



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JAMILLE LAUANNE FELINTO BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS
DIRECIONADAS À APLICAÇÃO IONTOFORÉTICA DE CAFEÍNA EM
PROCEDIMENTOS ESTÉTICOS**

Recife - PE - Brasil

2022

JAMILLE LAUANNE FELINTO BORGES

**DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES NANOTECNOLÓGICAS
DIRECIONADAS À APLICAÇÃO IONTOFORÉTICA DE CAFEÍNA EM
PROCEDIMENTOS ESTÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Disciplina de TCC2 como parte dos requisitos para conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco. Orientador: Prof^a. Dr^a. Danielle Cristine Almeida de Santana.

Recife - PE - Brasil

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Borges, Jamille Lauanne Felinto .

Desenvolvimento de formulações nanotecnológicas direcionadas à aplicação iontoforética de cafeína em procedimentos estéticos / Jamille Lauanne Felinto Borges. - Recife, 2022.

64 : il., tab.

Orientador(a): Danielle Cristine Almeida de Santana
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

1. Cafeína. 2. Permeação. 3. Nanosuspensão . 4. Microemulsão. 5. Iontoforese . I. Santana, Danielle Cristine Almeida de . (Orientação). II. Título.

540 CDD (22.ed.)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA



Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente



DANIELLE CRISTINE ALMEIDA SILVA DE SANTANA
Data: 17/11/2022 08:42:50-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Profa. Dra. Danielle Cristine Almeida de Santana
(Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Documento assinado digitalmente



ANNA CAROLINA TEIXEIRA MESQUITA
Data: 16/11/2022 22:41:14-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Anna Carolina Teixeira Mesquita Batista
(Examinadora)
Faculdade Pernambucana de Saúde

Documento assinado digitalmente



KAROLINE BELEM SEIXAS
Data: 08/11/2022 19:53:52-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Ma. Karoline Belém Seixas
(Examinadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Marie Claire Carneiro Albuquerque
(Suplente)
Universidade Federal de Pernambuco

DEDICATÓRIA

A minha mãe, por todo o incentivo e apoio, pela dedicação de parte da sua vida a mim, por nunca ter me deixado faltar amor, carinho e educação. Te dedico essa conquista como forma de demonstrar a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida e por guiar minha família;

À minha mãe, Maria José Borges, meu alicerce, pelo amor incondicional, pelos ensinamentos e sermões que me fizeram chegar até aqui;

À minha irmã, Joyce Borges, pelos momentos de descontração, por todo o apoio e amor, agradeço a Deus todos os dias pela sua existência;

À minha avó, Expedita Paixão, por representar a luta e a força da mulher sertaneja, por ser exemplo de humildade, disciplina e referência de base familiar e de ser humano;

Às mulheres da minha família que se formaram no ensino superior, Santana Borges, Sanmiris Borges e Joyce Borges, por abrirem as portas, acreditarem em mim, e principalmente, na educação como forma de transformação;

Ao meu pai, José Felinto, pelo apoio em especial no começo do curso, o senhor sempre estará no meu coração;

À Paulo Roberto, pelo suporte no final dessa trajetória;

A minha orientadora, Danielle Santana, pela grande oportunidade, pela orientação, ensinamentos e por todo esforço para que esse trabalho fosse concluído;

A Fernando Malagueño pelas contribuições, conhecimentos compartilhados e auxílio nos experimentos;

A Marie Claire pela disponibilidade, pela disposição a me ajudar no que fosse preciso e por todo conhecimento compartilhado, serei eternamente grata por sua ajuda;

A Pámina Rafaela, por me acolher tão bem no começo dessa jornada, pelos ensinamentos e pela ajuda sempre que precisei;

A Carla Cauanny por compartilhar essa jornada final comigo, pela atenção e pelas palavras de conforto;

A Tarcyana Barros e todos os funcionários da Farmácia Definitiva, por me acolherem durante o estágio e por me ajudarem em momentos cruciais;

