}/\text{cm}$) da microemulsão desenvolvida foi determinada à temperatura ambiente com o auxílio de um condutivímetro digital Gehaka® modelo CG 1800, a fim de concluir se o sistema isotrópico em estudo apresenta água ou óleo na fase externa.

5.4.4. Densidade Relativa

A densidade da microemulsão, relação entre massa e volume, foi determinada pela densidade relativa utilizando água purificada como substância padrão.

O cálculo da densidade relativa foi executada à temperatura de 20°C, pelo método tradicional do picnômetro (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010; BRASIL, 2000). A densidade da microemulsão desenvolvida foi calculada através da equação III, onde d representa a densidade; m_0 a massa do picnômetro vazio; m_1 a Massa do picnômetro com água purificada a 20°C e m_2 a massa do picnômetro com amostra a 20°C. A análise foi feita em triplicata.

$$d = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \quad (\text{Equação III})$$

5.4.5 Índice de Refração

O índice de refração do sistema microemulsionado selecionado foi determinado através de refratômetro analógico (ABBE 2 Waj), por adição de uma alíquota de 50 μ L da amostra na câmara do mesmo, seguido de leitura manual, como método auxiliar para determinação do caráter nanométrico do sistema. A análise foi feita em triplicata.

5.4.6. Tamanho de gotículas e índice de polidispersividade.

A microemulsão desenvolvida obteve a caracterização do tamanho de gotículas e índice de polidispersividade determinado com o auxílio de um *Light Scattering* modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (*Malvern Instruments*) (figura 18).



Figura 18. Zetasizer Nano ZS - ZEN3601. (Disponível em: <<https://www.ices.a-star.edu.sg/media/1186/cps14.jpg>> Acesso em 05 de abril de 2015)

5.4.7. Potencial Zeta

A caracterização de potencial zeta da microemulsão foi determinada com o auxílio de um *Light Scattering*, modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (*Malvern Instruments*) (figura 18).

5.4.8 Reologia

O perfil reológico da microemulsão selecionada foi avaliado por um Reômetro *Brookfield*, modelo DV-III Ultra, acoplada a um computador com *Software Rheocalc V3.2*. *Brookfield Engineering Laboratories* com a utilização de *spindle* ULA, à 25 °C (figura 19).

As medições foram realizadas em triplicata em velocidades progressivamente maiores (intervalos de 10 a 75 rpm) para a obtenção da curva ascendente e em velocidades progressivamente menores (intervalo de 75 a 10 rpm), para obtenção da curva descendente.



Figura 19. Reômetro *Brookfield* DV-III Ultra e spindle ULA.

5.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida.

5.5.1. Teste de estabilidade preliminar.

5.5.1.1. Centrifugação.

A microemulsão selecionada foi centrifugada, imediatamente após o preparo, a 3000 rpm por 30 min, à temperatura ambiente, a fim de se determinar sua estabilidade como um sistema isotrópico de fase única (BRASIL, 2004).

5.5.1.2 Estresse térmico.

A microemulsão selecionada foi submetida a aquecimento (estufa) na faixa de temperatura de 40 a $80 \pm 5^\circ\text{C}$, durante ciclos de 30 minutos, com incrementos de temperatura de 5°C após cada ciclo. Após o término do teste, a microemulsão foi avaliada quanto ao aspecto macroscópico, pH, condutividade, potencial zeta e tamanho de gotículas, que foram registrados em cada ciclo em que a mesma foi submetida a fim de se avaliar a estabilidade da mesma (MORAIS et al., 2008; BRASIL, 2004).

5.5.2. Avaliação do potencial zeta em função da variação de pH.

A fim de observar o comportamento do potencial zeta da microemulsão desenvolvida em função do pH, a microemulsão teve seu pH alterado dentro da escala de pH em valores situados entre 1,0 a 13,0. A variação de pH foi realizada utilizando como acidificantes soluções de ácido cítrico 10%, ácido clorídrico 0,1M e alcalinizante hidróxido de sódio 0,1M.

Os valores de pH foram registrados em pHmetro MS TECNOPON[®] (modelo mPA-210); a microemulsão foi submetida a análise do potencial zeta por um *Light Scattering*, modelo Zetasizer Nano ZS – ZEN3601 (*Malvern Instruments*), em cada condição de pH obtida.

5.5.3. Estudo da estabilidade acelerada.

A microemulsão selecionada foi submetida a diferentes temperaturas ($4\pm 2^{\circ}\text{C}$, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, $40\pm 2^{\circ}\text{C}$), por um período de 90 dias. Nesse período, a microemulsão foi avaliada quanto a possíveis alterações no aspecto macroscópico, pH, condutividade, potencial zeta e tamanho de gotículas. As análises das referidas características aconteceram no tempo zero, 1º dia, 7º dia, 15º dia, 30º dia, 60º dia e 90º dia conforme descrito no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2004).

5.6. Obtenção de formulação de produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida.

A Tabela 3 apresenta os componentes que foram utilizados para compor a formulação do produto de perfumaria livre de álcool etílico utilizando sistemas nanométricos emulsionados.

Tabela 3. Formulação do produto com seus componentes e suas funções.

Componente	Função
PEG 40	Tensoativo
Tween 20	Co-tensoativo
Span 80	Co-tensoativo
Fragrância	Fase Oleosa/Fragrância
Butil-Hidroxi-tolueno (BHT)	Antioxidante
Triclosano	Conservante
Água	Veículo

5.7. Avaliação *in vitro* da segurança do produto desenvolvido.

5.7.1. Teste de irritabilidade ocular – teste em membrana córneo-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM).

A avaliação *in vitro* do potencial de irritabilidade ocular foi feita através do teste em membrana córneo-alantóide (MCA) de ovos embrionados de galinha como alternativa ao método *in vivo* realizado em olhos de coelho. Foram adquiridos ovos embrionados de galinhas

em fornecedores locais da cidade de Vitória da Conquista. Os ovos foram selecionados quanto à adequabilidade de peso (50g); aparência e integridade da casca; idade do ovo embrionado e presença da câmara de ar, observada por ovoscopia, com auxílio da transiluminação de uma lanterna.

Os ovos viáveis foram submetidos à incubação em dispositivo sustentável desenvolvido por pesquisadores do grupo de pesquisa e desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos do IMS/UFBA (UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA, 2013) em temperatura de $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa interna de 45%. Ao décimo dia de incubação, os ovos foram retirados. Foi realizada nova ovoscopia a fim de demarcar a região da câmara de ar. A região demarcada do ovo foi então cortada e o ovo foi aberto com auxílio de motor odontológico, serra rotativa MICRODENT[®]. A MCA foi exposta através da retirada da membrana externa da câmara de ar com uma pinça, com cuidado para que não houvessem danos à mesma.

Exposta a membrana cório-alantóide, foram aplicadas 300 μL das amostras (Microemulsão desenvolvida, Solução hidróxido de 0,1M como controle positivo e Solução salina 0,9% como controle negativo). Os efeitos das amostras sob a membrana foram avaliados por 5 minutos, onde foram observados como critérios de lesão à MCA a presença de hiperemia, hemorragia e processos de coagulação. O nível de gravidade da irritação foi classificado através da pontuação total obtida, de um barema que relaciona a presença dos critérios de lesão e o tempo de aparecimento após a aplicação (Tabelas 4 e 5) (Luepke (1985) adaptado por Bernadi (2011)). Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média aritmética.

Tabela 4. Esquema da escala de irritação dos efeitos observados no método HET-CAM em decorrência do tempo.

Efeito	Escala de irritação de acordo com o tempo		
	≤ 30 s	31 s - 2 min	> 2 min - 5 min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 5. Classificação do potencial de irritação, adaptado de Luepke (1985).

Escore da avaliação no HET-CAM	Grau de Irritação
0 a 0,99	Não irritante
1 a 4,99	Leve
5 a 8,99	Moderado
9 a 21	Grave

6. Resultados

6.1 Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância.

6.1.1 Desenvolvimento da fragrância.

Foram desenvolvidas, neste trabalho, 65 formulações de fragrâncias cujas constituições são apresentadas na tabela 6. A formulação 64 (T64) apresentou-se como a mais agradável sensorialmente, sendo escolhida para as etapas de caracterização cromatográfica e veiculação em sistemas microemulsionados.

6.1.2. Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

A figura 20 apresenta o cromatograma obtido pela análise da fragrância em cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas via *headspace*. Os componentes identificados com seus respectivos tempos de retenção, índices de Kovats, área relativa em porcentagem, e índice de similaridade dos espectros de massa obtidos com dados da biblioteca Willey estão expostos na tabela 7.

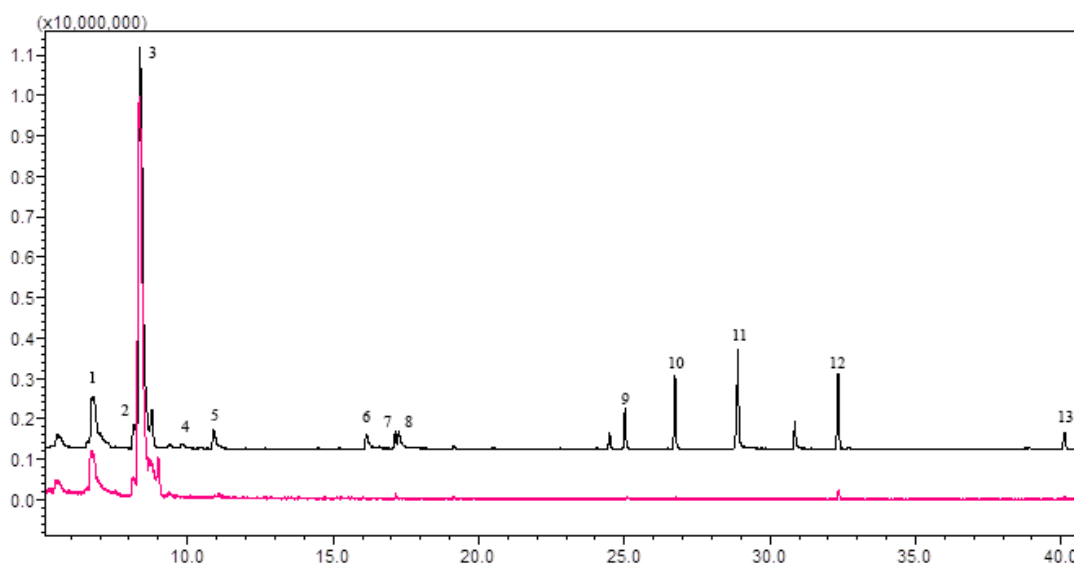


Figura 20. Cromatograma obtido da análise da fragrância em CG-EM via *headspace*. A linha em vermelho corresponde ao perfil cromatográfico da fragrância em veículo alcoólico. A linha em preto corresponde ao perfil da fragrância veiculada em microemulsão. A – amilato de amila; h – floralozone; i – galaxolide.

Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento.

Ingredientes	Composição (%)												
	T01	T02	T03	T04	T05	T06	T07	T08	T09	T10	T11	T12	T13
<i>Amyris Balsamifera</i> O.E.	-	-	-	-	-	20,4	20,9	-	-	24,1	24,9	23,5	-
Bergamota Base	-	-	-	-	-	1,0	0,5	-	-	0,6	-	-	-
<i>Citrus Limon</i> O.E.	-	1,0	1,2	1,0	-	-	-	0,5	-	-	0,4	-	-
Cedramber	13,3	-	-	-	-	30,5	31,4	-	-	24,1	31,2	29,4	-
Cumarina	4,0	1,9	-	2,2	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-
Floralozone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,0
Galaxolide	13,3	19,0	-	10,9	10,2	15,2	15,7	21,0	12,2	18,1	18,7	17,6	-
Geraniol	-	-	24,9	-	-	15,2	15,7	-	-	18,1	9,3	8,8	-
Ionona Beta	-	-	-	-	-	-	-	2,6	9,1	-	-	-	9,7
<i>Lavandula hybrida</i> O.E.	2,7	5,7	-	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-
Essência Maracujá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Ionona Gama	6,7	-	-	-	-	-	-	10,5	9,1	-	-	-	9,7
Musgo de Carvalho	33,3	28,6	-	32,6	30,7	-	-	-	-	-	-	-	-
Musk T	26,7	38,1	12,3	43,5	40,8	-	-	31,4	36,5	-	-	-	29,0
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	2,6	2,1	-	-	-	-
<i>Pogostemon cablin</i> O. E.	-	-	37,0	-	-	-	-	10,5	6,1	-	-	-	-
Rosetone	-	5,7	-	3,3	10,2	15,2	7,9	-	-	6	6,2	6,0	-
Salicilato de Amila	-	-	12,3	-	6,1	2,5	7,9	-	-	9,0	9,3	14,7	-
Vertenex	-	-	12,3	-	-	-	-	20,9	24,3	-	-	-	22,6

Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento – *continuação*

Ingredientes	Composição (%)												
	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22	T23	T24	T25	T26
<i>Amyris Balsamifera</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bergamota Base	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrus Limon</i> O.E.	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-	0,2	0,2	0,3
Cedramber	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	52,5	30,2	52,5
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floralozone	6,9	3,7	3,6	5,4	3,5	2,5	2,2	-	-	2,8	-	-	-
Galaxolide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	15,1	13,1
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,3	30,2	13,1
Ionona Beta	13,8	18,5	18,2	27,0	26,4	-	32,2	28,0	27,5	41,5	17,5	20,2	17,5
<i>Lavandula hybrida</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,7	-	-	-
Essência Maracujá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Ionona Gama	13,8	18,5	18,2	13,5	13,2	18,5	16,1	14,0	13,8	20,8	-	-	-
Musgo de Carvalho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Musk T	34,5	37,0	36,4	36,0	35,2	49,4	43,0	37,4	36,7	-	-	-	-
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pogostemon cablin</i> O. E.	3,4	3,7	1,8	1,9	1,8	2,5	2,2	-	1,8	2,8	3,5	4,1	3,5
Rosetone	6,9	3,7	-	-	-	-	-	-	3,7	-	-	-	-
Salicilato de Amila	-	-	-	-	3,5	4,9	4,3	3,8	-	5,5	-	-	-
Vertenex	20,7	14,9	21,8	16,2	15,9	22,2	-	16,8	16,5	24,9	-	-	-

Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento - *continuação*

Ingredientes	Composição (%)												
	T27	T28	T29	T30	T31	T32	T33	T34	T35	T36	T37	T38	T39
<i>Amyris Balsamifera</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bergamota Base	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	-	0,1
<i>Citrus Limon</i> O.E.	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cedramber	46,4	46,4	63,4	58,3	60,5	63,1	63,8	61,8	64,4	54,8	37,7	56,2	57,9
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floralozone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Galaxolide	11,6	11,6	7,9	10,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Geraniol	23,2	23,2	15,8	13,1	8,1	4,2	8,5	-	8,6	10,9	15,1	8,4	5,8
Ionona Beta	15,5	-	-	-	-	-	-	6,2	-	-	-	-	-
<i>Lavandula hybrida</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Essência Maracujá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Ionona Gama	-	-	-	-	-	-	-	-	4,3	5,5	7,5	5,6	5,8
Musgo de Carvalho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Musk T	-	-	-	-	20,2	21,0	21,3	20,6	21,5	27,4	37,7	28,1	29,0
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pogostemon cablin</i> O. E.	3,1	3,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosetone	-	15,5	10,6	14,6	10,0	10,5	5,3	10,3	-	-	-	-	-
Salicilato de Amila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
Vertenex	-	-	2,1	3,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,8	1,4	1,4

Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento - *continuação*

Ingredientes	Composição (%)												
	T40	T41	T42	T43	T44	T45	T46	T47	T48	T49	T50	T51	T52
<i>Amyris Balsamifera</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	17,5	9,3	8,9	7,5	-	9,6
Bergamota Base	0,4	0,5	0,6	0,3	0,8	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,7	0,5	0,5
<i>Citrus Limon</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cedramber	42,4	43,3	39,0	42,1	24,2	-	12,7	10,9	23,1	5,6	6,3	6,3	6,0
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floralozone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2
Galaxolide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19,8	-	-
Geraniol	4,2	-	-	-	-	-	-	3,2	-	-	-	-	-
Ionona Beta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Lavandula hybrida</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Essência Maracujá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metil Ionona Gama	8,5	8,7	15,6	22,5	19,4	24,0	22,9	19,7	20,8	22,4	19,8	25,1	23,9
Musgo de Carvalho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Musk T	42,4	43,3	39,0	28,1	48,4	60,1	50,9	32,7	34,7	44,7	37,6	50,3	47,8
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pogostemon cablin</i> O. E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosetone	-	-	-	-	-	-	-	4,4	4,6	4,5	-	2,5	-
Salicilato de Amila	-	2,1	3,9	5,6	4,8	6,0	7,6	10,9	6,9	8,9	7,5	10,0	9,6
Vertenex	2,1	2,2	1,9	1,4	2,4	9,0	5,1	-	-	4,5	0,8	5,0	2,4

Tabela 6. Formulação de fragrâncias testadas no desenvolvimento - *continuação*

Ingredientes	Composição (%)												
	T53	T54	T55	T56	T57	T58	T59	T60	T61	T62	T63	T64	T65
<i>Amyris Balsamifera</i> O.E.	-	6,5	4,5	4,9	7,0	8,2	-	-	-	-	-	-	-
Bergamota Base	0,4	0,8	0,2	0,2	0,3	0,3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,8	1,8
<i>Citrus Limon</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	0,3	0,2	0,5	0,5	0,7	0,8	1,8
Cedramber	5,4	6,5	4,5	4,9	7,0	8,2	12,4	12,4	12,5	12,0	19,4	7,4	47,4
Cumarina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Floralozone	0,2	0,3	0,3	0,4	0,6	0,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,6	2,6	3,7
Galaxolide	21,6	25,8	27,0	29,7	-	-	74,6	74,3	74,8	71,9	54,5	57,8	-
Geraniol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,4	2,3	3,5	-
Ionona Beta	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,4	3,9	6,3	4,6
<i>Lavandula hybrida</i> O.E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Linalol	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
Essência Maracujá	1,1	0,6	0,4	0,5	0,7	0,8	1,2	1,2	0,7	0,7	1,2	1,5	2,8
Metil Ionona Gama	21,6	-	21,7	13,9	19,7	22,9	-	-	-	-	-	-	-
Musgo de Carvalho	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Musk T	43,2	51,7	36,0	39,6	56,3	49,1	-	-	-	-	-	-	-
Nerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pogostemon cablin</i> O. E.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rosetone	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicilato de Amila	4,3	5,2	3,6	3,9	5,6	6,5	10,0	9,9	10,0	9,6	15,6	19,3	37,9
Vertenex	2,2	2,6	1,8	2,0	2,8	3,3	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 7. Compostos identificados e quantificados nas análise por CG-EM. IRobs = Índice de retenção observado; IRref = Índice de retenção observado em referência (ADAMS, 1995).

Pico	Composto	t _R	IR _{obs} (IR _{ref})	Amostra Área (%)
1	Beta-pineno	6,750	977,4 (979)	8,53
2	Para-Cimeno	8,155	1022,2 (1024)	2,46
3	Limoneno	8,364	1028,0 (1029)	55,53
4	Dihidro – mircenol	9,815	1068,4 (1073)	0,46
5	Linalol	10,890	1098,3 (1095)	2,28
6	Nerol	16,148	1225 (1229)	1,60
7	Acetato de linalila	17,126	1247,8 (1254)	1,01
8	Geraniol	17,254	1250,8 (1252)	1,67
9	Floralozone	25,020	1435,0 (1444)	2,40
10	Ionona Beta	26,739	1477 (1488)	4,20
11	Salicilato de Amila	28,900	1531,7 (1535)	6,83
12	Cedramber	32,343	1621,4 (1624)	4,33
13	Galaxolide	40,116	1839,3 (1845)	1,33

6.2. Obtenção do óleo fixo de *Spondias tuberosas* Arr. Cam.

A seleção dos frutos de *Spondias tuberosa* se deu através da ausência de lesão ao epicarpo e/ou de estado de deterioração microbiológica. Após o processo de remoção da polpa e secagem das sementes, foram obtidos 2,531Kg em peso. Realizada a extração em aparelho soxhlet e evaporação completa do solvente, o óleo obtido apresenta coloração dourada, aspecto fluido em temperatura ambiente e inodoro.

A partir do procedimento de extração, foram obtidos 53,74g de óleo, destinado ao desenvolvimento de microemulsões. O óleo foi armazenado em frasco de vidro fechado em temperatura de 4,0 ±2°C. O rendimento total obtido na extração foi de 2,12%.

6.3. Desenvolvimento e seleção de microemulsões.

6.3.1. Construção de diagrama de fases pseudo-ternários.

Foram construídos quatro diagramas pseudo-ternários, para a obtenção de microemulsões dentro das características definidas como ideais para a utilização das mesmas

como veículos para fragrância, já mencionados na metodologia 5.3.1. Adotou-se como estratégia inicial a obtenção de sistemas microemulsionados O/A através do uso de tensoativos com altos valores de EHL.