Aos meus amigos do grupo “Acoplamento”, pelo suporte, cuidado, parceria e por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Com certeza vocês fizeram os meus dias de graduação mais felizes e muitas vezes me ajudaram a passar pelas adversidades simplesmente pelo fato de estarem ali. Muito obrigada;

Aos meus amigos do grupo “Donos do RU” pelo companheirismo principalmente no começo do curso, desejo a vocês uma imensa prosperidade nos seus caminhos futuros;

As minhas amigas de vida, Ana Reis e Letícia Leão, pela amizade de tantos anos, por estarem ao meu lado, por fazerem os meus dias mais leves e divertidos. Por compartilharem a vida comigo e sempre acreditarem na minha capacidade;

Aos meus amigos Eduarda Lins, Gabriel Pacheco, Gabrielly Soares e Matheus Felipe, pela amizade sincera, pelos momentos únicos, por estarem comigo nos momentos alegres e nos difíceis também. Com toda a certeza eu não teria chegado tão longe sem vocês ao meu lado;

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, seja através de ações, disponibilidade ou apenas palavras de conforto e coragem. Esse trabalho carrega um pouco de cada um de vocês e eu serei eternamente grata.

*Toda caminhada começa no primeiro passo,
a natureza não tem pressa segue seu
compasso, inexoravelmente chega lá.*

Accioly Neto

RESUMO

O crescimento progressivo do mercado da beleza tem sido vigorosamente observado nas últimas décadas, frequentemente a sociedade procura novos métodos para obter melhores resultados estéticos. A cafeína é um alcaloide usado em diversos cosméticos devido aos seus notáveis benefícios proporcionados à pele e aos cabelos, porém devido às suas propriedades físico-químicas, não possui as características necessárias de um penetrante ideal. Diferentes recursos podem ser usados com a finalidade de melhorar a absorção de princípios ativos na pele, dentre eles, evidencia-se o uso de sistemas micro e nanoestruturados e da iontoforese. A estruturação da substância ativa em escalas nanométricas traz como vantagens a melhora na estabilidade e a alta capacidade de carregamento do fármaco. A iontoforese trata-se de uma técnica não invasiva que usa corrente elétrica com o propósito de aumentar a absorção de substâncias através de membranas biológicas. É notável a escassez de estudos que envolvem a utilização da cafeína juntamente com a iontoforese, dessa forma, o objetivo desse estudo piloto foi desenvolver formulações nanotecnológicas preliminares direcionadas à aplicação iontoforética de cafeína em procedimentos estéticos. Para isso, foram preparadas microemulsões, com álcool benzílico e carbonato de propileno, com a finalidade de obter nanosuspensões com 3% de cafeína, foi investigado solventes extratores para posterior *tape stripping* e obtido condições cromatográficas e curvas de calibração a fim de quantificar a cafeína em estudos subsequentes. Como resultados, foi obtido microemulsões com tamanho de partícula e índice de polidispersividade inferiores a 37,41 nm e 0,225, respectivamente. A nanosuspensão com melhor característica físico-química obteve tamanho de partícula de 147,0 e PDI de 0,177. As curvas de calibração preparadas tiveram valores de R^2 superiores a 0,99 e foi estabelecido como líquido extrator, visando futuro *tape stripping*, água e metanol na proporção 60:40. Dessa forma, é possível concluir que condições experimentais otimizadas foram estabelecidas a fim de promover o posterior uso da cafeína por meio de iontoforese. Fazendo com que a elaboração dessa pesquisa proporcione maior conhecimento nessa área e possibilite o oferecimento de mais tratamentos eficazes envolvendo a cafeína.