Na Figura 21 segue o diagrama 1 plotado.

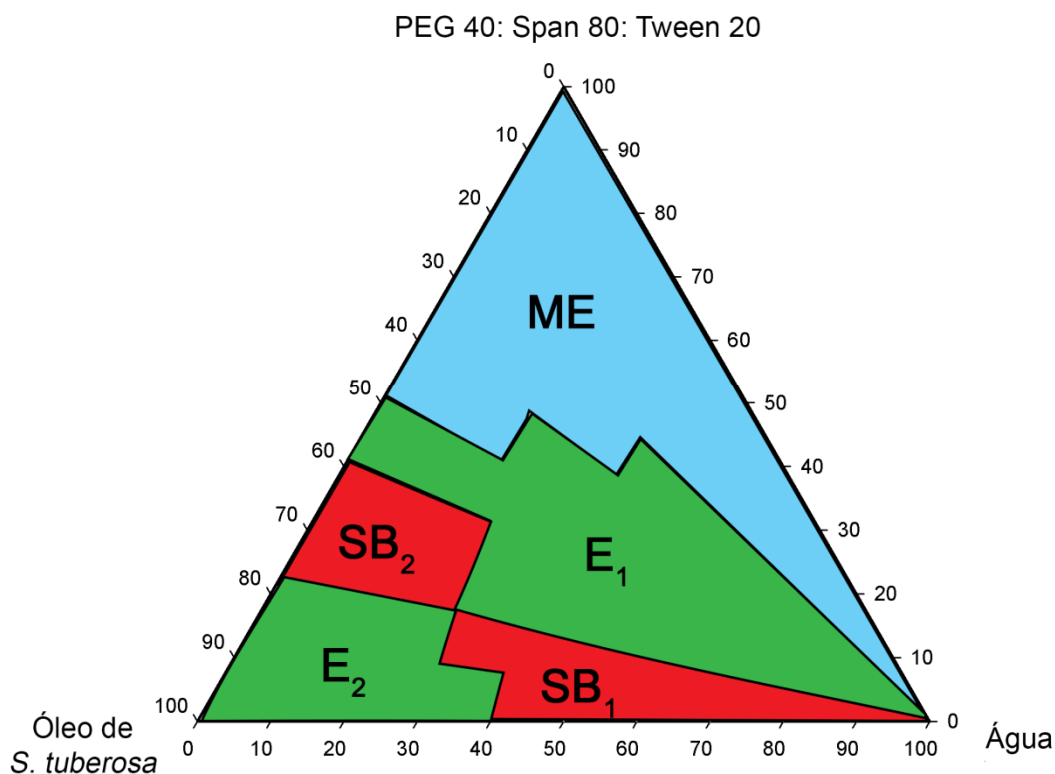


Figura 21. Diagrama de fases pseudo-ternário 1, formado por PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1), Óleo fixo de *Spondias tuberosa* e Água. As regiões em vermelho, verde e azul indicam respectivamente sistemas bifásicos (SB), Emulsões (E) e Microemulsões (ME).

Analisando o diagrama, nota-se a existência de regiões de microemulsão, emulsões e sistemas bifásicos. A região de microemulsão mostrou-se predominante localizada em regiões do diagrama com altas concentrações de água e tensoativos e baixas concentrações de Óleo de *Spondias tuberosa* (valores inferiores a 50,0%). Foram obtidas neste diagrama duas regiões de emulsões, a primeira e mais predominante (E_1) se caracteriza por concentrações intermediárias de tensoativos, ao passo que a segunda (E_2) é definida por altas concentrações óleo com pequenas adições de água. As regiões de separação de fases são distinguidas por altas concentrações de fase oleosa, tendo a região SB_1 baixas concentrações de tensoativos e a região SB_2 baixas concentrações de fase aquosa.

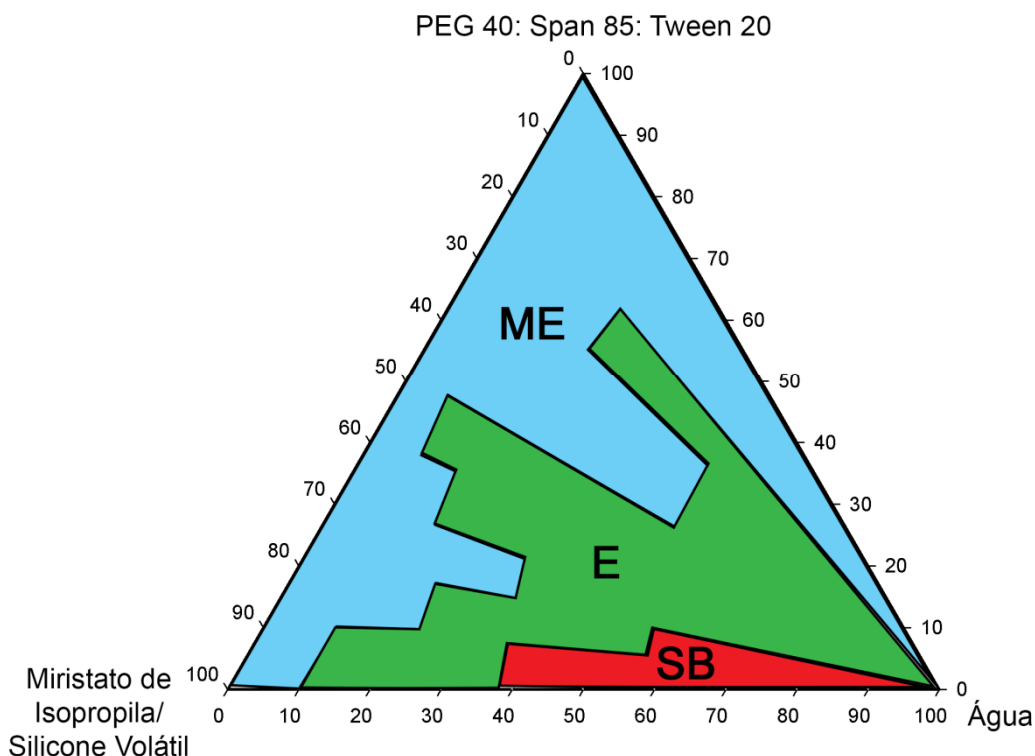


Figura 23. Diagrama de fases pseudo-ternário 3, formado por PEG 40:Span 85:Tween 20 (2:1:1), Miristato de Isopropila:Silicone Volátil (8:2) e Água. As regiões em vermelho, verde e azul indicam respectivamente sistemas bifásicos (SB), Emulsões (E) e Microemulsões (ME).

A figura 24 apresenta o diagrama 4, caracterizado pela utilização do mesmo sistema de tensoativos dos diagramas 1 e 2, contudo, utilizando a fragrância desenvolvida como fase oleosa. O diagrama 4 se destacou pela ausência de regiões de sistemas bifásico e pela ampla região de microemulsões, inclusive em altas concentrações de fase oleosa (superiores a 50,0% de fase oleosa). Tais características demonstraram maior eficiência deste diagrama para a obtenção de microemulsões para veiculação da fragrância, sendo eleitos para a seleção de microemulsões.

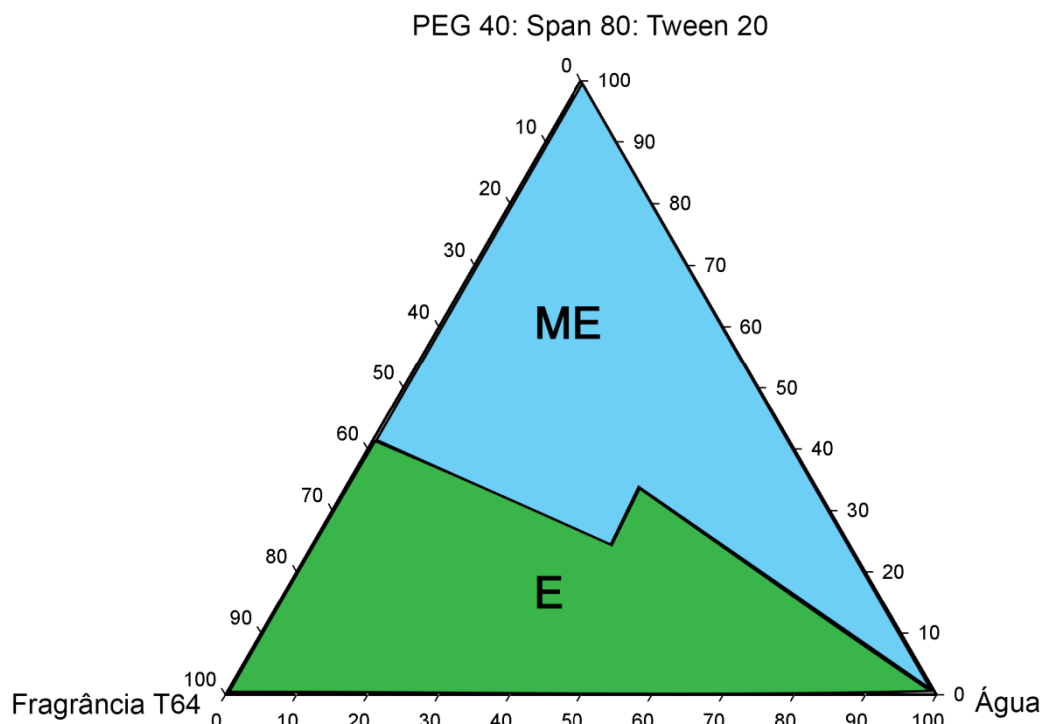


Figura 24. Diagrama de fases pseudo-ternário 4, formado por PEG 40:Span 80:Tween 20 (1:1:1), Fragrância T64 e Água. As regiões em verde e azul indicam respectivamente emulsões (**E**) e microemulsões (**M**).

6.3.2. Seleção das microemulsões

Conforme mencionado no item 6.3.1. o diagrama 4 foi definido como o mais satisfatório dentre os desenvolvidos, sendo escolhido para a seleção das microemulsões e avaliação das mesmas pelo aspecto macroscópico, tamanho de gotículas, índice de polidispersividade e estabilidade pós-centrifugação. A Figura 25 representa os pontos de microemulsões que foram selecionados no diagrama e a Tabela 8 apresenta a composição percentual dos componentes das mesmas.

Além dos critérios técnicos de avaliação de sistemas microemulsionados (tamanho de partículas e índice de polidispersividade), foram avaliadas características de viscosidade e sensorial agradável ao toque na pele e velocidade de secagem, uma vez que se mostram como parâmetro importante para a aceitação de um veículo que tenha como objetivo substituir o álcool mantendo as características deste solvente no produto. A composição da fase oleosa da microemulsão selecionada também foi parâmetro importante a ser avaliado, uma vez que a proporção de fase oleosa, para este produto, impacta diretamente em parâmetros de performance e classificação do produto de perfumaria final.

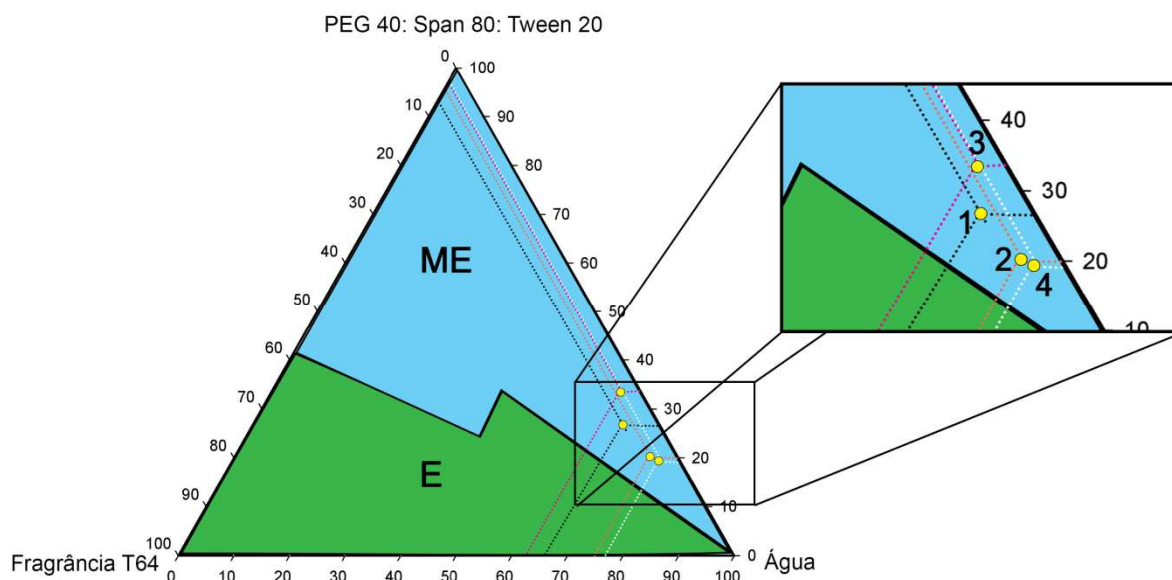


Figura 25. Microemulsões selecionadas do diagrama 4 para análises de tamanho de gotículas, índice de polidispersividade, aspecto macroscópico e centrifugação. (E) Emulsão e (M) Microemulsão, (1) Microemulsão 1, (2) Microemulsão 2, (3) Microemulsão 3 e (4) Microemulsão 4.

Tabela 8. Composição percentual dos componentes das microemulsões selecionadas.

Microemulsão 1	
PEG 40/TWEEN 20/SPAN 80	26,67%
FRAGRÂNCIA T64	6,67%
ÁGUA	66,67%
Microemulsão 2	
PEG 40/TWEEN 20/SPAN 80	20,00%
FRAGRÂNCIA T64	5,00%
ÁGUA	75,00%
Microemulsão 3	
PEG 40/TWEEN 20/SPAN 80	33,33%
FRAGRÂNCIA T64	3,70%
ÁGUA	62,97%
Microemulsão 4	
PEG 40/TWEEN 20/SPAN 80	19,56%
FRAGRÂNCIA T64	4,00%
ÁGUA	76,44%

Macroscopicamente, as microemulsões 2, 3 e 4 mostraram – se como um sistema isotrópico de fase única. A microemulsão 1 apresentou ligeira turbidez, conforme figura 26. Todas as microemulsões mantiveram-se estáveis após o teste de triagem de centrifugação

preconizado pela ANVISA (BRASIL, 2004), não apresentando sinais de precipitação de substâncias.

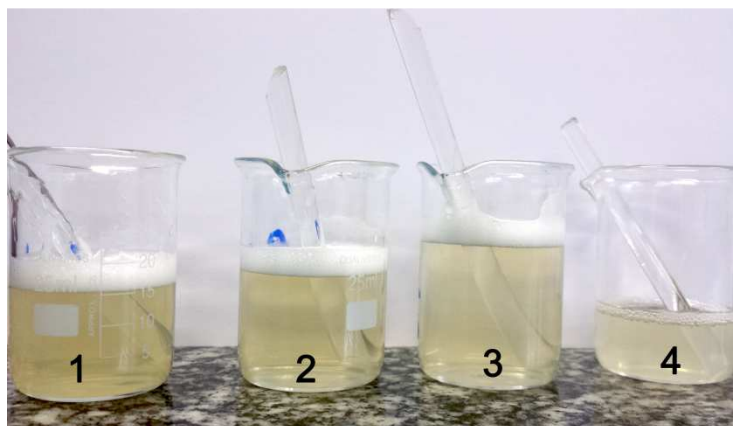


Figura 26. Apecto macroscópico das microemulsões desenvolvidas. Microemulsão 1 (1), Microemulsão 2 (2), Microemulsão 3 (3) e Microemulsão 4 (4).

Os resultados das análises de tamanho de gotículas e índice de polidispersividade são exibidos na tabela 9. Nota-se tamanhos e polidispersão com valores adequados e similares das microemulsões 2, 3 e 4, com ligeiro destaque para a microemulsão 4 em termos de tamanho de partículas. A Microemulsão 1 apresentou valor de tamanho de gotículas compatível com a classificação de microemulsão, contudo, apresentando valor insatisfatório de índice de polidispersividade. Quanto aos aspectos sensoriais, a microemulsão 4 apresentou melhor qualidade em termos de secagem, sensorial e boa viscosidade. Em vista de tais dados, a microemulsão 4 mostrou-se superior às outras selecionadas por apresentar globalmente melhor adequabilidade para o uso como veículo de fragrâncias. Tais resultados subsidiaram sua escolha para caracterização, avaliação de estabilidade e segurança.

Tabela 9. Tamanho de gotículas e índice de polidispersividade das microemulsões selecionadas.

Microemulsão	Tamanho de gotículas (nm)	Índice de Polidispersividade
Microemulsão 1	56,58	0,661
Microemulsão 2	12,34	0,168
Microemulsão 3	12,00	0,147
Microemulsão 4	11,37	0,148

6.4. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida.

Selecionada a microemulsão 4, a mesma foi caracterizada físico-quimicamente através das análises descritas na metodologia 5.4. A tabela 10 apresenta os resultados de pH, condutividade, viscosidade, densidade, índice de refração, tamanho de gotículas e índice de polidispersividade. A figura 27 exibe o perfil reológico da microemulsão selecionada. O resultado da análise de microscopia de luz polarizada é mostrada na figura 28.

Tabela 10. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida. Os valores são representados pela média e desvio padrão (n = 3).

Parâmetro físico-químico	Resultado
pH	6,61±0,045
Condutividade ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	90,4±0,70
Viscosidade (cP)	7,510±0,061
Densidade (g/ml)	1,0269±0,0003
Índice de refração	1,3723±0,002
Tamanho de gotículas (nm)	11,68 ± 0,061
Índice de polidispersividade	0,148 ± 0,004
Potencial zeta (mV)	-7,94 ± 0,37

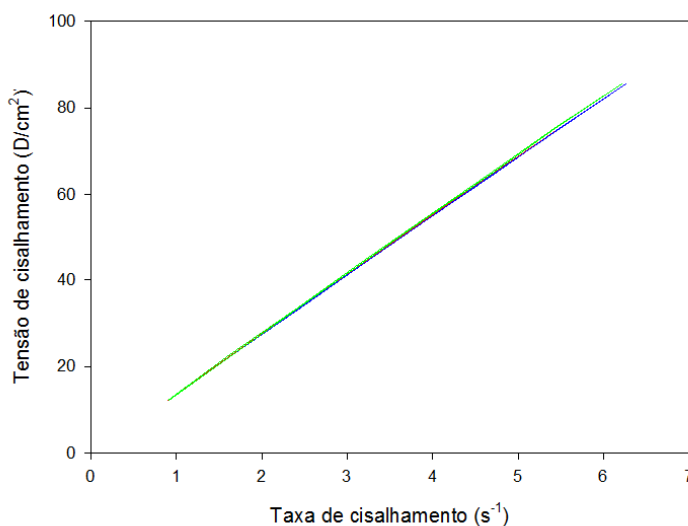


Figura 27. Comportamento reológico da microemulsão desenvolvida.



Figura 28. Resultados de microscopia de luz polarizada da microemulsão 4 (triplicata).

O comportamento da condutividade foi avaliado em função da adição gradativa em água até alcance da quantidade total na formulação (76,44%). A figura 29 apresenta a curva de condutividade da microemulsão selecionada.

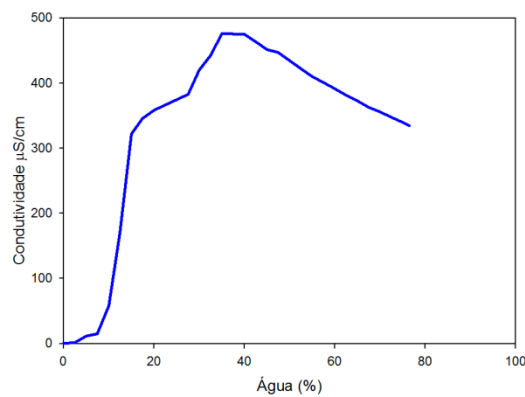


Figura 29. Comportamento da condutividade da microemulsão selecionada com a adição gradativa de água.

6.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida.

6.5.1. Teste de estabilidade preliminar.

6.5.1.1. Centrifugação.

A figura 30 apresenta o aspecto macroscópico da microemulsão antes e após a submissão da mesma ao processo de centrifugação, de acordo com os parâmetros expostos na metodologia. Observa-se a ausência de precipitação de substâncias e separação de fases depois da centrifugação, mantendo a característica de translucidez.

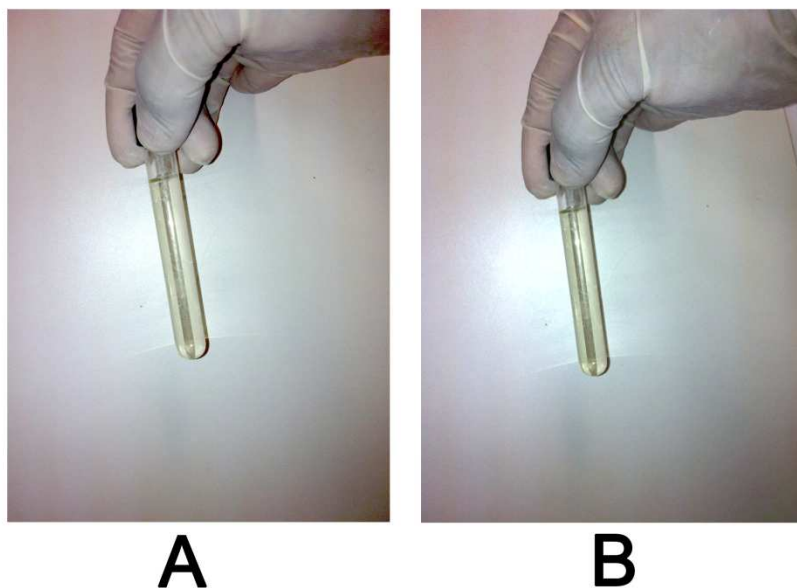


Figura 30. Aspectos macroscópicos da microemulsão antes (A) e após (B) centrifugação a 3000rpm por 30 minutos em temperatura ambiente.

6.5.1.2. Estresse térmico

A microemulsão desenvolvida foi condicionada a ciclos com alterações de temperatura (de 40 à 80°C), e suas características físico-químicas foram avaliadas em cada ciclo (a cada 5°C). A Figura 31 apresenta os resultados obtidos.

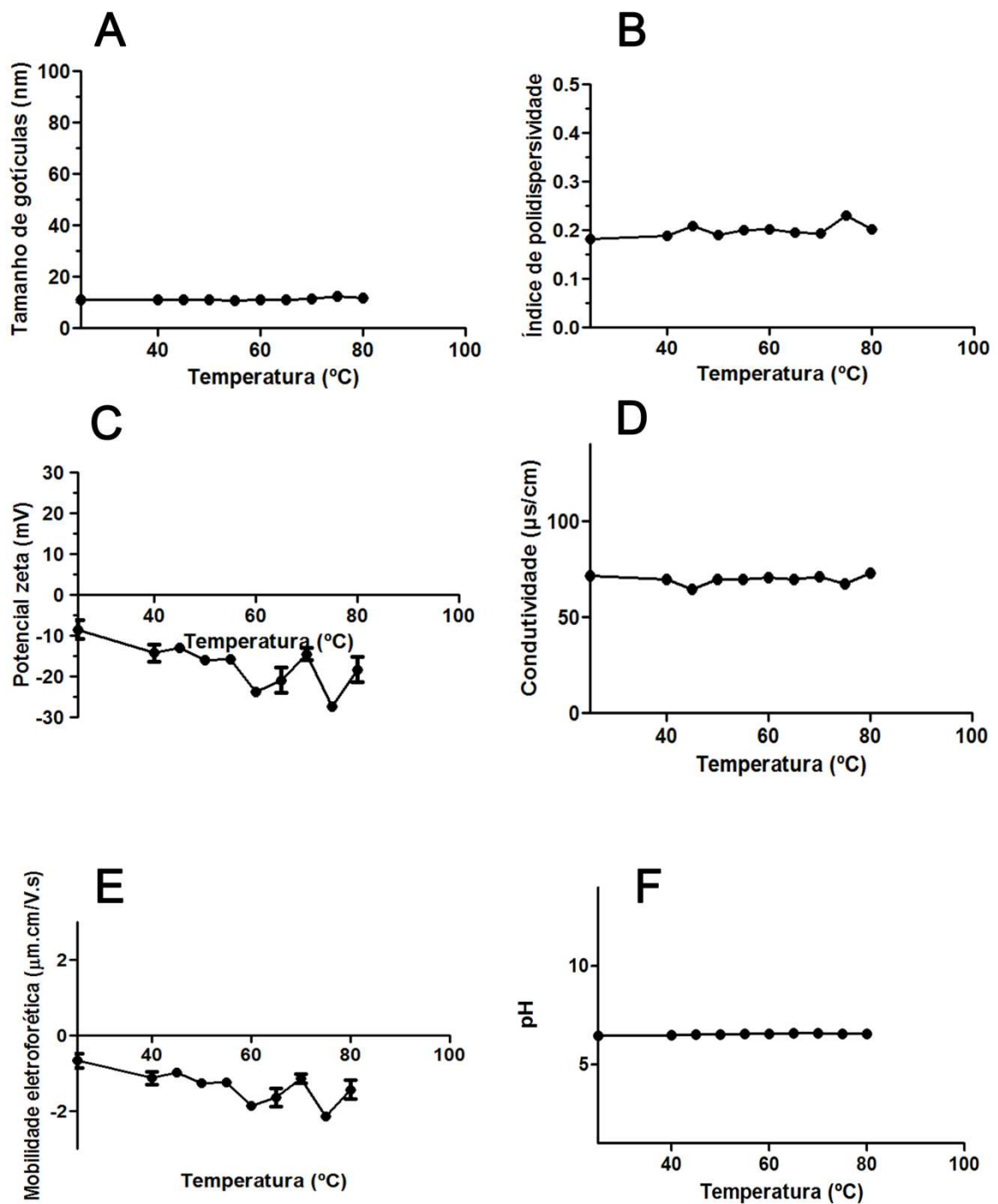


Figura 31. Avaliação das diferentes características físico-químicas da microemulsão durante o estresse térmico. Os valores representam a média \pm desvio padrão (n = 3). (A) Tamanho de gotículas, (B) Índice de polidispersividade, (C) Mobilidade eletroforética, (D) Potencial zeta, (E) pH e (F) Condutividade.

O aspecto macroscópico da microemulsão manteve-se inalterado no estresse térmico até a temperatura de 70°C. A partir dessa temperatura, houve mudança do aspecto transparente para um aspecto turvo-leitoso, sem prejuízo às características físico-químicas.

6.5.2. Avaliação do potencial zeta em função da variação de pH

O potencial zeta da microemulsão foi determinado em pontos diferentes de pH, sendo o valor mínimo o pH igual 1,0 e o valor máximo o pH igual a 13,0 conforme apresentado na Figura 32.

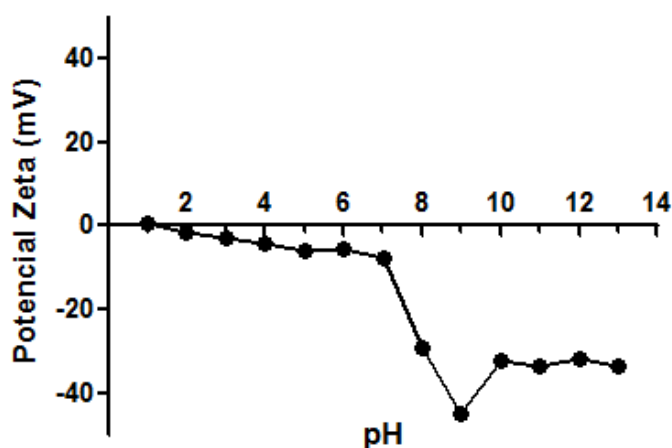


Figura 32. Representação gráfica para identificação do ponto isoelétrico da microemulsão selecionada. Os valores são representados pela média e desvio padrão ($n = 3$).

A partir da análise do valor do potencial zeta em função do pH, observa-se que o valor de potencial zeta se aproxima de zero em pH igual a 1,0, sugerindo que o ponto isoelétrico da formulação é próximo de 1,0.

6.5.3. Estudo da estabilidade acelerada.

A microemulsão selecionada foi submetida a alterações de temperatura em função do tempo (dias) com análise de suas variáveis físico-químicas. Nas Figuras 33, 34, 35, 36, 37 e 38 são apresentados os resultados em cada condição de temperatura do tamanho de gotícula, índice de polidispersividade, potencial zeta, condutividade, mobilidade eletroforética e pH, respectivamente.

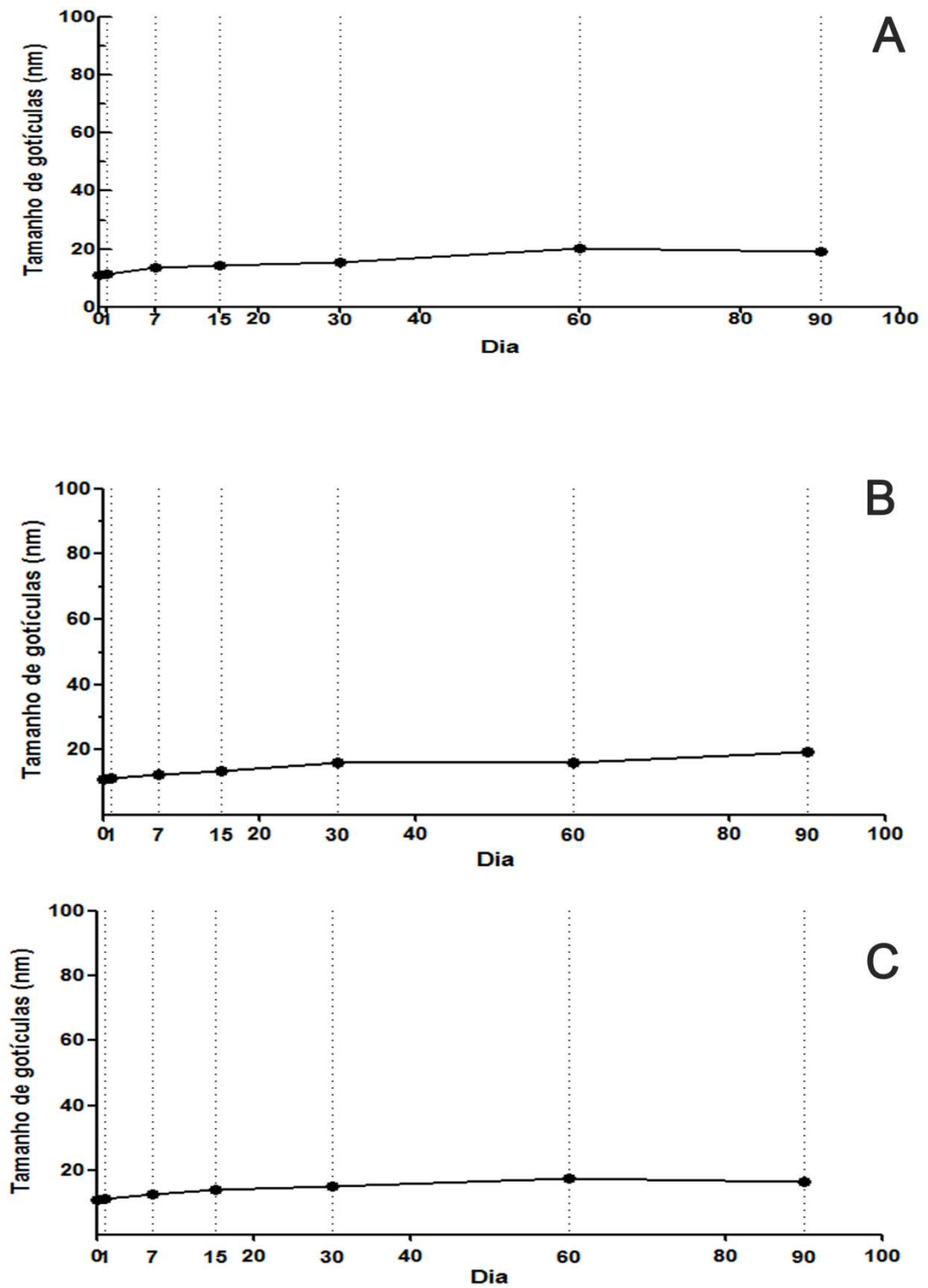


Figura 33. Estabilidade Acelerada: Evolução do tamanho de gotículas nas temperaturas de $40 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (B) e $4 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (C).

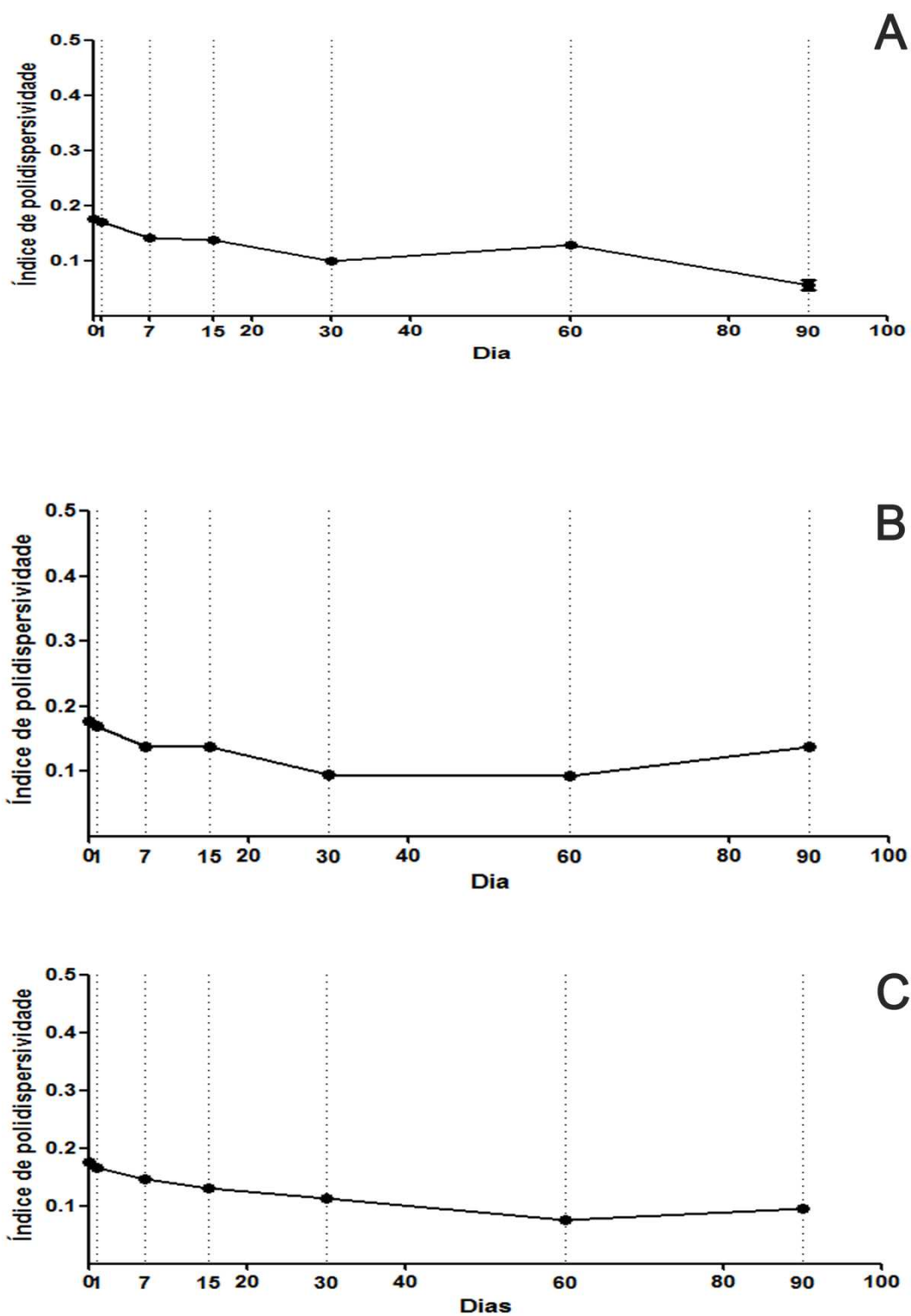


Figura 34. Estabilidade Acelerada: Evolução do índice de polidispersividade nas temperaturas de $40 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (B) e $4 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (C).

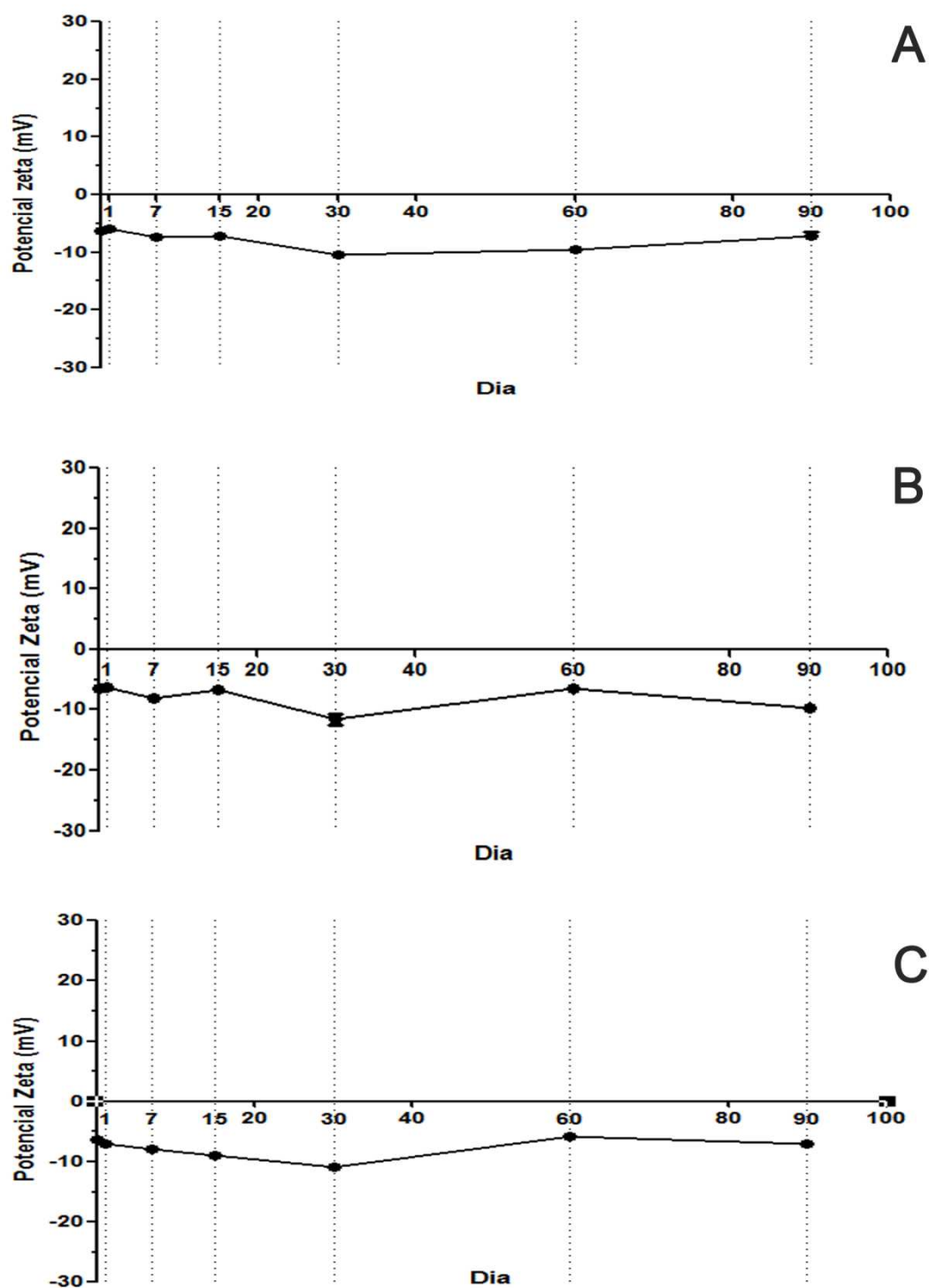


Figura 35. Estabilidade Acelerada: Evolução do potencial zeta nas temperaturas de $40 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (B) e $4 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ (C).