Palavras-chave: cafeína; permeação; nanosuspensão; microemulsão; iontoforese

ABSTRACT

The progressive growth of the beauty market has been vigorously observed in recent decades, society often looks for new methods to obtain better aesthetic results. Caffeine is an alkaloid used in several cosmetics due to its remarkable benefits provided to the skin and hair, but due to its physicochemical properties, it does not have the necessary characteristics of an ideal penetrant. Different resources can be used in order to improve the absorption of active principles in the skin, among them, the use of micro and nanostructured systems and iontophoresis is evident. The structuring of the active substance at nanometer scales has the advantages of improved stability and high drug carrying capacity. Iontophoresis is a non-invasive technique that uses electrical current to increase the absorption of substances through biological membranes. The scarcity of studies involving the use of caffeine together with iontophoresis is remarkable, so the objective of this pilot study was to develop preliminary nanotechnological formulations aimed at the iontophoretic application of caffeine in aesthetic procedures. For this, microemulsions, with benzyl alcohol and propylene carbonate, were prepared in order to obtain nanosuspensions with 3% caffeine, extracting solvents were investigated for subsequent tape stripping and chromatographic conditions and calibration curves were obtained in order to quantify caffeine in subsequent studies. As a result, microemulsions with particle size and polydispersity index lower than 37.41 nm and 0.225, respectively, were obtained. The nanosuspension with the best physicochemical characteristics had a particle size of 147.0 and a PDI of 0.177. The calibration curves prepared had R^2 values greater than 0.99 and it was established as extracting liquid, aiming at future tape stripping, water and methanol in a 60:40 ratio. Thus, it is possible to conclude that optimized experimental conditions were established in order to promote the further use of caffeine through iontophoresis. Making the elaboration of this research provide greater knowledge in this area and make it possible to offer more effective treatments involving caffeine.

Keywords: caffeine; permeation; nanosuspension; microemulsion; iontophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática da pele	19
Figura 2. Organização das células na hipoderme do homem e da mulher.....	22
Figura 3. Estrutura da pele normal e com celulite	23
Figura 4. Estrutura química da cafeína.....	24
Figura 5. Representação esquemática da pele mostrando as diferentes rotas possíveis de penetração	27
Figura 6. Esquema da câmara de difusão tipo Franz	28
Figura 7. Remoção de uma camada de estrato córneo com fita adesiva.....	29
Figura 8. Representação esquemática da organização das microemulsões.....	31
Figura 9. Iontoforese utilizando sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D + e seu contra íon A- e Na+Cl-	36
Figura 10. Microemulsões finalizadas	44
Figura 11. Nanosuspensões finalizadas.....	47
Figura 12. Imagem das nanosuspensões em seu ponto de turvação	49
Figura 13. Curva analítica da cafeína em (1) tampão fosfato 0,1 M e (2) Metanol e água (60:40 v/v), obtida por cromatografia líquida de alta eficiência.....	50
Figura 14. Cromatógrafo das extrações realizadas nos estudos de tape stripping utilizando água (A) e metanol e água nas proporções de 50:50 (B), 60:40 (C), 70:30 (D), respectivamente	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição das microemulsões selecionadas para esse estudo	41
Tabela 2. Características físico-químicas das microemulsões.....	45
Tabela 3. Características físico-químicas das nanosuspensões.....	47
Tabela 4. Quantidade de água acrescida para chegar ao ponto de turvação.....	48
Tabela 5. Características físico-químicas das nanosuspensões em seu ponto de turvação	49

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água/Óleo
CFF	Conselho Federal De Farmácia
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência
DDP	Diferença de potencial
D3	7-dehidrocolesterol
EC	Estrato córneo
HPLC	High-performance liquid chromatography
H2O	Água
ME	Microemulsão
MENS	Micro Electro Neuro Stimulation
MeOH	Metanol
O/A	Óleo/Água
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde

PDI	Índice de polidispersividade
PVA	Acetato de Polivinila
PVDF	Fluoreto de polivinilideno]
DC	Resolução da Diretoria Colegiada
RF	Radiofrequência
UV	Ultravioleta
UVB	Ultravioleta B