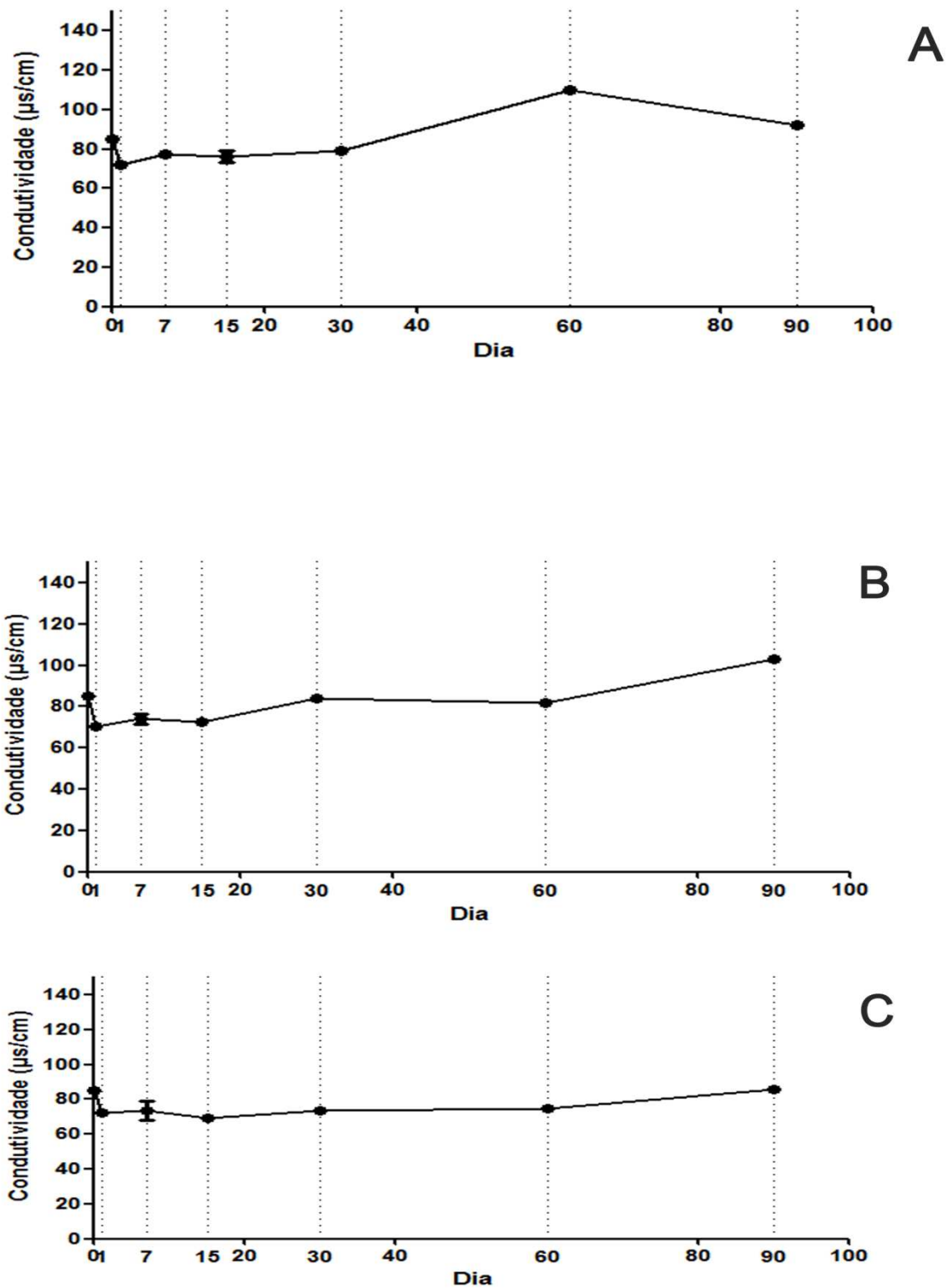


Figura 36. Estabilidade Acelerada: Evolução da condutividade nas temperaturas de $40 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (C).

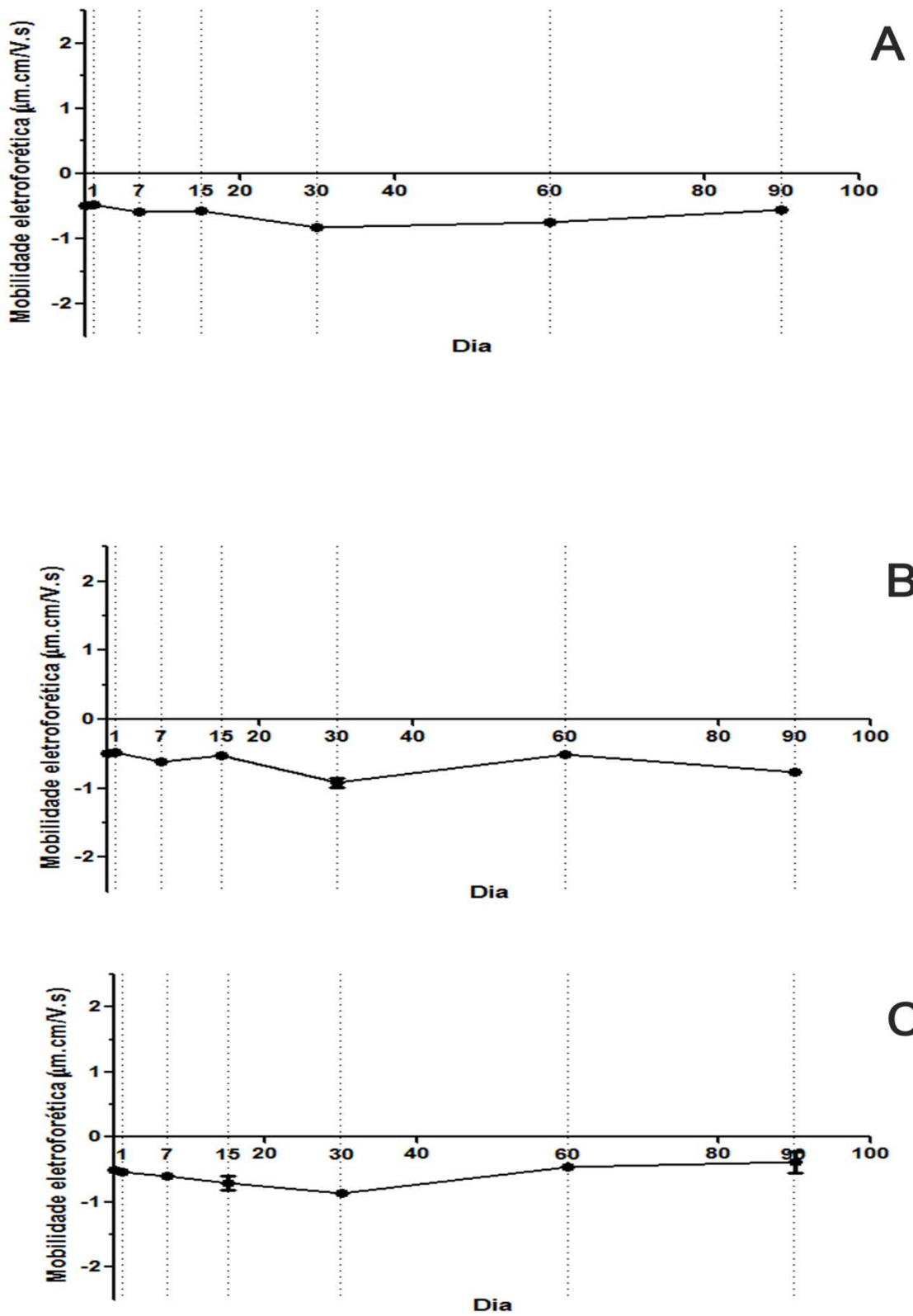


Figura 37. Estabilidade Acelerada: Evolução da mobilidade eletroforética nas temperaturas de $40 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (B) e $5 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (C).

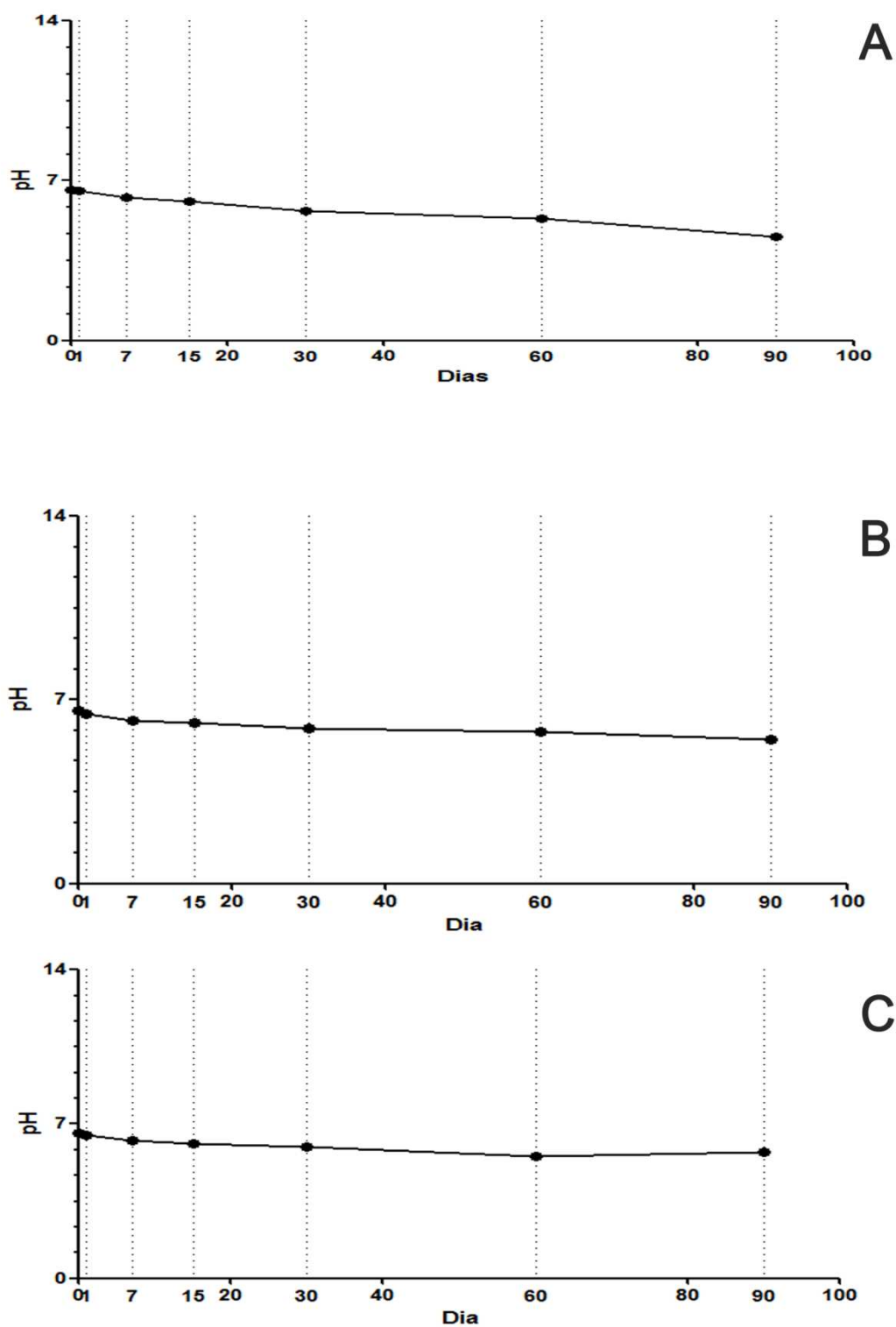


Figura 38. Estabilidade Acelerada: Evolução do pH nas temperaturas de $40 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (A), $25 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (B) e $4 \pm 2,0^\circ\text{C}$ (C).

Não foram observadas alterações macroscópicas em nenhuma das amostras em todos os dias analisados. A microemulsão desenvolvida comportou-se como um sistema de fase única, com solubilização estável da fragrância e sem alterações de coloração. As características olfatórias dos produtos também se mantiveram estáveis em todos os dias e temperaturas avaliados.

6.6 Obtenção de formulação do produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida.

Na tabela 11 está apresentada a formulação obtida para produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida.

Tabela 11. Composição do produto de perfumaria desenvolvido.

Componente	Concentração
PEG 40	6,52%
Tween 20	6,52%
Span 80	6,52%
Fragrância	4,00%
Triclosano	0,20%
BHT	0,05%
Água	76,19%

6.7. Avaliação *in vitro* da segurança do produto de perfumaria fina contendo a microemulsão desenvolvida.

6.7.1 Teste de irritabilidade ocular – teste em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 12. A microemulsão desenvolvida foi classificada como irritante moderado de acordo a caracterização dos eventos que foram observados durante o contato da referente formulação com a membrana cório-alantóide de ovos de galinha embrionados. A partir desta análise, foi definido um escore para cada ovo analisado. A análise em triplicata do produto desenvolvido demonstrou um escore médio de 5,0. Definindo o produto como irritante moderado.

Tabela 12. Escore dos fenômenos irritantes observados por meio do método HET-CAM e a classificação final do grau de irritação do produto de perfumaria das soluções controle NaCl 0,9% e NaOH 0,1M.

Amostra	Fenômeno	Tempo	Escore	Média do Escore	Classificação de Irritação
NaOH 0,1M (ovo 1)	Hiperemia	40s	15	15,6	GRAVE
	Hemorragia	70s			
	Coagulação	100s			
NaOH 0,1M (ovo 2)	Hiperemia	35s	15		
	Hemorragia	65s			
	Coagulação	97s			
NaOH 0,1M (ovo 3)	Hiperemia	30s	17		
	Hemorragia	62s			
	Coagulação	103s			
NaCl 0,9% (ovo 1)	-	5min	0	0	NÃO IRRITANTE
NaCl 0,9% (ovo 2)	-	5min	0		
NaCl 0,9% (ovo 3)	-	5min	0		
Fragrância (ovo 1)	Hemorragia	70s	5	5	IRRITANTE MODERADO
Fragrância (ovo 2)	Hemorragia	90s	5		
Fragrância (ovo 3)	Hemorragia	77s	5		

7. Discussão

7.1. Desenvolvimento e Caracterização da Fragrância

7.1.1. Desenvolvimento da Fragrância

O desenvolvimento da fragrância foi feito respeitando os princípios teóricos para a composição de fragrâncias observados por Carles (1962) e Calkin e Jellinek (1994). Ambos destacam a necessidade de conhecimento das características sensoriais das matérias primas usadas para desenvolvimento mais eficiente. Calkin e Jellinek (1994) também evidencia a habilidade de combinação de olfação comparativa, das formulações entre si e também entre as matérias primas.

Inicialmente, tentou-se nas formulações de 1 a 5 a construção de fragrâncias a partir da combinação de um acorde *fougère* (baseados na combinação de musgo de carvalho, cumarina e lavanda Carles (1962)) e notas animais do musk T e florais como a metil ionona gama, obtendo-se fragrâncias pesadas e olfativamente não agradáveis. As formulações 6 a 12 basearam-se em diversas combinações predominantemente a partir de mistura de cedramber e óleo essencial de sândalo amiris (*Amyris balsamifera*), obtendo-se fragrâncias demasiadamente amadeiradas, sendo também descartadas.

As propostas das formulações 13 a 23 foram pautadas em base floral animal através da mistura das iononas e musk-T; contudo, foi percebida baixa notoriedade de acordes de cabeça, assim como a presença do óleo de patchouli (*Pogostemon cablin*) que não agradou nesta combinação. As formulações 24 a 44 ocorreram na tentativa de obter fragrâncias a partir do cedramber com suavizações do geraniol e bergamota, com aroma demasiadamente herbáceas.

A partir da fórmula 44 o desenvolvimento foi focado na construção de fragrâncias animais (com o uso do musk-T e do galaxolide) menos agressivas pelo uso de notas cítricas de bergamota. A adição do maracujá sintético forneceu caráter mais frutal e suave. Dentre as fórmulas desenvolvidas de acordo com esta estratégia, a formulação 64 foi considerada a mais agradável.

A fórmula 64 tem composição majoritária de galaxolide, um aroma musk, adocicado e poderoso; seguida de salicilato de amila, um herbáceo adocicado levemente floral; cedramber, que tem uma característica amadeirada, com odor levemente herbáceo; geraniol, uma nota floral suave característico de rosas; ionona beta, um floral violeta com característica amadeirada marcante; o floralozone, uma nota aquática com aromas de ar fresco reminescente

de brisas oceânicas; O óleo de limão, com aroma cítrico e refrescante característico; a essência de maracujá, com odor frutal adocicado e bergamota, com uma refrescante característica frutal adocicada (BRECHBILL, 2007).

7.1.2. Caracterização da Fragrância por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM).

Os perfumes são misturas complexas de matérias primas aromáticas de origem natural e sintética, requerendo para sua análise técnicas analíticas avançadas. Embora tais técnicas demandem de alguma forma uma correlação com dados olfatórios (o que reforça a importância da caracterização sensorial), elas fornecem dados mais precisos e reprodutíveis. A propriedade volátil e apolar dos constituintes do perfume faz com que a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) seja a mais importante técnica analítica usada na indústria de perfumaria (ASTEN, 2002; NEUNER-JEHLE; ETZWEILER, 1994).

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação de misturas que se baseia na diferença de energia requerida para que cada componente da mistura passe da superfície de uma fase líquida para uma fase de vapor. A amostra a ser analisada é vaporizada e injetada no fluxo de um gás carreador inerte (fase móvel). O gás se move através de uma coluna aquecida, onde passa sobre a superfície de uma fase estacionária, que consiste de um líquido adsorvido em carreador inerte. Os componentes são separados a medida que eles passam através da coluna apresentando diferentes velocidades de adsorção e desorção da superfície da fase estacionária. Os componentes são detectados à medida que deixam a coluna e são registrados como uma série de picos em um gráfico, o cromatograma (CALKIN; JELLINEK, 1994). A detecção por espectrometria de massas é frequentemente empregada na análise de perfumes quando detecção em nível de traços é requerida (ASTEN, 2002).

Foram identificados na fragrância desenvolvida 13 áreas de picos com tempos de retenção entre 6,750 e 40,116min. Foram identificados picos referentes a todas as matérias primas utilizadas na composição aromática. As substâncias, β -pineno, limoneno, p-cimeno são oriundas do óleo essencial de *C. limon*, resultado corroborado por Espina et al., (2012), que também descreve a presença de tais substâncias no óleo. O limoneno, linalol e o acetato de linalila foram descritos no óleo de *Citrus bergamia* (BAGETTA et al., 2010), sendo também encontrados no Base sintética de bergamota utilizada no desenvolvimento. A bergamota base pode ter contribuído de maneira discreta também para o quantitativo total de

salicilato de amila.

A partir da análise das matérias primas, observou-se que o geraniol é uma mistura dos isômeros trans-geraniol e cis geraniol, este último também conhecido também como nerol. De acordo com Chen e Viljoen (2010), a matéria prima é comumente comercializada na forma de mistura deste isômeros. O nerol também está presente também na essência sintética de Maracujá, que também contribui com o quantitativo total de limoneno e acetato de linalila, além de ser responsável pela presença de dihidro-micenol na fragrância composta

A volatilidade, juntamente ao peso molecular, é o determinante mais importante na retenção de uma substância em uma corrida por cromatografia gasosa. (VENKATRAMAN I et al., 1996). Tal propriedade é de extrema relevância em perfumaria, permitindo classificar as substâncias de uma fragrância em três grupos: as notas de cabeça ou topo (substâncias de alta volatilidade, responsáveis pela primeira impressão da fragrância); notas de corpo (substâncias de média volatilidade, que caracterizam o perfume) e as notas de fundo ou base (substâncias de baixa volatilidade que são sentidas após dissipação das notas de cabeça e corpo (MATA et al., 2005). A análise dos tempos de retenção das substâncias identificadas permite sugerir a classificação das substâncias presentes no óleo de *C. limon* e a Bergamota base como notas de cabeça. Geraniol, salicilato de amila, floralozone e ionona beta enquadram-se dentro da classificação de nota de corpo. O acorde de base é composto por Cedramber e pelo galaxolide. A figura 39 apresenta a pirâmide olfativa sugerida para esta fragrância. A confirmação da pirâmide olfativa deve ser mediante análise sensorial por um avaliador experiente.

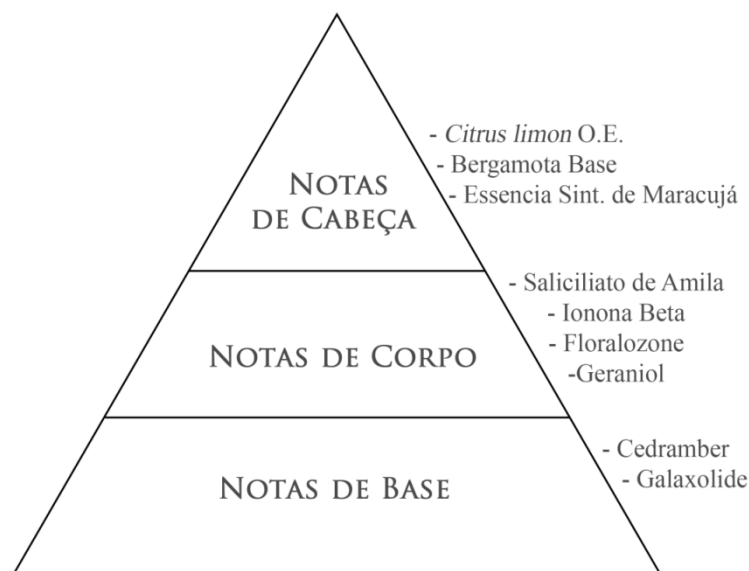


Figura 39. Pirâmide olfativa de acordo com o perfil cromatográfico da fragrância T64.

A amostragem de fragrâncias por *headspace* para análise em CG-EM é uma das formas mais diretas de acesso à captura e medida do odor. A extração de componentes voláteis por essa técnica associada à injeção direta no cromatógrafo mostra-se vantajosa pois permite uma análise mais acurada da composição da fragrância (SHIMODA; SHIBAMOTO, 1990). A amostragem do *headspace* pode ser feita de maneira estática, onde a amostra é armazenada selada em um frasco hermético e os analitos voláteis são coletados no frasco após equilíbrio de volatilização, ou dinâmico, onde um fluxo de gás inerte é borbulhado na amostra e os voláteis são transferidos para um *trap* de coleta onde posteriormente são dessorvidos e transferidos pro cromatógrafo (FREIRE et al., 2008). A análise de uma fragrância por *headspace* deve se basear numa amostragem estática (utilizada neste trabalho), uma vez que pelo fato da amostragem dinâmica ser em sistema aberto gera muitos parâmetros experimentais descontrolados como a turbulência do ar (NEUNER-JEHLE; ETZWEILER, 1994).

A amostragem de *headspace* estático é mais simples e não requer instrumentação sofisticada. Contudo apresenta algumas limitações como a detectabilidade limitada para substâncias de baixa volatilidade para componentes voláteis de baixas concentrações, sendo impactada pelo solvente onde estão dissolvidos os voláteis (FREIRE et al., 2008). Desta forma, a análise da fragrância por *headspace* foi feita com a mesma veiculada em álcool etílico e no sistema microemulsionado desenvolvido. Para ambos os veículos, o limoneno, um monoterpene monocíclico de aroma fresco e cítrico (ESPINA et al., 2011) foi a substância mais presentes na fração volátil da fragrância, com área relativa superior 50%. Na fragrância veiculada em etanol, observa-se ainda picos referentes ao β -pineno, tendo as outras substâncias da fragrância apresentado baixo sinal analítico. A fragrância veiculada em microemulsão apresentou picos de maior intensidade para as outras substâncias de menor volatilidade presentes na fragrância, sugerindo volatilização superior destas substâncias quando veiculadas na microemulsão em comparação ao álcool etílico.

7.2. Obtenção do óleo fixo da semente de *Spondias tuberosa* Arr. Cam.

Óleos fixos são obtidos de plantas diferindo das gorduras apenas pela característica de apresentar-se em estado líquido em temperatura ambiente. Tais óleos tem como função o armazenamento de nutrientes e são compostos predominantemente de triacilgliceróis. Os principais ácidos graxos podem ser saturados (ácido láurico, mirístico, palmítico e esteárico)

ou insaturados (ácido oleico, linoleico e linolênico) e juntos, perfazem quase toda a quantidade de óleos fixos existentes no comércio (SALGADO et al., 2003).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a extração de óleos fixos, como a extração utilizando Soxhlet, prensagem ou extração em CO₂ supercrítico. Foi utilizado neste trabalho o método de Soxhlet para a obtenção do óleo fixo de *Spondias tuberosa*. Este método de extração apresenta algumas vantagens como a amostra estar sempre em contato com solvente renovado, metodologia simples e a extração de quantidades superiores de óleo sem a necessidade de filtração das amostras (BRUM et al., 2009).

Borges et al. (2007) extraíram óleo fixo de umbu e obtiveram um rendimento de 55% de óleo fixo a partir das sementes. Valor bastante superior ao obtido neste trabalho (2,12%). A diferença brusca no rendimento pode estar no preparo das amostras para a extração do óleo. Enquanto Borges et al. (2007) removeram o endocarpo rígido da semente, a extração do óleo neste trabalho foi feita sem a remoção completa do endocarpo, o que pode ter impactado na eficiência de extração.

A extração do óleo de *Spondias tuberosa* teve como objetivo a utilização deste óleo como possível componente de fase oleosa para as microemulsões de uso em perfumaria. Diversos trabalhos tem evidenciado essa tendência de uso de óleos vegetais como constituintes de fase oleosa de sistemas nanométricos emulsionados. Camargo (2008) obteve sistema nanoemulsões a partir do óleo fixo da semente de *Passiflora edulis*. Páscoa (2012) obteve microemulsão a partir do óleo fixo de *Pterodon emarginatus*, uma espécie arborea nativa do cerrado brasileiro.

7.3. Desenvolvimento e seleção de microemulsões.

7.3.1. Construção de diagramas de fases pseudo-ternário.

A formação de emulsões e microemulsões são regidas pela teoria de formação de filmes interfaciais. De acordo com tal teoria, quando a pressão bidimensional (pressão lateral feita pelas moléculas de tensoativos ao se comprimirem em uma estrutura micelar) promovida pelos tensoativos é inferior à tensão interfacial existente entre óleo em água, é favorecida a formação de emulsões com alto tamanho de partículas. Contudo, a adição de um co-tensoativo pode reduzir muito o valor da tensão interfacial óleo em água podendo tornar a pressão bidimensional superior à tensão interfacial em níveis capazes de promover a formação das microemulsões (AKHTAR, 1996). Em virtude deste fato, para a obtenção de microemulsões,

foram utilizados *blends* de tensoativos e co-tensoativos. A estratégia de desenvolvimento de microemulsões se deu através de diagramas pseudo-ternários.

Os diagramas pseudo-ternários de desenvolvimento de microemulsões constituem-se na mais usual abordagem para a obtenção deste tipo de sistema. Tais diagramas são representações gráficas triangulares e planas onde estão representadas em cada vértice as concentrações de fase aquosa, fase oleosa e da mistura de tensoativos/co-tensoativos. Os diagramas pseudo-ternário divergem da abordagem da composição de diagramas ternários “reais” pela adição do co-tensoativo e dos diagramas quaternários pela presença do co-tensoativo conjuntamente com o tensoativos ao invés de isolado, sendo mais conveniente para a composição de microemulsões cosméticas (OLIVEIRA et al., 2004, BOONME, 2007, ROSSI et al., 2007).

A composição dos 4 diagramas divergiram entre os constituintes de fase oleosa. O primeiro baseou-se no óleo de *Spondias tuberosa* obtido. Este trabalho representa o primeiro relato de tentativa de obtenção de microemulsões na literatura utilizando-se de óleo obtido deste gênero botânico. O diagrama 2 utilizou como fase oleosa o ciclometicone. O ciclometicone é extensivamente usado na formulação de cosméticos e produtos de cuidados pessoais, como solvente carreador e emoliente, destacando-se pelas suas propriedades físico-químicas como alta pressão de vapor, baixa tensão superficial e alta compatibilidade com diversos componentes de formulação (DUDZINA et al., 2014). O Miristato de isopropila é uma mistura composta principalmente de éster de isopropila e ácido mírístico usadas em preparações cosméticas por suas propriedades dispersantes e emolientes (FITZGERALD et al., 1968). O uso desta matéria prima na produção de microemulsões é bastante comum sendo relatada na literatura a obtenção destes sistemas para diversas finalidades (PODLOGAR et al., 2005; TOMSIC et al., 2006; CHANGEZ et al., 2006).

Os três primeiros diagramas construídos produziram 3 sistemas distintos: Sistemas bifásicos, emulsões e microemulsões, ao passo que o último constituiu apenas emulsões e microemulsões. Contudo em todos eles, as regiões diferiram em seus perfis, conforme mencionado nos resultados. As regiões de separação de fase dos quatro são caracterizadas primariamente por baixas concentrações de tensoativos e desequilíbrio das concentrações entre água e óleo.

Nas composições características das regiões onde foram obtidas separações de fases, observa-se uma quantidade de tensoativos, possivelmente, inferior à concentração micelar crítica. Conforme mencionado no item 2.3.1 da revisão bibliográfica, em concentrações acima deste valor, o tensoativo deixa de se posicionar entre as interfaces do líquido ao qual está

solubilizado se organizando em agregados coloidais conhecidos como micelas (HEM, et al., 2001). Em concentrações inferiores à concentração micelar crítica, as moléculas de tensoativo permanecem presas às interfaces, pois a alta estabilidade na região, associada à energia necessária para superar a instabilidade gerada pela porção pouco solúvel da molécula, compromete a micelização e conseqüentemente a emulsificação dos componentes aquosos e oleosos do sistema (DALTIM, 2011).

Nas regiões onde se observaram a formação de sistemas emulsionados anisotrópicos, observaram-se diferentes perfis de composições. O Diagrama 1 apresentou regiões de emulsões em ampla maioria com concentrações superiores de tensoativos àquelas observadas para a região de obtenção de sistemas bifásicos. A região E_2 pode ser possivelmente justificada devido à baixa quantidade de água em proporcionalidade à fase oleosa, o que pode ter estabilizado a fase aquosa em gotículas descontínuas. Rieger (2001) explicita que fatores como razão de volume entre as fases também pode ser fator impactante na definição da fase contínua e descontínua de uma emulsão.

Para os diagramas 2 e 3 observa-se uma consonância do EHL elevado dos tensoativos com as composições das emulsões observadas. O alto valor de EHL favorece emulsões em altas concentrações de tensoativos e maior proporcionalidade de água. Características observadas na maioria das emulsões anisotrópicas existentes nestes dois diagramas. O Diagrama 4 apresenta característica distinta dos outros por apresentar emulsões, inclusive em regiões de baixas concentrações de água e tensoativos. Pode-se justificar tal fenômeno pela complexidade da fase oleosa representada em uma fragrância. As estruturas moleculares dos constituintes da fragrância contém átomos eletronegativos e grupamentos capazes de realizar ligações de hidrogênio. Tais características das moléculas conferem menor lipofilicidade da fragrância em relação a substâncias oleosas utilizadas nos outros diagramas, diminuindo a tensão superficial e conseqüentemente a concentração micelar crítica.

Todos os quatro diagramas apresentaram regiões de microemulsões em condições com maiores concentrações de água e tensoativos em comparação com a fase oleosa. Possivelmente, o fato dos *blends* de tensoativos possuírem valores mais elevados de EHL favorece melhor estabilização de gotículas com baixa tensão superficial, características de sistemas nanométricos emulsionados, quando a fase contínua é aquosa. Contudo, foi observado no diagrama 3 também a existência de microemulsões com altas concentrações de óleo e baixas concentrações de água. A presença de um tensoativo de baixo EHL como o *Span-85* pode ter auxiliado na estabilização de gotículas de água em uma fase contínua oleosa.

As microemulsões obtidas no diagrama 1 se caracterizaram por possuir viscosidade aparente mais elevadas, inadequadas para a utilização como veículos para fragrâncias. A região de microemulsões do diagrama 2 foi a menor dentre todos os diagramas construídos. Tal fato pode ser justificado pela dificuldade de obtenção de microemulsões a partir do ciclometicone. Gallarate et al. (2000) não conseguiram obter microemulsões com o ciclometicone para veiculação dos componentes aromáticos linalol, citral e limoneno. As microemulsões obtidas neste diagrama apresentaram boa transparência, contudo, também exibiram viscosidade mais elevadas. As microemulsões do diagrama 3 apresentaram aspecto de “gel” nas regiões com altas proporções de água e tensoativos. Nas regiões com altas concentrações de óleo, observou-se microemulsões com aspectos sensoriais untuosos, no entanto, ambas com perfis também inadequados para a fragrância.

Diagramas com maior área de microemulsões sugerem melhor eficiência de uma combinação de fase aquosa/tensoativos/fase oleosa na obtenção deste tipo de sistema disperso. O Diagrama 4, produziu região mais ampla de microemulsões dentre os quatro diagrama construídos. O aumento da região de microemulsão também pode estar associado a uma possível diminuição da tensão interfacial ocasionada pelos grupamentos polares dos constituintes da fragrância, aliado à quantidade elevada de tensoativos e co-tensoativos. Além da maior amplitude da região de microemulsão, o perfil das microemulsões obtidas se caracterizou por uma viscosidade aparente inferior, sobretudo nas regiões com maior quantidade de fase aquosa. Diante do exposto, o Diagrama 4 foi escolhido para a reprodução e avaliação de alguns sistemas microemulsionados para a composição do veículo livre de álcool para fragrâncias.

7.3.2. Seleção de microemulsões.

Definido o diagrama 4 como o mais adequado para a seleção das microemulsões, as mesmas foram reproduzidas e selecionadas de acordo com as melhores características de tamanho de partícula, índice de polidispersividade (PDI), aspecto sensorial de baixa untuosidade e baixa viscosidade aparente.

O tamanho de partícula de uma microemulsão é delimitado por Ansel et al. (1999) como inferior a 0,1 μ m (100nm). A distribuição do tamanho de partículas influencia a viscosidade, a estabilidade de uma emulsão e aspecto óptico. Importantes características para o seu processamento e funcionalidade (HOLLINGSWORT; JOHNS, 2003; JURADO et al., 2007).

O Tamanho de partículas de um sistema emulsionado está correlacionado com a sua estabilidade. Tolman (1949) demonstrou que a diminuição do tamanho de partícula, especialmente para gotículas muito pequenas, é acompanhada de diminuição da tensão superficial, conseqüentemente promovendo decréscimo da energia livre do sistema e aumentando a sua estabilidade.

O aspecto óptico de um sistema emulsionado também sofre influência do tamanho de partículas. A escala granulométrica de Ansel et al. (1999) (figura 40) define macroemulsões, com tamanho entre 200 e 2000nm apresentam aspecto visual branco leitoso. Em contrapartida, microemulsões com tamanho entre 0,1nm e 100 nm tem aspecto óptico translúcido. A influência do tamanho de partícula na reologia de uma emulsão ainda não é bem compreendida, contudo, Pal (1996) identificou maiores valores de viscosidade em emulsões O/A e A/O de tamanhos de partículas elevadas. Diante do exposto, fundamentando-se nas características desejadas para um veículo de perfumaria, demonstra-se a necessidade de seleção de sistemas microemulsionados com tamanhos reduzidos de partículas.






	Aparência	Denominação	Aspecto
2 - 20 μ m		Macroemulsão	Branca leitosa
0,1 - 0,3 μ m		Nanocemulsão	Branca azulada
< 0,1 μ m		Microemulsão	Translúcida
0,01 μ m		Soluções micelares	Transparentes
0,001 μ m		Soluções moleculares	Transparentes

Figura 40 . Escala granulométrica das emulsões (ANSEL et al., 1999).

Quando existe homogeneidade de tamanho de gotículas de uma determinada emulsão, diz-se que ela é monodispersa, podendo o tamanho da gotícula ser utilizada para a caracterização da mesma. Contudo, na observação prática, as emulsões e microemulsões contém uma variedade de tamanhos, sendo referidas como polidispersas, dessa forma, sua caracterização é feita pela distribuição do tamanho das partículas (ALMEIDA, 2012). A uniformidade das gotículas dentro de uma formulação é determinada pelo índice de polidispersividade (PDI), de modo que quanto maior o valor do índice, menor a uniformidade de partículas (JADHAV et al., 2010). O índice de polidispersividade ideal é cerca de 0,3 ou

menor (RODRIGUES, 2012). A fim de obter microemulsões de estabilidade superior, definiu-se, neste trabalho, para a seleção de microemulsões, apenas sistemas com índice de polidispersividade inferior a 0,2.

O conhecimento da distribuição do tamanho de partículas e do índice de polidispersividade é importante do ponto de vista prático por permitir ter a capacidade de prever possíveis processos de instabilidade, como o amadurecimento de Ostwald. Diferenças nas composições das gotículas, bem como diferença em suas curvaturas favorecem a transferência de massas nas emulsões. No amadurecimento, as gotículas menores possuem solubilidade maior que as maiores, tendendo a se depositarem nas mesmas, promovendo seu crescimento e conseqüentemente, diminuição da estabilidade termodinâmica do sistema. Tal qual o processo de coalescência, o envelhecimento de Ostwald tem por consequência a minimização da área interfacial entre a fase dispersa e o meio de dispersão (CAPEK, 2004; ALMEIDA, 2012). A instabilidade da maturação de ostwald é propiciada primariamente pela polidispersividade das gotículas de uma emulsão (FONTANA, 2010). Motivo pelo qual é desejado para uma boa microemulsão, um baixo índice de polidispersividade.

O aspecto sensorial de produtos cosméticos mostra-se como um dos mais importantes fatores para o desenvolvimento destes tipos de produtos. Embora outros aspectos como propaganda e embalagem possam vir a atrair o consumidor, a fidelização aparenta estar mais associada ao sensorial (WAGEMAKER et al., 2013). A untuosidade é frequentemente taxada pelos consumidores como um atributo negativo para um produto cosmético (NACHT et al., 1981). As inovações tecnológicas já permitem atualmente a elaboração de fórmulas consideradas leves e de “toque seco” (COSTA, 2004). Por esse motivo, buscou-se um sensorial de baixa untuosidade para a referida microemulsão, aproximando-se ao máximo possível das características encontradas em veículos alcoólicos para perfumaria.

A viscosidade de um produto é também um importante parâmetro a ser considerado. Broniarz-Press et al. (2014) avaliaram que aumento na viscosidade de um líquido está associada ao aumento no tamanho e na distribuição de partículas de um atomizador. Tal aumento pode influenciar na secagem de fragrâncias, bem como também na escolha da válvula da embalagem.

Com base nesses aspectos, a microemulsão 4 foi selecionada, dentre as avaliadas, o sistema com melhores características dentro dos requisitos aqui fundamentados. Sendo eleita para seguimento do desenvolvimento nas etapas de caracterização e avaliação de estabilidade e segurança.

7.4. Caracterização físico-química da microemulsão desenvolvida.

Mediante a seleção da microemulsão 4 como veículo para a fragrância desenvolvida, o produto foi caracterizado em acordo com as metodologias descritas no item 5.4.

A isotropia é condição *sine qua non* para a caracterização de uma microemulsão. A isotropia compreende a homogeneidade óptica de um material. Ou seja, quando um feixe de luz incide sobre uma partícula, a luz é propagada em todas as direções na mesma velocidade tendo o mesmo índice de refração. Difere-se de um sistema anisotrópico, que possui múltipla refração após incidência da luz sobre o material. A isotropia ocorre quando as partículas tem caráter simétrico (NARDY; MACHADO, 2002), como as gotículas esféricas de uma microemulsão. A microscopia de luz polarizada permite a definição da característica isotrópica de um sistema determinado.

A microscopia de luz polarizada é feita utilizando-se um microscópio ordinário ao qual são introduzidos dois polarizadores entre o material a ser examinado. O polarizador inferior é responsável por fornecer a luz polarizada, ao passo que o polarizador superior é denominado analisador. Ambos os polarizadores estão dispostos perpendicularmente. Quando a luz polarizada incide sobre uma amostra anisotrópica, o raio de luz polarizado é desmembrado em dois raios que ao atingirem o analisador, geram interferências entre elas que resultam em um feixe de luz paralelo ao analisador e são observadas nas objetivas (NARDY; MACHADO, 2002). Amostras isotrópicas não promovem o efeito de birrefringência e conseqüentemente não são observadas nas objetivas. A observação de campo escuro na análise por microscopia polarizada da microemulsão desenvolvida evidencia o caráter isotrópico da mesma.

O potencial hidrogeniônico (pH) de uma formulação representa convencionalmente a acidez ou alcalinidade de uma solução. A escala de pH vai de 1,0 (ácido) a 14,0 (alcalino) sendo o valor 7,0 considerado pH neutro (BRASIL, 2000). A pele humana apresenta um valor levemente ácido (4,6 – 5,8) que contribui para a proteção da microflora da pele. A manutenção de pH de veículos próximo ao pH da pele diminui o risco de irritação cutânea (LEONARDI, 2002; GONÇALVES, 2014). Alterações no pH podem levar à hidrólise de ingredientes aromáticos como cetonas e ésteres. Assim, é adequado para produtos de perfumaria, valores de pH longe de extremos de acidez e alcalinidade (CALKIN; JELLINEK, 1994). Diante disto, observa-se que o produto apresentou pH adequado sob tal perspectiva, com um pH próximo da neutralidade, o que assegura maior estabilidade da fragrância, ao

mesmo tempo que não apresenta grandes discrepâncias do pH da pele, o que poderia ser lesiva à mesma.

Conforme mencionado no item 2.3.1, a orientação de um sistema disperso microemulsionado pode ser classificado em água em óleo (A/O); Óleo em Água (O/A) e bicontínua. Na microemulsão A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente lipofílico. Nas microemulsões O/A, ocorre a situação inversa das A/O. As microemulsões bicontínua possuem microestrutura na qual as fases aquosa e oleosa estão na fase contínua (FORMARIZ et al., 2005; MO et al., 2000). A determinação de condutividade é um excelente método para se determinar o tipo de emulsão a se analisar, uma vez que a condutividade é dependente da natureza da fase externa da formulação, visto que a fase contínua aquosa é melhor condutora que a fase oleosa.