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca Registrada
rpm	Rotações por minuto
mg	Miligramas
mL	Mililitros
M	Molar
v/v	Volume/ volume
µL	Microlitros
%	Porcentagem
µm	Micrômetro
g	grama
nm	Nanômetros
R ²	Coefficiente de correlação
LogP	Coefficiente de partição
Hz	Hertz
GHz	Gigahertz
KHz	<i>Quilo-Hertz</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Estética	17
2.2 Pele humana	18
2.3 Lipodistrofia Ginóide e Adiposidade Localizada	21
2.4 Cafeína	24
2.5 Permeação Cutânea	26
2.6 Microemulsão	30
2.7 Nanosuspensão	32
2.8 Eletroterapia	33
2.9 Iontoforese	35
3. OBJETIVOS	39
3.1 Geral	39
3.2 Específico	39
4. METODOLOGIA	40
4.1 Materiais	40
4.2 Obtenção das microemulsões	40
4.3 Obtenção das nanosuspensões	41
4.4 Caracterização das microemulsões e nanosuspensões	41
4.4.1 Determinação do pH	41
4.4.2 Teste de estabilidade frente à centrifugação	41
4.5 Seleção do líquido extrator utilizado no procedimento de <i>tape stripping</i>	42

4.6 Condições cromatográficas e metodologia analítica para quantificação de cafeína (por CLAE)	42
4.6.1 Obtenção da curva de calibração para quantificação da cafeína no fluido receptor	42
4.6.2 Obtenção da curva de calibração para quantificação da cafeína na pele de orelha de porco	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1 Características das microemulsões	44
5.2 Caracterização das nanosuspensões adicionadas de 2 mL de água	46
5.3 Caracterização das nanosuspensões considerando o ponto de turvação	48
5.4 Padronização da metodologia analítica	50
5.5 Seleção do solvente extrator utilizado nos estudos de <i>tape stripping</i>	50
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

A evolução do mercado de beleza e dos cuidados pessoais tem sido constante no Brasil e no resto do mundo. A sociedade atual tem recorrido a métodos e técnicas com uma expectativa cada vez maior de bons resultados. Isso tem levado a uma verdadeira revolução na estética e na indústria cosmética, assim como na pesquisa e na introdução de novos conceitos que, quando corretamente interpretados e aplicados, podem proporcionar resultados que atendam a necessidade da população.

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal Perfumaria e Cosméticos, o Brasil é o quarto maior mercado consumidor global de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, com 6,2% de fatia de mercado e um total de U\$D 30 bilhões em vendas ao consumidor no ano de 2018, segundo estudo do Euromonitor. O País fica atrás somente dos EUA, China e Japão (ABIHPEC, 2019).

A estética é uma área que vem passando por constantes mudanças sendo que, na antiguidade, servia apenas como adorno e beleza e hoje, aliada à cosmética, é também considerada como questão de saúde e bem-estar. O cuidado com o corpo deixou de ser considerado desnecessário e se tornou uma questão de saúde, onde promove empregos, aumentando a renda do país, e elevando a autoestima (ABIHPEC, 2010).

O farmacêutico é um profissional que pode atuar em mais de 70 diferentes áreas, e em 2013, através da Resolução no 573 do Conselho Federal de Farmácia (CFF), a estética passou a fazer parte das atribuições clínicas destes profissionais. O farmacêutico esteta é um profissional que dispõe de um amplo conhecimento nas ciências biológicas, cosmetologia, dermatologia, estética, clínica, terapêutica e administração dentro de um estabelecimento estético (CAMPOS et al., 2020).

O desenvolvimento da estética e da indústria cosmética está baseado no conhecimento das funções e estruturas da pele. Uma das principais funções da pele é a proteção do organismo, por apresentar-se como uma barreira funcional, limitando a penetração de substâncias exógenas presentes no ambiente. A propriedade da barreira baseia-se no conteúdo específico e na composição do lipídios do estrato

córneo e, em particular, a exceção arranjo estrutural da matriz lipídica intercelular e o envelope lipídico que envolve as células. Os lipídios formam bicamadas ao redor dos corneócitos, produzindo uma modelo “tijolo e argamassa” com os corneócitos como tijolos e os lipídios intercelulares que fornecem a argamassa. Os lipídios intercelulares são principalmente ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol. Na absorção de ativos na pele, o estrato córneo vem sendo considerado como a maior barreira para este processo, dificultando a difusão das substâncias (MOSER et al., 2001; ALVES, 2015).

A cafeína é um ingrediente popular e eficaz em cosméticos devido às suas inúmeras propriedades benéficas. O espectro de aplicação no campo da cosmetologia e dermatologia está se tornando cada vez mais amplo. É usado com sucesso, por exemplo, no tratamento da celulite, na estimulação do crescimento do cabelo e na prevenção de danos à pele causados por queimaduras solares (BORS et al., 2018). Essa substância não possui os atributos de um penetrante ideal da epiderme, dessa forma, para que a molécula penetre na pele, é importante que seja associada a outras técnicas.

A absorção de uma substância ativa através da pele pode ser modulada utilizando-se diferentes estratégias, como o uso de promotores da absorção, pró-fármacos, transportes coloidais e microdermoabrasão. Em meio a tantas estratégias merece destaque o uso de sistemas micro e nanoestruturados e os métodos ativos físicos, como a iontoforese (SOARES et al., 2015).

Dentre os sistemas micro e nanoestruturados, evidenciam-se as microemulsões e as nanosuspensões. As microemulsões são dispersões isotrópicas, transparentes, termodinamicamente estáveis, usualmente formadas por misturas de quatro componentes, água, óleo, tensoativo e cotensoativo. Apresentam grande potencial como sistemas de liberação e de direcionamento de fármacos devido às suas propriedades de solubilizar compostos hidrofílicos em meio lipofílico ou lipofílicos em meio aquoso e anfifílicos na interface óleo/água. Em razão de sua alta proporção de substâncias tensoativas, as microemulsões podem interagir com o estrato córneo desestruturando a bicamada lipídica do mesmo, a permeabilidade cutânea é aumentada e a penetração de substâncias, que normalmente não passariam através dessa barreira. (CARVALHO, 2012). Já as nanosuspensões consistem na dispersão

de partículas coloidais sólidas muito finas que são de natureza bifásica, em um veículo aquoso e estabilizado através de tensoativos. Esses sistemas são de fácil obtenção e apresentam diversas vantagens frente a outras técnicas (GOEL et al., 2019).

Diante da vasta extensão de promotores físicos existentes, a iontoforese apresenta grande destaque. Trata-se de uma técnica não invasiva que utiliza a corrente elétrica para prover uma maneira controlada de aumentar a transferência de uma variedade de substâncias através das membranas biológicas. Seu uso é vantajoso devido à perspectiva do aumento de liberação de substâncias ionizáveis quando comparada à absorção percutânea passiva. Na iontoforese, além da difusão passiva, a penetração da substância é aumentada pelos mecanismos de eletrorrepulsão, eletroosmose e aumento da permeabilidade da pele (OLIVEIRA et al., 2005).

A estética como área de atuação do farmacêutico vem ganhando espaço. Diversos protocolos para o uso da cafeína são utilizados rotineiramente apesar das escassas informações encontradas na literatura para fundamentá-los. Apesar da sua ampla e contínua utilização, seu uso, com frequência, ainda leva em conta apenas a prática diária, fundamentada em conhecimentos empíricos. Diante da carência de embasamento técnico-científico relacionando o uso da iontoforese para a melhoria da absorção cutânea da cafeína, e, levando em conta que a capacidade da cafeína de penetrar na pele é essencial quando se discute seu uso na estética, o presente estudo buscou desenvolver formulações nanotecnológicas direcionadas a uma futura aplicação iontoforética em procedimentos estéticos devido a necessidade de estabelecer parâmetros cientificamente válidos para a fundamentação de protocolos usados cotidianamente em clínicas de estética.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estética