O valor de condutividade obtido para a microemulsão 4 indica a presença de água na fase contínua da formulação ($90,4 \pm 0,70$). Observando a evolução da condutividade na titulação de água até a concentração final da microemulsão, observa-se um perfil que inicialmente tem baixa condutividade, seguido de um aumento brusco na condutividade do sistema ao atingir concentrações de fase aquosa superior a 12,0%. A partir de 40% de água ocorre uma redução discreta da condutividade com as adições subsequentes de água. A viscosidade de um sistema está correlacionada com o volume de fase interna e impacta diretamente na sua condutividade, conforme demonstrado pela Equação IV, onde pode se ver que a condutividade de um sistema é inversamente proporcional à viscosidade (RIEGER, 2001; MENDONÇA, 2005). A baixa viscosidade do sistema corrobora os resultados obtidos na curva de condutividade.

$$\kappa = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon k T}{2\pi\eta} \frac{\varphi}{r^3} \quad (\text{Equação IV})$$

Onde:

- κ = Condutividade;
- ε_0 = Constante dielétrica no vácuo;
- ε = Constante dielétrica do solvente;
- k = Constante de Boltzmann;
- η = Viscosidade do Solvente;
- T = Temperatura;
- φ = Fração Volumétrica das Gotículas;
- r = Raio das Gotículas.

A aplicação de uma força de tensão e análise da sua deformação, subsequente é objeto de estudo da reologia. Uma das formas de se avaliar o comportamento reológico de um sistema consiste na realização de ensaios de medida de tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, reportados como curvas de fluxo. Quando se aplica a tensão sobre um fluido, o mesmo pode exibir um comportamento Newtoniano, onde se verifica uma proporcionalidade entre a taxa de cisalhamento e a tensão de cisalhamento mantendo constante a sua viscosidade, ou um perfil não-newtoniano alterando de maneira não-linear a tensão de cisalhamento com alterações na taxa de cisalhamento (WOOD, 2001; FERREIRA et al., 2005). Analisando o perfil reológico da microemulsão, observa-se a linearidade da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento, indicando que se trata de um fluido newtoniano.

Viscosidades superiores à 15cp não são indicadas para sistemas aquosos utilizados em fragrância, pois impede a utilização de válvulas usadas para fragrâncias finas veiculadas em álcool (DIXIT, 2003). A viscosidade, dentre outros métodos, é determinada por meio de viscosímetro rotacional. Este equipamento consiste de um cilindro fixo e um cilindro rotacional organizados de maneira concêntrica. Aplicando-se uma taxa de cisalhamento, obtém-se a tensão de cisalhamento, que está relacionada ao torque. Com base no conhecimento do torque e dos raios do cilindro fixo e cilindro rotacional e da altura do pêndulo do cilindro rotacional, é possível determinar a viscosidade (WOOD, 2001; FERREIRA et al., 2005). Observa-se diante do exposto a conformidade do valor de viscosidade obtido para a microemulsão com o indicado para produtos de perfumaria.

A densidade é um dos ensaios sugeridos para controle de qualidade de produtos de perfumaria como águas de colônias, águas perfumadas, perfume e extratos aromáticos. Assim sendo, faz-se necessário gerar especificação para este parâmetro. A densidade é definida como a relação entre a massa e o volume, podendo ser estimada através da densidade relativa que é a relação entre a densidade absoluta de uma substância e a densidade absoluta de uma substância padrão, como a água (BRASIL, 2000). A microemulsão obtida apresenta valor de $1,0269\text{g/ml} \pm 0,0003$, valor próximo à densidade da água na temperatura de 20°C.

O índice de refração é definido como a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz em determinada substância ou sistema. Em substâncias e sistemas isotrópicos, o índice de refração é característica constante em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão, sendo útil na identificação de impurezas desses sistemas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A caracterização do índice de refração se faz

necessária frente a necessidade de diminuição de oscilações na luz refratada durante a determinação de partículas por meio de espalhamento dinâmico de luz.

A importância do tamanho de partícula e da polidispersividade para a estabilidade e características de sistemas microemulsionados foi discutida no item 7.3.2. A técnica mais comum de determinação da distribuição de tamanho de partículas consiste na análise de espalhamento dinâmico de luz devido às suas vantagens, tais como não exigir preparo de amostras (exceto diluição); fácil manuseio instrumental; resultados imediatos e baixo custo (ALEXANDER; DALGLEISH, 2006).

Como sugerido pelo seu nome, a determinação do tamanho de partículas é baseada na análise do espalhamento da luz de partículas em movimento. Em um experimento típico, um laser de luz monocromática e polarizada é passada através de uma dispersão coloidal que apresenta movimento Browniano (nome dado ao movimento errático de uma partícula em suspensão cuja intensidade depende da viscosidade, tamanho de partículas e temperatura). Os fótons que colidem com as partículas em movimentos são espalhados com uma distribuição angular que é mensurada por um detector. A intensidade de luz que chega ao detector a qualquer instante depende do padrão de interferência criada pela luz dispersa ao colidir com a partícula. À medida que as partículas se movem, o padrão de interferência irá flutuar alterando também a intensidade da luz detectada. Partículas pequenas se movem mais rapidamente gerando padrões de flutuações rápidas, enquanto partículas maiores gerarão oscilações mais lentas. O uso de autocorrelação pelo software para analisar estas flutuações de intensidade fornece informação sobre o tamanho e a distribuição das partículas dispersas (ALEXANDER; DALGLEISH, 2006; SILVA; LIMA, 2007). Com base nesta técnica, foi capaz confirmar o caráter nanométrico da microemulsão desenvolvida, apresentando tamanho médio de gotículas de $11,68 \pm 0,061\text{nm}$, inferior ao tamanho delimitado para essa classificação (100nm) (ANSEL, 1999).

As gotículas de emulsões podem ter cargas elétricas devido à adsorção, na sua superfície, de moléculas que são ionizadas ou ionizáveis, por exemplo, proteínas, alguns polissacarídeos, surfactantes iônicos, fosfolipídicos e alguns íons pequenos. As propriedades elétricas de uma partícula são geralmente caracterizadas em termo de seu potencial elétrico de superfície, a densidade de carga superficial e/ou pelo potencial zeta, sendo este último o mais usado (ALMEIDA, 2012).

O Potencial zeta (ζ) é o potencial elétrico existente no “plano de cisalhamento”, que é definido como plano que separa as moléculas carregadas que se movem com a partícula (ou seja, na superfície ou em seu interior) daquelas que não se movem com a partícula (ou seja,

existente no meio contínuo de dispersão). O potencial zeta é muitas vezes, a melhor representação das características elétricas de uma partícula de uma emulsão porque ele leva em conta a adsorção de quaisquer contra-íons carregados, além de sua determinação mais fácil que a de outros parâmetros de propriedade elétrica. O potencial zeta é proporcional de dupla camada, que não pode ser medido diretamente e está relacionado a estabilidade de partículas, devido à criação de um efeito repulsivo entre as partículas evitando o processos de floculação e posterior coalescência (RIEGER, 2001; ALMEIDA, 2012).

O método utilizado para determinar o potencial zeta da microemulsão desenvolvida tem como princípio a eletroforese e o espalhamento de luz eletroforético. Ao aplicarmos um campo elétrico em um líquido, as partículas se moverão na direção do polo positivo ou negativo, a depender de sua carga. A aplicação pulsada neste líquido farão as mesmas alternar seus movimentos de um polo para o outro. Incidindo-se um feixe de luz laser com frequência determinada, teremos espalhamento da luz (Efeito Doppler), cuja frequência será proporcional à velocidade da partícula, que por sua vez é proporcional à sua carga (PEREIRA, 2003). O resultado obtido na análise de potencial zeta apresentou valor negativo distante de zero, o que favorece a estabilidade do produto.

7.5. Avaliação da estabilidade da microemulsão desenvolvida

Os estudos de estabilidade para produtos cosméticos são de extrema importância por fornecer informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas várias condições a que possam estar sujeitos desde sua fabricação até o término de sua validade, contribuindo para orientar o desenvolvimento da formulação e do material de desenvolvimento adequado; subsidiar o aperfeiçoamento das formulações; estimar prazo de validade e auxiliar o monitoramento da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica. Os resultados obtidos em estudos de estabilidade, como todo procedimento preditivo devem ser posteriormente corroborados por estudos de tempo de prateleira de longa duração (BRASIL, 2004).

No processo de avaliação de estabilidade de fragrâncias, deve-se ter conhecimento das propriedades físico-químicas dos ingredientes da fragrância e de outros componentes utilizados na formulação (conservantes e veículos). Além disso, deve ser considerada a característica do odor, que se torna um dos principais parâmetros a ser avaliados. As alterações na percepção dos odores em fragrância decorrem de interações químicas entre as matérias primas odoríferas e outros produtos da base, fatores físicos também podem impactar

em mudanças em diferentes aspectos da fragrância (CALKIN; JELLINEK, 1994; PEREIRA, 2008).

Os fatores que influenciam na estabilidade de produtos aromáticos podem ser classificados como extrínsecos ou intrínsecos. O primeiro refere-se a componentes externos à formulação como tempo, temperatura, luz, umidade, oxigênio e vibração. Os segundos são relacionados à própria natureza das formulações, como interações entre os componentes da fórmula e até com o material de acondicionamento (PEREIRA, 2008).

Quanto à estabilidade de emulsões e microemulsões, a mesma é alcançada através da otimização de misturas de tensoativos hidrofílicos e lipofílicos. Por outro lado, a instabilidade das mesmas podem se manifestar através dos fenômenos de floculação, cremagem, coalescência e do amadurecimento de Ostwald (*Ostwald ripening*) (FRANGE; GARCIA, 2009).

A floculação é o processo onde duas ou mais gotas se aproximam para a formação de um agregado devido à superioridade das forças atrativas de Wan der waals sob as forças de repulsão do sistema. A floculação antecede a ruptura do sistema e posterior coalescência sendo um processo reversível. A cremagem ocorre quando as gotículas de uma emulsão tendem a sobrenadar ou sedimentar, dependendo das diferenças de densidades específicas entre as fases dispersa e dispersante. A cremagem é regulada pela lei de Stokes e envolve o movimento de um número de gotículas com uma dispersão alargada que interfere no movimento de outras gotículas, promovendo a deformação das mesmas. Se o processo de cremagem ocorre sem que haja qualquer agregação, a emulsão pode ser reconstituída por agitação ou mistura (RIEGER, 2001; ALMEIDA, 2012).

A coalescência é um processo de crescimento de partículas durante as quais se juntam para formar partículas maiores. Qualquer evidência para a formação de partículas maiores sugere eventual separação de fases de uma emulsão. O amadurecimento de Ostwald já foi explicado em maiores detalhes no item 7.3.2 e decorre do fato de que no início de uma dispersão, a mistura das fases não está em equilíbrio inicialmente e de que a energia total do sistema pode ser diminuída pelo aumento no tamanho das partículas e diminuição da área interfacial total (VOORHES, 1985; RIEGER, 2001). Baseado em todos estes aspectos fez-se necessário avaliar a estabilidade da microemulsão desenvolvida através da exposição do produto à alterações das condições, ambientais, cronológicas e mecânicas.

7.5.1. Teste de Estabilidade Preliminar

Os estudos de estabilidade preliminar tem importante função na triagem de formulações no processo de desenvolvimento do produto, através da utilização de condições extremas, não sendo útil, contudo, na determinação da vida útil do mesmo (BRASIL, 2004).

7.5.1.1. Centrifugação

A centrifugação, se usada cuidadosamente, constitui uma ferramenta bastante útil na previsão da estabilidade de emulsões. A equação de Stokes mostra que a cremagem ocorrem em função da gravidade e que um aumento desta força acelera a separação. A centrifugação de uma emulsão em 3750 rpm, numa centrífuga de 10cm de raio por 5 horas é equivalente ao efeito da gravidade de um ano (RIEGER, 2001).

O teste de centrifugação produz estresse na amostra simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades (BRASIL, 2004). Após aplicação da centrifugação da microemulsão, observou-se comportamento estável, mantendo-se a homogeneidade, limpidez e ausência de sedimentos. Tal resultado é indicativo favorável para a característica de estabilidade do produto desenvolvido.

7.5.1.2. Estresse térmico.

O estresse térmico consiste em um teste onde a amostra é submetida intencionalmente à mudanças significativas de temperatura, podendo sofrer alterações. O emprego de condições extremas de temperatura tem o objetivo de acelerar possíveis reações entre os seus componentes, que devem ser observados e analisados conforme as características de cada formulação (BRASIL, 2004; PEREIRA, 2008). Alterações da temperatura podem impactar em diversas propriedades das emulsões como a viscosidade, partição dos tensoativos, inversão da emulsão na temperatura de inversão de fases e cristalização de certos lipídios (RIEGER, 2001). O tempo de prateleira de uma fragrância também pode ser diminuído devido à deterioração do odor e descoloração acelerada em altas temperaturas (CALKIN; JELLINEK, 1994).

Observa-se, a partir dos resultados, que a microemulsão apresentou estabilidade em todos os ciclos de estresse térmico ao qual fora submetido para a maioria dos parâmetros avaliados. O pH da microemulsão manteve-se inalterado em toda a análise, assim como o tamanho de gotículas que se manteve dentro da escala nanométrica definida para a caracterização de microemulsões. O índice de polidispersividade e a condutividade

apresentaram pequenas oscilações de baixa representatividade para a estabilidade e performance do produto desenvolvido.

O potencial zeta, dentre os avaliados, foi o que mais apresentou maiores alterações apresentando uma variação não-linear em função da temperatura. A mobilidade eletroforética apresentou comportamento parecido, justificado pelo fato dois fatores estarem relacionados à presença de cargas nas superfícies das gotículas. Contudo, observou-se na análise de estresse térmico um afastamento do valor zero (ponto isoelétrico) para valores de potencial zeta mais negativos, o que conforme explicado no item 7.4 aumenta a repulsão entre as gotículas e aumenta a estabilidade do sistema.

O aspecto macroscópico da microemulsão apresentou alterações visuais a partir da temperatura de 70°C. Contudo, tal temperatura não deve ser praticada em produtos de perfumaria devido à características termolábeis dos compostos, não desabonando a qualidade do produto desenvolvido.

7.5.2. Avaliação do potencial zeta em função do pH.

A avaliação do potencial zeta em função da variação de pH tem como objetivo determinar o ponto isoelétrico da microemulsão desenvolvida. O ponto isoelétrico é definido como o pH no qual a partícula em suspensão tem carga eletrostática igual a zero (DINGER, 2006).

Como comentado no item 7.4, as propriedades elétricas de uma emulsão são rotineiramente quantificadas através do potencial zeta, que constitui a diferença das cargas elétricas existentes no plano que separa as cargas livres na fase contínua e as cargas existentes na superfície das gotículas. Quando se ajusta o pH para valores mais ácidos, ocorre um aumento nas concentrações de íons H^+ com cargas eletrostáticas positivas livres na fase contínua. O inverso é observado quando o meio é basificado com adições de íons OH^- com cargas eletrostáticas positivas (DINGER, 2006). Os efeitos dessas adições ácido ou base no potencial zeta resultante de uma emulsão e microemulsão é definido pela composição eletrostática da gotícula.

No pH onde ocorrer a nulidade de cargas livres da fase líquida e das cargas existente na superfície das gotículas, será determinado o ponto isoelétrico da emulsão, devendo tal pH no produto ser evitado a fim da manutenção da estabilidade do sistema disperso. Pois, conforme explicado no item 7.4, diminuição do potencial zeta entre as gotículas minimiza a repulsão e favorece a floculação das gotículas.

A partir dos resultados obtidos, constata-se que o ponto isoelétrico da microemulsão foi alcançado em pH próximo a 1,0. Observando a curva de potencial zeta em função do pH, bem como o resultado de pH da caracterização ($6,61 \pm 0,045$) pode-se notar um distanciamento do ponto isoelétrico da microemulsão em valores de pH mais alcalinos. Desta forma, acredita-se que a alcalinização do meio poderia fornecer maior estabilidade ao sistema. Contudo, tendo em vista a instabilidade química de componentes aromáticos em meio alcalino, bem com a adequação do pH do produto ao pH da pele, não há necessidade de qualquer alteração do pH característico do produto com o objetivo de aumentar o potencial zeta e por conseguinte, a estabilidade.

7.5.3. Estudo de Estabilidade Acelerada.

A estabilidade acelerada, também conhecida como estabilidade normal ou exploratória, tem como objetivo obter dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Este teste é empregado utilizando-se lotes em escala laboratorial utilizando condições menos extremas que os testes de estabilidade preliminar. É um estudo preditivo que pode ser empregado para estimar o prazo de validade do produto, que posteriormente, deverá ser confirmado em estudos de prateleira (BRASIL, 2004). A microemulsão foi avaliada em condições de temperatura elevada ($40 \pm 2,0^\circ\text{C}$), temperatura ambiente ($25 \pm 2,0^\circ\text{C}$) e baixa temperatura ($5 \pm 2,0^\circ\text{C}$).

Na condição de temperatura elevada ($40 \pm 2,0^\circ\text{C}$), observou-se a manutenção do aspecto macroscópico nos 90 dias avaliados. O tamanho de gotícula apresentou-se estável com discreto aumento, mas sem descaracterização do sistema nanométrico microemulsionado obtido no dia 0. A evolução do índice de polidispersividade mostrou uma diminuição progressiva nos primeiros 30 dias, indicando maior homogeneidade na distribuição no tamanho de gotículas. A partir do dia 60, notou-se um discreto aumento na polidispersão, mas dentro do idealizado como adequado neste trabalho.

O potencial zeta, juntamente com a mobilidade eletroforética, desenvolveram-se de maneira estável no estudo estabilidade em temperatura elevada, com discreto distanciamento do ponto isoelétrico. Fato que também depõe positivamente para a estabilidade do sistema. A condutividade, dentre os parâmetros avaliados para esta condição, foi o em que se evidenciou maior alteração, sobretudo nos últimos 30 dias. O pH apresentou pequeno decréscimo, situando-se abaixo do pH fisiológico da pele no dia 90. A condição de alta temperatura por

um longo período pode ter favorecido a degradação dos constituintes aromáticos e consequente alteração do pH.

Nas condições de temperatura ambiente ($25 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), foi também atestada a estabilidade do veículo desenvolvido. Não foram evidenciadas alterações macroscópicas, bem como descaracterizações do tamanho de gotículas e índice de polidispersividade. O potencial zeta também se distanciou do seu ponto isoelétrico. Diferente da estabilidade em temperatura elevada, não foi observado alterações na condutividade do sistema em condições de temperatura ambiente. O pH também apresentou ligeiro decréscimo, mas sem prejudicar a qualidade da microemulsão, por ainda estar em acordo com o pH fisiológico da pele.

Em temperatura de refrigeração ($5 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$), a emulsão apresentou estabilidade similar às condições de temperatura ambientes. Mantendo valores adequados de tamanho de partículas, índice de polidispersividade, potencial zeta, condutividade, pH e mobilidade eletroforética. O aspecto macroscópico também manteve-e inalterado.

7.6. Obtenção de formulação de produto de perfumaria contendo a microemulsão desenvolvida.

Assim como relatado no item 2.2. Um produto de perfumaria é designado de acordo com sua concentração de fragrância em *parfums* (15 – 30%); *eau de parfums* (8 – 15%); *eau de toilettes* (4 – 8%) e *eau de cologne* (2 – 5%). O produto desenvolvido apresentou concentração de 4% de fragrância, o que o define, dentro desta classificação como uma *eau de cologne*. Juntamente, com o *parfum*, o *eau de cologne* é um dos mais populares produtos de perfumarias existentes (MITSUI, 1997).

A utilização de adjuvantes conservantes e antioxidantes se faz pertinente com vistas ao aumento da estabilidade do produto e consequente manutenção das características sensoriais e técnicas por períodos mais longos. A oxidação é frequentemente causa de instabilidade nas composições aromáticas podendo ser causada pelo ar atmosférico e levando à degradação de compostos susceptíveis como monoterpenos insaturados de substância provenientes de óleos cítricos e coníferos. A utilização de agentes antioxidantes é indicada para aumento do tempo de prateleira do produto, sendo indicado o Buti hidroxitolueno (BHT), que ajuda a prevenir reações de oxidação (CALKIN; JELLINEK, 1994). O BHT consta na relação de insumos farmacêuticos e substâncias utilizadas nas preparações incluídas no Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira como conservante para componentes oleosos (BRASIL, 2012a).

A presença de microorganismos em sistemas emulsionados pode afetar adversamente a estabilidade de emulsões podendo decompor o sistema tensoativo, ou até mesmo propiciar um aspecto desagradável ao produto (ANSEL et al., 1999). Desta forma, a utilização de um adjuvante conservante pode contribuir para retardar o crescimento microbiano em um sistema microemulsionado. O triclosano é um antimicrobiano de amplo espectro usado há mais de 20 anos em produtos de cuidados pessoais, incluindo desodorantes e preparações tópicas de proteção da pele e produtos de aplicação oral (BHARGAVA; LEONARD, 1996). O caráter não iônico do conservante, em consonância com o sistema tensoativo, propicia a manutenção das características eletroquímicas da microemulsão. A utilização do triclosano como conservante do produto está de acordo com a RDC nº 29 de 2012 da ANVISA, que contém a lista de substâncias de ação conservante permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Tal resolução permite o uso do triclosano em concentrações iguais ou inferiores a 0,3%, sem limitações e condições especiais de uso e advertências (BRASIL, 2012b).