A palavra estética surgiu na antiga Grécia, com o significado de percepção, sensação. O conceito de estética está ligado ao estudo da natureza do belo e dos fundamentos da arte. Estuda o julgamento e a percepção do que é considerado belo, a produção das emoções pelos fenômenos estéticos, bem como as diferentes formas de arte e da técnica artística (BAYER, 1995).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define saúde não apenas como a ausência de doença, mas como a situação de perfeito bem-estar físico, mental e social (SEGRE et al., 1997). A partir do momento em que o conceito de saúde superou a simples definição de ausência de doenças, o termo qualidade de vida tornou-se interesse de estudos na área da saúde, estética e bem-estar em geral. Qualidade de vida compreende a felicidade e satisfação geral do indivíduo com a sua vida, abordando os aspectos emocionais, psicológicos, funcionais e espirituais do bem-estar, ou seja, a qualidade de vida relaciona-se aos aspectos globais da saúde como: ambiente e condições de vida, ou seja, é uma noção subjetiva de satisfação com a vida e não apenas algo biológico (CARVALHO et al., 2020).

Diante dessa nova perspectiva de saúde, a área da estética vem ganhando força e, por isso, atualmente a área da saúde engloba também a área da estética. Um dos mercados mais promissores no Brasil é a cosmética e beleza, de 2014 a 2019, o mercado de estética brasileiro cresceu 567% segundo os dados da ABIHPEC, este levantamento mostra também que nesses cinco anos o número de profissionais com a especialidade na área aumentou de 72 mil para mais de 480 mil. (ABIHPEC, 2021)

Devido a esse crescimento, nota-se o aumento da atuação do farmacêutico nesta área, hoje, a estética corresponde a área da saúde voltada à promoção, proteção, manutenção e recuperação estética do indivíduo, de forma a selecionar e aplicar procedimentos e recursos estéticos, utilizando-se para isto produtos cosméticos, técnicas e equipamentos específicos, de acordo com as características e necessidades do cliente, dessa forma, nota-se que a estética relaciona-se estreitamente com as atribuições do farmacêutico (RDC Nº 573, 2013).

No Brasil, a Resolução N° 573 de 22 de maio de 2013 do CFF regulamenta o exercício da atividade estética pelo profissional habilitado em Farmácia. Além disso, o referido Conselho elaborou e aprovou duas novas resoluções: a 616/2015 que atribui ao Farmacêutico a atuação no âmbito da estética passando a ampliar suas técnicas nesta área de atuação assim como, os recursos terapêuticos utilizados por esse profissional e a 645/2017, ampliando o rol de atividades, legitimando e dando força total para a nova profissão. O farmacêutico é um profissional capacitado para compreender o funcionamento do organismo humano e identificar as necessidades de cada paciente, inclusive estéticas (COSTA, 2022).

A profissão vai conquistando seu espaço e por isso, os principais pilares de sustentação do seu trabalho consiste em uma boa avaliação, acompanhado de uma anamnese completa e bem direcionada, como também, na oferta de protocolos estéticos personalizados. Os protocolos estéticos consistem no estabelecimento de uma série de procedimentos a serem seguidos de forma a melhor conduzir a terapêutica para cada insatisfação estética apresentada. São estabelecidos critérios para o diagnóstico, tratamento e avaliação dos resultados, de maneira que se crie mecanismos que garantam o sucesso e a segurança do tratamento.

2.2 Pele humana

A pele constitui o invólucro externo do organismo, transformando-se em mucosa para revestir os orifícios dos sistemas respiratório, digestivo e urogenital. Adicionada aos pelos, unhas e glândulas sudoríparas e sebáceas constituem o sistema tegumentar, que desempenha importante papel na manutenção da homeostase e da atividade celular. Ela representa mais de 15% do peso corpóreo e têm grandes variações ao longo de sua extensão, sendo ora mais flexível e elástica, ora mais rígida (SANTANA, 2004). A pele é considerada o maior órgão do corpo humano em peso e área de superfície. Esta área pode variar aproximadamente de 1,7m² a 2,0m² em indivíduos adultos, diante da sua extensão observa-se também uma oscilação do pH, que varia entre 5,5 a 7,0. É a maior interface entre o meio ambiente e o corpo humano, sendo exposta intensamente a variações como: temperatura, umidade, luz solar e xenobióticos. (ALVES, 2015)