A maior susceptibilidade dos componentes da fase oleosa às reações de instabilidade justifica a escolha de adjuvantes conservantes e antioxidantes de caráter lipofílico. Diante de tal característica, escolheu-se incorporar tais substâncias no tensoativo de menor EHL da microemulsão, no caso o *Span 80*, a fim de favorecer a rápida e homogênea solubilização. Em seguida adicionou-se os outros tensoativos e posteriormente a fragrância. Após completa solubilização da fase oleosa e dos tensoativos, procedeu-se a adição lenta e gradativa de água. A adição dos conservantes à microemulsão não promoveu alterações nas características do sistema.

7.7. Avaliação in vitro da segurança do produto desenvolvido.

7.7.1. Avaliação de potencial de irritabilidade ocular – teste em membrana córneo-alantóide de ovos embrionados de galinha (HET-CAM).

O aumento da variedade de matérias primas de diferentes origens e purezas disponíveis no mercado promoveu um aumento no risco de aparecimento de reações adversas a produtos cosméticos (CHIARI et al., 2012). A RDC 332/2005 da ANVISA regulamenta e obriga a implementação de um sistema de cosmetovigilância por parte das empresas do setor, bem como notificar à agência regulamentadora a identificação de situações de riscos associados aos seus produtos (BRASIL, 2005).

O Risco cosmético é definido pelo Guia de avaliação de segurança de produtos cosméticos como a possibilidade de ocorrência de reações adversas como irritação (processo de inflamatório que ocorre na área de contato do produto), sensibilização (processo inflamatório que envolve mecanismo imunológico, do tipo celular, com tempo de contato variável), sensações de desconforto (caracterizadas por sintomas subclínicos como ardência, prurido/coceira, dor, pinicação, etc.) e efeitos sistêmicos (passagem de ingredientes do produto para a corrente circulatória, independente da via de aplicação) (BRASIL, 2012c).

Ingredientes de fragrância, usados em produtos de perfumaria fina ou funcionais são frequentemente encontrados nos mais altos níveis em produtos aplicados sobre a pele, podendo causar reações dermatológicas como as fotorreações, ou mais comumente a irritação. Praticamente todos os materiais tem algum nível potencial de irritação, contudo, tendendo a ser irritantes de perfil leve e moderado (FORD, 1994). Os ensaios biológicos ainda são essenciais na avaliação de produtos cosméticos usados de forma contínua e prolongada pelos consumidores, contudo, desde a década 1980 tem-se desenvolvido modelos experimentais alternativos para a área cosmética, em substituição ao uso de animais em laboratório (BRASIL, 2012c; CHIARI, 2012).

Embora produtos funcionais dificilmente adquiram característica de irritação ocular em virtude da adição de fragrâncias, produtos de perfumaria fina com altas concentrações de fragrância devem ser avaliados de maneira mais criteriosa. As preparações aromáticas em spray com altas concentrações ou outros produtos passíveis de serem espirrados acidentalmente nos olhos devem exigir testes de toxicidade ocular, bem como o grau de alívio proporcionado pela lavagem com água (VAN ABBÉ, 2000).

A irritação ocular é avaliada *in vivo* pelo *Draize test*. O teste se baseia na instilação de amostra pura, ou diluída, de acordo com o uso no saco conjutival de coelhos albinos Nova Zelândia. A leitura de lesões conjutivas (hiperemia, quimose e opacidade), íris (irite) e córnea (densidade e área de opacidade) são realizadas no dia 1, 2, 3, e 7 após a aplicação, podendo se prolongar até o 28º dia, seguindo a escala de Draize (BRASIL, 2012c). Alterações na metodologia tem sido propostas visando diminuir o desconforto dos animais. Contudo, o *Draize test* tem sido muito combatido por organizações de proteção animal. Diante de tal pressão ética, os cientistas não tem medido esforços para harmonizar os ensaios de irritação ocular com a implementação dos 3 R's (*Refinement* – Refinamento; *Reduction* – Redução e *Replacement* – Substituição) (CRUZ et al., 2004)

A conjutiva (membrana mucosa que reveste a parte anterior da esclerótica e a superfície interna da pálpebra) é uma das estruturas investigadas na avaliação da resposta à

substâncias químicas no teste de irritação ocular de Draize. As lesões ocorridas na conjutiva são responsáveis por 18% de toxicidade ocular observado no *Draize test*. Por isso, testes alternativos, como o HET-CAM, que apresentam como desfecho final a medição de alterações vasculares são mais correlacionáveis à injúria da conjutiva (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; ABREU, 2008).

No processo de formação embrionária do ovo de galinha, o alantoide se desenvolve rapidamente para a porção distal do ovo e começa a difundir-se em direção ao córiom formando a membrana corioalantóide, que começa a ser intensamente vascularizada entre o 4º e 8º dia do desenvolvimento embrionário. A membrana corioalantóide tem se mostrado um modelo experimental adequado para simular alterações de padrões vasculares (SILVA, 2011). O HET-CAM se baseia na observação dos efeitos irritantes na membrana por 5 minutos após a aplicação do produto (BRASIL, 2012c).

O produto desenvolvido apresentou-se como irritante moderado, com escore mínimo para esta classificação dentro da escala preconizada. Desta forma, o contato do produto com os olhos deve ser evitado. A legislação nacional define, contudo, que apenas um único ensaio *in vitro* não é suficiente para a completa definição da irritação ocular, devido à existência de outros mecanismos envolvidos na irritação ocular, sendo necessário testes que avaliem além da vascularização (HET-CAM), a opacidade/permeabilização (*Bovine Corneal Opacity and Permeability*) e a citotoxicidade (citotoxicidade pelo método de corante MTT e *Red Blood Cell*) (BRASIL, 2012c).

8. Conclusões

- 8.1. Foi possível obter composição aromática para uso em perfumaria fina ou funcional a partir da fragrância T64. Constituída das matérias primas Galaxolide, Salicilato de Amila, Cedramber, Ionona beta, Geraniol, Floralozone, Essencia sintética de Maracujá, Bergamota base e Óleo essencial de *citrus limon*. A fragrância desenvolvida foi caracterizada cromatograficamente, sugerindo, a partir destes resultados a substância galaxolide e cedramber como notas de base; as substâncias salicilato de amila, ionona beta, floralozone e geraniol como nota de corpo e as matérias primas bergamota base e o óleo essencial de *Citrus limon* como notas de cabeça;
- 8.2. Conseguiu-se obter o óleo fixo a partir da semente de *Spondias tuberosa* Arr. Cam com rendimento de 2,12%. O óleo obtido foi utilizado como opção de fase oleosa no desenvolvimento de microemulsões;
- 8.3. Obteve-se região de microemulsões nos 4 diagramas desenvolvidos, apresentando vários pontos de microemulsões com possíveis aplicações clínicas ou cosméticas. A partir do diagrama 4, desenvolveu-se uma microemulsão para uso como veículo de fragrâncias.
- 8.4. A microemulsão selecionada foi caracterizada, obtendo-se os seguintes resultados: pH final de 6,61 ($\pm 0,045$), condutividade de 90,4 ($\pm 0,70$) $\mu\text{S}/\text{cm}$, viscosidade de 7,510 ($\pm 0,061$) cP, densidade relativa de 1,0269 ($\pm 0,0003$) g/ml, índice de refração de 1,3723 ($\pm 0,002$), tamanho de gotículas de 11,68 ($\pm 0,061$) nm, índice de polidispersividade igual a 0,148 ($\pm 0,004$), potencial zeta de -7,94 ($\pm 0,37$) mV, comportamento de fluxo newtoniano e isotropia;
- 8.5. A microemulsão escolhida apresentou-se como sistema estável, sob todos os testes de estabilidades executados;

- 8.6.Foi possível obter uma formulação de um produto de perfumaria fina com os seguintes componentes: PEG 40, tween 20, span 80, Fragrância T64, BHT, triclosano e água;
- 8.7.Conseguiu-se avaliar *in vitro* a irritabilidade ocular da formulação desenvolvida e conclui-se que a formulação foi classificada com poder moderado de irritação, devendo-se evitar contato do produto com a região ocular.
- 8.8.Os resultados obtidos convergem para um produto nanotecnológico de alto valor agregado, estável e capaz de substituir o álcool, preservando as características aromáticas inerentes à fragrância.

9. Referências

ABE, T. Odor, Information and New Cosmetics – The Ripple effect on life by aromachology research. **Chemical Senses**, Tokio v. 30, p.246-247, 2005.

ABIHPEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS – Panorama do setor de HPPC, 2014. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2014/04/2014-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-DEZ-2014.pdf>>. Acesso em 07 de Fevereiro de 2015.

ABREU, C. L. C. Avaliação da citotoxicidade induzida por produtos cosméticos pelo método de quantificação de proteínas totais em célula 3T3. 2008 (Mestrado em Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

ADAMS R. P. Identification Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp, Carol Stream, 1995.

AIKENS, P. A.; FRIBERG, S. E. Microemulsions in cosmetics. In: KUMAR, P.; MITTAL, K. L. **Handbook of microemulsion science and technology**. Marcel Decker, Inc. New York, 1999.

AKHTAR, M. Microemulsions formation, stability and their characterisations, 1996 (Doutorado em Química) – Brunel University, Uxbridge, 1996.

ALEXANDER, M. DALGLEISH, D. G. Dynamic Light Scattering Techniques and Their Applications in Food Science. **Foods Biophysics**, v.1, p.2-13, 2006.

ALMEIDA, T. C. A. Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas. 2012 (Mestrado em Engenharia Química) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

ANSEL, M. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. J. **Farmacotécnica: Formas farmacêuticas e Sistemas de liberação de fármacos**. 6ª ed. São Paulo: Premier, p.281-316, 1999.

API, A. M. Toxicological profile of diethyl phtalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredientes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 39, p. 97-108, 2001.

ARAUJO, S. T. C.; CAMERON, L. E.; OLIVEIRA, L. F. D. O Sentido do Olfato no cuidado de enfermagem hospitalar. **Esc. Anna Nery**, v.15(4), p. 811-817, 2011.

ASTEN, A. V. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. **Trends in analytical chemistry**, v. 21, p. 698-708, 2002.

AZEMM, A.; RIZWAN, M.; AHMAD, F. J.; KHAN, Z. I.; KHAR, R. K.; AQIL, M.; TALEGAONKAR, S. Emerging role of microemulsion in cosmetics. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 2, p. 275-289, 2008.

BAGETTA, G.; MORRONE, L. A.; ROMBOLÀ, L.; AMANTEA, D.; RUSSO, R.; BERLIOCCHI, L.; SAKURADA, S.; SAKURADA, T. ROTIROTI, D.; CORASANTI, M. T. Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. **Fitoterapia**, v.81, p.453-461, 2010.

BARATA, G. Sobram razões para transformar biodiversidade em produtos. **Inovação Uniemp**, Campinas, v.1, p.38-39, 2005.

BARIL, M. B.; FRANCO, G. F.; VIANA, R. S.; ZANIN, S. M. W. Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**, v. 13, p. 45-54, 2012.

BARTABURU, X. Umbú, fruta da resistência. Disponível em: <<http://viajeaquil.abril.com.br/materias/umbu-fruta-de-resistencia>>. Acesso em 23 de Março de 2015.

BERNADI, D. S. Desenvolvimento de nanoemulsão de óleo de arroz como adjuvante no tratamento de dermatite atópica e psoríase. 2011. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

BHARGAVA, H. N.; LEONARD, P. A. Triclosan: Applications and safety. **American Journal of Infection control**, v. 34, p. 209-218, 1996.

BOONME, P. Application of microemulsions in cosmetics. **Journal of cosmetic dermatology**, v.6, p. 223-228, 2007.

BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; GOMES, R. C. M.; CAVALCANTI, N. B. Chemical composition of umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Cam) seeds. **Química Nova**, v. 30(1), p. 49-52, 2007

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, Brasília, Editora Anvisa, 2ª ed., 2000.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, Brasília, v. 1, 2004.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 332 de 1º de Dezembro de 2005**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira**, 2ª ed., 224p., Brasília, 2012a.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 29 de 12 de Junho de 2012**. Brasília, DF, 2012b.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos, Brasília, v.2, p.47, 2012c.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada n° 7 de 10 de Fevereiro de 2015. Brasília, DF, 2015.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior Relatório de Atividades do Grupo de Atividade em Mercado. Fórum de competitividade em Nanotecnologia, 2010. Disponível em: <<http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=3&menu=2763>>. Acesso em 17 de março de 2015.

BRECHBILL, G. O. **Perfumery materials of fragrance**. Fragrance Book Inc. New Jersey, 2007.

BRITO, H. R.; Caracterização Química de Óleos essenciais de *Spondias mombin* L., *Spondias purpúrea* L. e *Spondias sp.* (Cajarana do sertão), 2010. (Mestrado em Ciências florestais) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2010.

BRONIARZ-PRESS, L.; OCHOWIAK, M.; MATUSZAK, M.; WLODARCZAK, S. The effect of shear and extensional viscosity on atomization in medical inhaler. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, p. 199-206, 2014.

BRUM, A. A. S.; ARRUDA, L. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de Extração e Qualidade da Fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, v. 32(4), p.849-854, 2009.

BUCK, L.; AXEL, R. A novel multigene Family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition, **Cell**, v. 65, p. 175-187. 1991.

BUTLER, H. Cosmetic through the ages. In: BUTLER, H. (Org.). **Poucher's perfumes, cosmetics and soaps**. Dordrecht: ed. Kluwer Academic Publishers, 2000. Cap. 2

CALKIN, R. R.; JELLINEK, J. S. **Perfumery – Practice and Principles**. New York. John Wiley and Sons, 1994.

CAMARGO, M. F. P. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. 2008 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CAPANEMA, L. X. L.; VELASCO, L. O. M.; FILHO, P. L. P.; NOGUTI, M. B. Panorama da indústria de higiene Pessoal, perfumaria e cosméticos. **BNDES Setorial**, v. 25, p.131-156, 2007.

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

CARLES, J. A method of creation in perfumery. **Soap, Perfumery & Cosmetics**, v.35, p.328-335, 1962.

- CARNEIRO, A. C. S. Performance do perfume: modelagem e simulação da evaporação/difusão. 2012 (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade do Porto, Porto, 2012.
- CHANGEZ, M.; CHANDER, J.; DINDA, A. K. Transdermal permeation of tetracaine hydrochloride by lecithin microemulsion: In vivo. **Colloid and Surfaces**, v. 48. P. 58-66, 2006.
- CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Geraniol – A review of a commercially important fragrance material. **South Africa Journal of Botany**, v. 76, p. 643 – 651, 2010.
- CHIARI, B. G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H. R. N. CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Estudo da segurança de cosméticos: presente e futuro, **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.33, n.3, p.323-330, 2012.
- CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaio Biológicos para a avaliação de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. v. 30, p. 19-30, 2009.
- CLASSEN, C.; HOWES, D.; SYNNOT, A. **Aroma – The cultural history of smell**. London e New York. Ed.Routledge, 1994.
- COSTA, C. K.; OLIVEIRA, A. B.; ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, M. D. Um estudo da pele seca: produtos emulsionados para seu tratamento e busca de sensorial agradável para o uso contínuo. **Visão Acadêmica**, v.5, p.69-78, 2004.
- CRUZ, A. S.; BARBOSA, M. L.; PINTO, T. J. A. Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.64, p.1-9, 2004
- CUNHA JUNIOR, A. S.; FIALHO, S. L.; CARNEIRO, L. B.; OREFICE, F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 66(3), p. 385-391,2003.
- DALTIN, D. Tensoativos: química, propriedades e aplicações, São Paulo: Blucher, 2011.
- DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, J. A.; OLIVEIRA, E. E.; SILVEIRA, W. L. L.; ARAÚJO, I. B.; OLIVEIRA, A. G.; EGITO, E. S. T. Microemulsão: um promissor carreador de moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32(1), p. 9-18, 2011.
- DAUDT, R. M.; EMANUELLI, J.; KÜLKAMP-GUERREIRO, I. C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**, v.65, p. 28-31, 2013.
- DIAS, S.M.; SILVA, R.R. Perfumes, uma química inesquecível. **Química nova na escola**, n.4, p.3-6, 1996.
- DINGER, D. Medidas de Pontos Isoelétricos sem o Uso de Analisador de Potencial Zeta. **Cerâmica Industrial**, v.11, n.3, 2006.

- DIXIT, S. Water Based Fragrance. **Chemical Weekly**, v. 18, p.183-185, 2003.
- DUDZINA, T.; GOETZ, N. V.; BOGDAL, C.; BIESTERBOS, J. W. H. HUNGERBÜHLER, K. Concentrations of cyclic volatile methylsiloxanes in European cosmetics and personal care products: Prerequisite for human and environmental exposure assessment. **Environment International**, v.62, p.86-94, 2014.
- ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LÓRAN, S.; CONCHELLO, P.; GARCIA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, v.22, p. 896-902, 2011.
- FAPESP. Beleza Fundamentada, 2008. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2008/04/01/belezafundamentada/>>. Acesso: em 05 de jan. 2014.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5ª Edição. Parte I. Brasília: ANVISA, 2010.
- FERREIRA, E. E.; BRANDÃO, P. R. G.; KLEIN, B.; PERES, A. E. C. Reologia de suspensões minerais: uma revisão. **Revista da Escola de Minas**, v. 58, p.83-87, 2005.
- FIRMENICH & CIE. TCHAKALOVA, V.; HAFNER, V. Ethanol-Free **Microemulsion perfuming compositions**. WO Pat. 2014090959 (A1). jun. 2014
- FITZGERALD, J. E.; KURTZ, S. M.; SCHARDEIN, J. L.; KAUMP, D. H. Cutaneous and parenteral studies with vehicles containing isopropyl myristate and peanut oil. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.13, p.448-453, 1968.
- FOLLEGATI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U.; CARDOSO, R. L.; MACHADO, S. S.; ROCHA, A. S.; LIMA, R. R. Aproveitamento Indústria do umbu: Processamento de Geléia e Compota, **Ciência agrotécnica**, v. 27(6), p. 1308-1314, 2003.
- FONTANA, K. B. Efeito da introdução do grupo dodecila no poli(etilenoimina) na associação com surfactantes e na estabilização de emulsões óleo em água. 2010 (Mestrado em Físico-Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.
- FORD, R. A.; The Toxicology and Safety of Fragrances. In: MULLER, P. M.; LAMPARSKY, D. (Org.). **Perfumes: Art, Science and Technology**. Londres, Springer Science + Bussines Media Dordrecht, 1994, Cap. 16.
- FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; JÚNIOR, A. A. S.; GREMIÃO, M. P. D. OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas.**, v.41, n.3, p.301-303, 2005.
- FRANGE, R. C. C.; GARCIA, M.T. J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: Avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, p. 267-271, 2009.
- FREIRE, M. T. A.; BOTTOLI, C. B. G.; FABRIS, S.; REYES, F. G. R. Contaminantes

voláteis provenientes de embalagens plásticas: desenvolvimento e validação de métodos analíticos. *Química Nova*, v.31, p. 1522-1532, 2008.

FRIBERG, S. E.; YIN, Q.; AIKENS, P. A. Vapour pressures of phenethyl alcohol and limonene in systems with water and Laureth 4. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 20(6), p. 355-367, 1998.

FRIBERG, S. E.; ZHANG, Z.; GANZUO, L.; AIKENS, P. A. Stability factor and vapor pressures in a model of fragrance emulsion system. *Journal of cosmetic Science*, v. 50, p. 203-219, 1999.

FRONZA, T.; GUTERRE, S.; POLHMANN, A.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: Em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M. E.; CAGLIANI, I. NEGRI, D. Formulation and characterization of disperse system as topical vehicle for odorous molecules. *Journal of Cosmetic Science*, v. 51, p. 209-226, 2000.

GALEMBECK, F.; CSORDAS, Y. Cosméticos: a química da beleza. Disponível em: <http://web.ccead.puc-rio.br/condigital/mvsl/Sala%20de%20Leitura/conteudos/SL_cosmeticos.pdf>. Acesso em 07 de Fevereiro de 2015.

GORDON, J. L. P. L. Razões e Relevância de elaboração de política de inovação para nanotecnologia no Brasil. *Leitura de Economia Política*, v. 17, p. 37-68, 2010.

GONÇALVES, J. C. Nanotecnologia aplicada à pele. 2014 (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Lúsofona de humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2014.

GUÉNIN, E. P.; TROTZINKA, K.A.; SMITH, L. C.; WARREN, C. B.; MUNTEANU, M. A.; CHUNG, S. L.; TAN, C. T. **Alcohol Free Perfume**, U.S. Pat. 5468725. 21 nov. 1995. 13p.

GUERRA, E. C. Proposta e Análise de uma metodologia para avaliação do desempenho técnico de perfumes. 2002 (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade de Campinas, Campinas, 2002.

GUTIERREZ, R. M. V.; MONTEIRO-FILHA, D. C.; KAUSS, I. F.; OLIVEIRA, M. J. Complexo eletrônico: Displays e Nanotecnologia. *BNDES Setorial*, v.23, p. 27-84, 2006.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro. Elsevier, 2006.

HADLEY, K.; ORLANDI, R. R.; FONG, K. J. Basic Anatomy and Physiology of olfaction and taste. *Otolaryngologic Clinics of North America*, v. 37(6), p. 1115-1126, 2004.

HARKEMA, J. R.; CAREY, S. A.; WAGNER, J. G. The Nose Revisited: A brief review of the comparative structure, function, and toxicologic pathology of the nasal epithelium. *Toxicology Pathology*, v. 34, p. 252-269, 2006.

HEISTERBERG, M. V.; MENNÉ, T.; JOHANSEN, J. D. Frangrance allergy and quality of life – development and validation of a disease-specific quality of life instrument. **Contact Dermatitis**, 12153, 2013.

HEM, S. M.; FELDKAMP, J. R.; WHITE, J.L Introdução à Físico-química das Emulsões e suspensões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Org.) **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001.

HERZ, R. S. Perfume. In: GOTTFRIED, J. A. (Org.). **Neurobiology of Sensation and Reward**, Boca Raton: CRC Press, 2011.

HOLLINGSWORT, K. G.; JOHNS, M. L. Measurement of emulsion droplet size using PFG NMR and regularization methods. **Journal of Colloids and Interface Science**, v.258, p. 383-389, 2003.

HOSSEINKHANI, B.; CALLEWAERT, C.; VANBEVEREN, N.; BOON, N. Novel biocompatible nanocapsule for slow release of fragrance on the human skin. **New biotechnology**, v. 32(1), 2015.

HUF, G.; RITO, P. N.; PRESGRAVE, R. F.; VILLAS BÔAS, M. H. S. Reações adversas aos produtos cosméticos e o sistema de notificação em vigilância sanitária: um inquérito. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 16, p. 1017-1020, 2013.

ITEHPEC - INSTITUTO DE TECNOLOGIA E ESTUDOS DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Encontro Internacional de Nanotecnologia em Cosméticos “A nanotecnologia como fator de competitividade das empresas”. Documento de referência: Nanotecnologia em Cosméticos, 2013. M Disponível em: < <http://www.itehpec.org.br/wp-content/uploads/2013/12/Doc-de-Refer%C3%Aancia-Nanotecnologia.pdf>> . Acesso em 08 de Fevereiro de 2015.

JADHAV, K. R.; SHETYE, S. L.; KADAM, V. J. Design and evaluation of Micro Emulsion based drug delivery system. *Asian Journal of Experimental Biological Science*, v. 1, p. 580-591, 2010.

JOHANSEN, J. D.; RASTOGI, S. C.; JEMEC, G. B. E. Dipropylene glycol allergy: a hidden cause of perfume contact dermatitis. **American Journal of Contact Dermatitis**, v. 5, p. 98-101, 1994.

JOHANSEN, J. D. Fragrance contact allergy: a clinical review. **American journal of clinical dermatology**. v. 4, p. 789-798, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

JURADO, E. ; BRAVO, V.; CAMACHO, F.; VICARIA, J. M.; FERNANDEZ-ARTEAGA, A. Estimation of the distribution of droplet size, interfacial area and volume in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 295, p. 91-98, 2007.

- KNOBEL, M. O future da nanotecnologia no Brasil. Vinte anos não são nada? **Ciência e Cultura**, v. 57(1), p. 4-5, 2005.
- LAIKO, J.; ISOLA, D.; API, M. Ethanol and diethyl phthalate: vehicle effects in the local lymph node assay, **Int. J. Toxicol.**, v. 23(3), p. 171-177, 2004
- LAPCZYNSKI, A.; MCGINTY, D.; JONES, L.; BATHIA S.; LETIZIA C. S.; API, A. M. Fragrance material review on benzyl salicylate. **Food Chem Toxicology**, v.45, p. 362-380, 2007.
- LARSEN, W. G.; How to test for fragrance allergy. **Cutis**,v. 65, p. 39-41, 2000.
- LASKA, M. Olfactory discrimination ability of human subjects for enantiomers with an isoprenil group at the chiral center. **Chemical Senses**, v.29, p. 143-152, 2004.
- LEMOS, T. L. G.; NOGUEIRA, P. C. L.; ALENCAR, J. W.; CRAVEIRO, A. A. Composition of the Leaf Oils of Four *Spondias* Species from Brazil. **J. Essent. Oil. Res.**, v.7, 1995, p. 561-563.
- LENOCHOVÁ, P.; VOHNOUTOVÁ, P.; ROBERTS, S. C.; OBERZAUCHER, E.; GRAMMER, K.; HAVLÍČEK, J. Psychology of Fragrance Use: Perception of Individual Odor and Perfume Blends Reveals a Mechanism for Idiosyncratic Effects on Fragrance Choice. **PLoS One**, Stirling, v.7, e33810, 2012.
- LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E, ou de ceramíde, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p. 563-569, 2002.
- LIMA, S. C. Germinação de sementes e otimização de técnicas de micropropagação de umbuzeiro (*Spondias tuberosa*, Arr.) Anacardiaceae, 2009 (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009).
- LINS NETO, E. M. F. Usos tradicionais e manejo incipiente de *Spondias tuberosa* Arruda. No Semi-Árido do Nordeste do Brasil, 2008 (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2008.
- LUEPKE, N. P. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. **Food and Chemical Toxicology**, v.23, n.2, p.287-291, 1985.
- LYRA, C. S.; NAKAI, L. S.; MARQUES, A. P. Eficácia da aromaterapia na redução de níveis de estresse e ansiedade em alunos de graduação da área da saúde: estudo preliminar. **Fisioterapia e Pesquisa São Paulo**, v. 17(1), p. 13-17, 2010.
- MALNIC, B. Searching for the ligands of odorant receptors, **Molecular Neurobiology**, v. 35(2), p. 175-181, 2007
- MARTINS, P. R. . Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável. Estudos Sociales - **Centro de Investigaciones Económicas y Sociales de la Universidad de Sonora**, v. 34, p. 295-311, 2009.

MATA, V. G.; GOMES, P. B.; RODRIGUES, A. E. Perfumery ternary diagrams (PTD): A new concept applied to the optimization of perfume compositions. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, p. 465-471, 2005.

MATTOSO, E. Estudo de fragrâncias amadeiradas da Amazônia, 2005 (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

MENDES, B. V. **Umbuzeiro (Spondias tuberosa Arr. Cam): importante fruteira do semi-árido**. ESAM, Mossoró, 1990.

MENDONÇA, C. R. B. Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos. 2005 (Doutorado em Química), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MENINI, A.; LAGOSTENA, L.; BOCCACCIO, A. Olfaction: From odorant molecules to the olfactory cortex. **Physiology**, v.19, p. 101-104, 2004.

MIGUEL, L.M. A Biodiversidade na indústria de cosméticos: contexto internacional e mercado brasileiro. 2012. (Doutorado em Geografia Humana) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

MIHRANYAN, A.; FERRAZ, N. STROME, M. Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. **Progress in materials science**, v. 57, p. 875-910, 2012.

MITSUI, T. **New cosmetic science**, 1ª ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1997.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of structure and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonaten-heptanen-butanolwater by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v.493, p. 100-107, 2000.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; DELICATO, T.; GONÇALVES, R. A.; ROCHA-FILHO, P. A. Physicochemical characterization of canola oil/water nano-emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v.27, p.109-115, 2008.

MORI, K.; TAKAHASHI, Y. K.; IGARASHI, K. M.; YAMAGUCHI, M. Maps os odorants molecular features in the mammalian olfactory bulb. **Physiological Reviews**, v.86, p.409-433, 2006.

NACHT, S.; CLOSE, J. A.; YEUNG, D.; GANS, E. Skin friction coefficient: changes induced by skin hidratação and emollient application and correlation with perceived skin feel. **Journal of Society of Cosmetic Chemists**, v. 32, p.55-65, 1981.

NARDY, A. J. R.; MACHADO, F. B. **Mineralogia Óptica – Óptica Cristalina**, 2002. <Disponível em: <http://www.rc.unesp.br/igce/petrologia/nardy/textospdf.html>> Acesso em 05 de maio de 2013.

NEUMAN, M. G.; HABER, J.A.; MALKIEWICZ I. M.; CAMERON, R. G.; SHEAR, N. H. Ethanol signals for apoptosis in cultured skin cells. **Alcohol**, v. 26, p. 179-190, 2002.

NEUNER-JEHLE, L.; ETZWEILER, F. The measuring of odors. In: MÜLLER, P. M.; LAMPARSKY, D. (Org.). **Perfumes, Art, Science and Technology**. Londres, Springer Science + Bussines Media Dordrecht, 1994.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M.A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: Estrutura e aplicações como Sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27(1), p. 131-138, 2004.

OPHASWONGSE, S.; MAIBACH, H. I. Alcohol dermatites: allergic contact dermatites and contact urticari syndrome. A review. **Contact dermatitis**, v. 30, p. 1-6, 1994.

PAL, R. Effect of droplet size on the rheology of emulsions. **AIChE Journal**, v. 42, p. 3181 – 3190, 1996.

PALACIOS, A. R. J. As múltiplas culturas e os múltiplos usos: Cultura e segmentação de público observados em anúncios publicitários impressos de cosmético. **“Comunicação, Mídia e Consumo”/Escola Superior de Propaganda e Marketing**, v. 3(6), p.1-20, 2006.

PALHETA NETO, F. X.; TARGINO, M. N.; PEIXOTO, V. S.; ALCÂNTARA, F. B.; JESUS, C. C.; ARAÚJO, D. C.; MARÇAL FILHO, E. F. L. Anormalidade Sensoriais: Olfato e Paladar. **Arquivo Interno de Otorrinolaringologia**, v.15(3), p. 350-358, 2011.

PASCOA, H. Desenvolvimento e caracterização de microemulsão à base de óleo de sucupira (*P. emarginatus* Vog. Fabaceae) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica. 2012 (Mestrado em Ciências Farmacêutica) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

PAULA, B. Produção de Fermentado de umbú (*Spondia Tuberosa* Arr. Cam), 2011. (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.

PEREIRA, E. M. A. Interação entre bicamadas lipídicas e interfaces hidrofóbicas, 2003 (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PEREIRA, C. S. C. Estudo da Substantividade de uma composição aromática na pele em função do ciclo menstrual, 2008 (Mestrado em fármacos e medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

PISCOPO, M. R.; KNISS, C. T.; TEIXEIRA, C. E.; BIANCOLINO, C. A. O Setor Brasileiro de Nanotecnologia: Oportunidades e desafios. In: XXXVII Encontro da ANPAD, 2013, Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www.anpad.org.br/diversos/trabalhos/EnANPAD/enanpad_2013/ESO/Tema%2011/2013_EnANPAD_ESO1152.pdf>. Acesso em 17 de Maio de 2015.

PODLOGAR, F.; ROGAC, M. B.; GASPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-Tween40[®]-Imwitor308[®]-IPM microemulsion on ketoprofen release. **International Journal of Pharmaceutics**, v.302, p.68-77, 2005.

RASTOGI, S. C.; MENNÉ, T.; JOHANSEN, J. D. The composition of fine fragrance is changing. **Contact Dermatitis**, Copenhagen, v. 48, 130-132, 2003.

RIEGER, M. M. Emulsões. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Org.) **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001. Cap. 17.

RODRIGUES, F. V. Fisiologia Sensorial. **Revista da Biologia**, v.5, p. 24-32. 2010.

RODRIGUES, A. R. O. Desenvolvimento de magnetolipossomas baseados em nanopartículas de níquel com coroa de sílica para aplicações na entrega de fármacos antitumorais. 2012 (Mestrado em Biofísica e Bionossistemas), Universidade do Minho, Braga, 2012.

ROSSI, C.G. F. T; DANTAS, T. N. C.; DANTAS NETO, A. A.; MACIEL, M. A. M. Microemulsões: Uma abordagem Básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universitária Rural: Série Ciências Exatas e da terra**, v. 26, p. 45-66, 2007.

ROSSI-BERGMAN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60(2), p. 54-58, 2008.

ROUDNITSKA, E. The Art of perfumery. In: MÜLLER, P. M.; LAMPARSKY, D. (Org.). **Perfumes, Art, Science and Technology**. Londres, Springer Science + Bussines Media Dordrecht, 1994. Cap. 1.

SALGADO, A. P. S. P.; SCHMIDT, P. A.; FRAGA, A. C.; CASTRO, D. P.; SILVA, V. F.; VILELA, F. J. V.; AGUIAR, P. M.; CASTRO NETO, P. Rendimento de Óleos fixos de sementes de algodão (*Gossypium hisurtum*) e sua caracterização química. In: IV CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 2003, Goiânia. **Algodão: Um mercado em evolução**. Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/algodao/publicacoes/trabalhos_cba4/290.pdf>. Acesso em 02 de maio de 2015.

SANTOS, C. A. F. In situ evaluation of fruit yeld and estimation of repeatability coefficient for major fruit traits of umbu tree [*Spondias tuberosa* (Anacardiaceae)] in the semi-arid region of Brazil. **Genetic Resource and Crop Evolution**, v.46(5), p. 455-460, 1999.

SCHEINMAN, P. L. Allergic contact dermatites to fragrance: a review. *American journal of contact dermatitis*, v. 7, p. 65-76, 1996

SCHILLING, B.; KAISER, R.; NATSCH, A.; GAUTSCHI, M. Investigation of odors in fragrance industry. **Chemoecology**. Basel. v. 20, p.135-147, 2010.

SCHIRMER, W. N.; LACEY, M. E. Q.; LISBOA, H. M.; VIEIRA, M.; ROSSO, L.; CAMPOS, G. F.; RODRIGUES, M. Z. Análises olfatométricas para a determinação das características de odor no manguezal do itacorubi, município de Florianópolis, Santa Catarina. **Revista de Ciências Ambientais**, v. 2(1), p. 57-72, 2008.

SCHREIBER, W. L. Perfumes. In: KROKSHWITZ, J. I.; HOWE-GRANT, M. (Org.). **Kirk-Othmer Enciclopedia of Chemical Technology**, New York: JohnWiley & Sons, Inc. 1996.

- SCOGNAMIGLIO, J.; JONES, L.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance Material Review of cyclopentanone. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.608-612, 2012a
- SCOGNAMIGLIO, J.; JONES, L.; LETIZIA, C. S.; API, A. M. Fragrance Material Review of anisyl alcohol. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p.134-39, 2012b
- SCOGNAMIGLIO, J.; LETIZIA, C. S.; POLITANO, V. T.; API, A. M. Fragrance Material Review of acetyl cedrene. **Food and Chemical Toxicology**, v.62, p.152-166, 2013.
- SHIMODA, M.; SHIBAMOTO, T. Isolation and identification of headspace volatiles from brewed coffee with an on-column GC/MS method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.802-804, 1990.
- SILVA, J. M.; LIMA, J. A. S. Quatro abordagens para o movimento browniano. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v.29, p.25-35, 2007.
- SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; SANTOS, S. C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Antiviral activities of extracts and phenolic components of two *Spondias* species against dengue virus. **The Journal of Venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 17 (4), p. 406-413, 2011
- SILVA, A. R. A.; MORAIS, S. M.; MARQUES, M. M. M.; OLIVEIRA, D. F.; BARROS, C. C.; ALMEIDA, R. R.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of two *Spondias* species from Northeastern Brazil. **Pharmaceutical Biology**, v. 50(6), p. 740-746, 2012.
- SILVA, J. E. S. Análise fractal da vascularização da membrana corioalantóide de embriões de codornas japonesas (*Coturnix japonica*) submetida a dietas enriquecidas com ácidos graxos em diferentes concentrações. 2011 (Mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.
- SILVA, S. P.; QUINTAIROS, P.; OLIVEIRA, E. A. A. Q.; SANTOS, V. S. Micro e pequenas indústrias de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos: estudos sobre a dificuldade de obter financiamentos no Brasil. In: **IX Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, 2009, São José dos Campos. Disponível em: http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2009/anais/arquisvos/0384_0370_01.pdf Acesso em 17 de Maio de 2015.
- SOUSA, J. P. B. Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fase gasosa e líquida. 2007 (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- SPEZIALI, M. G. De aromas e perfumes, o mercado da indústria do “cheiro”. **Química Nova**, Porto Alegre, v. XY, p. 1-4, 2012.
- STOCKHORT, U.; PIETROWSKY, R. Olfactory perception, communication, and the nose-to-brain pathway. **Physiology & Behavior**, v.83, p.3-11, 2004.

SU, C.; MENUZ, K.; CARLSON, J. R. Olfactory perception: receptors, cells, and circuits. **Cell**, v. 139, p. 45-59, 2009.

TAKASAGO, PERFUMERY CO LTD. FRASER, S. WARR, J.; REGNIEZ, C. **dFragrance microemulsion composition**. US Pat. 2011177995 (A1). set. 2011

TEIXEIRA, M. A.; RODRÍGUEZ, O.; MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Perfumery quaternary diagrams for engineering perfumes. **AIChE Journal**, v.55, p. 2171-2185, 2009.

TEIXEIRA, M. A.; RODRÍGUEZ, O.; RODRIGUES, A. E. Perfumery Radar – A predictive tool for perfume family classification. **Ind. Eng. Chem. Research**. Porto. v. 49. P.11764-11777, 2010.

THADROS, T; IZQUIERDO, P; ESQUENA, J; SOLANS, C. Formation and stability of nanoemulsions. **Advance in Colloid and Interface Science**, v.108-109, p.303-318, 2004.

TOLMAN, R. The effect of droplet size on surface tension. **The Journal of Chemical Physics**, v. 17(3), p. 333-337, 1949.

TOMSIC, M.; PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; ROGAC, M. B.; JAMNIK, A. Water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: small-angle X-ray scattering study. **International Journal of Pharmaceutics**. v.327, p.170-177, 2006.

TREE-UDOM, T.; WANICHWECHARUNGRUANG, S. P.; SEEMORK, J.; ARAYACHUKHEAT, S. Fragrant chitosan nanospheres: Controlled release systems with physical and chemical barriers. **Carbohydrate Polymers**, v.86, p.1602-1609, 2011.

TRISKA, L. N. S. Prazer e bem estar no trabalho. A importância do olfato na ergonomia. 2003 (Mestrado em Engenharia de Produção) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

TZHAYIK, O.; CAVACO-PAULO; A.; GEDANKEN, A. Fragrance release profile from sonochemically prepared protein microsphere containers. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 19(4), p. 858-863, 2012.

ULKER, O. C.; KAYMAK, Y.; KARAKAYA, A.; Investigation of allergenicity of some cosmetic mixture by using ex vivo local lymph node assay-BrdU endpoints. **International archives of allergy and immunology**, v. 164, p. 301-307, 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. LEITE, M. F., AMARAL, J. G.; GOMES, A. F.; MORAES JÚNIOR, R. C. **Composição de Fragrâncias e seus usos**. BR1020120335220. Dez. 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA. LEITE, M. F.; AMARAL, J. G.; FERRAZ, K. O.; VINHAS, A. C. A. **Dispositivo sustentável de incubação para avaliação de segurança de produtos cosméticos**. BR10220130141348. Jul. 2013.

VAN ABBÉ, N. J. Perfume and the manufacture of consumer products. In: BUTLER, H. (Org.). **Poucher's perfumes, cosmetics and soaps**. Dordrecht: ed. Kluwer Academic Publishers, 2000.

VENKATRAMANI, C. J.; XU, J.; PHILLIPS, J. B. Separation Orthogonality in Temperature-Programmed Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1486-1492, 1996.

VOORHERS, P. W. The theory of Ostwald Ripening. **Journal of Statistical Physics**, v. 38, p. 231-252, 1985.

WAGEMAKER, T. A. L.; ROSADO, C.; ANDRADE, J. P.; FERNANDES, A. S.; RIJO, P.; CAMPOS, P. M.; RODRIGUES, L. M. Evaluation of the sensory properties of a cosmetic formulation containing gree coffee oil. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v.10, p. 101-108, 2013.

WIEDEMANN, J. KAUFHOLD, A.; SYMRISE AG. **Ethanol-Free perfume oil microemulsion**. US Pat. 2012101020 (A1). abr. 2012.

WOOD, J. H. Reologia Farmacêutica. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. (Org.) **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Fundação Calouste Gulbekian, Lisboa, 2001. Cap. 06.

ZANETI-RAMOS, B. G.; CRECZYNSKI-PASA. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89(2), p. 95-10, 2008.

ZHANG, Z. FRIBERG, S. E.; AIKENS, P.A. Change of amphiphilic association structure during evaporation from emulsions in surfactant-fragrance-water systems. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22(3) p. 181-199, 2000a.

ZHANG, Z.; DENIER, T. FRIBERG, S. E.; AIKENS, P.A. Phase diagram and emulsion stability of surfactant-fragrance systems. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22(3) p. 181-199, 2000b.