A pele possui diversas funções importantes como, por exemplo, a de barreira epidérmica que confere proteção contra microrganismos, substâncias

químicas, traumatismos físicos e ressecamento por perda transepidérmica de água. É um dos principais locais de interação com o meio ambiente e muitos tipos de estímulo são processados pelos sistemas nervoso central e periférico. Também ajuda a regular e manter a temperatura central do corpo por meio da regulação do suor e variação do fluxo sanguíneo na pele. Bem como atua na proteção contra os raios ultravioleta (UV), devido a presença de melanócitos que produzem melanina, um polímero pigmento que absorve a faixa UV do espectro luminoso. Além disso é responsável pela produção de precursores da vitamina D, com a exposição à luz UV, a provitamina D3 (7-deidrocolesterol) existente na epiderme é convertida em pré-vitamina D que se converte em vitamina D3, a vitamina D3 é convertida para sua forma metabolicamente ativa no fígado e nos rins. Este órgão possui também importante papel nas respostas imunológicas, pois as células epiteliais na interface entre a pele e o meio ambiente representam a primeira linha de defesa via sistema imune inato. (BOHJANEN, 2017)

Na anatomia cutânea, a pele se divide em duas camadas principais: a porção de tecido epitelial chamada epiderme, mais externa, e a derme, composta de tecido conjuntivo, logo abaixo. Mais profundamente, é possível observar a hipoderme ou tela subcutânea, constituída de células adiposas, como mostrado na figura 1. (HARRIS, 2005)

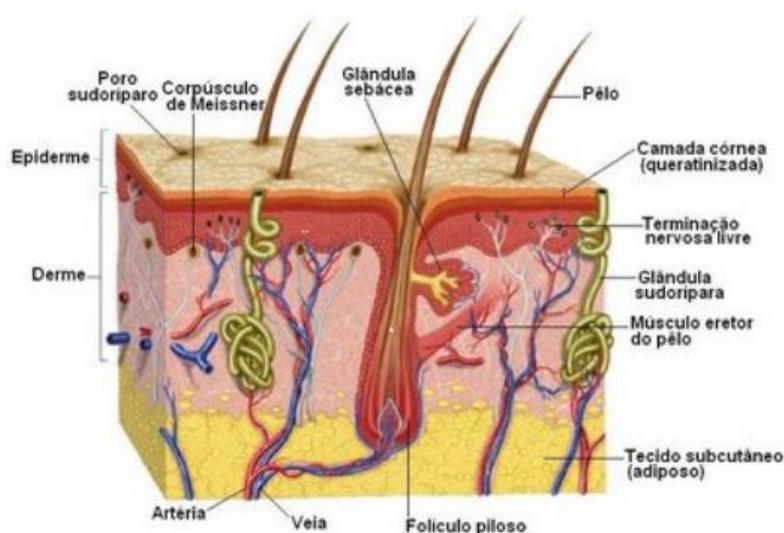


Figura 1. Representação esquemática da pele. Fonte: Oliveira (2009).

A epiderme possui origem embrionária ectodérmica, é um epitélio pavimentoso estratificado queratinizado, avascular, constituído por queratinócitos, que são caracterizados por serem células achatadas e justapostas. Suas camadas

começam da mais interna para a mais externa, a mais interna é denominada como epitélio germinativo e tem como características serem células que se multiplicam constantemente, fazendo com que células mais velhas sejam empurradas para cima em direção a superfície, garantindo assim, uma renovação constante. À medida que se tornam mais envelhecidas as células passam a ser mais achatadas, anucleadas e fabricam dentro de si uma proteína bastante resistente e de baixa permeabilidade, a queratina. Da região mais profunda para a mais superficial encontramos as seguintes camadas: basal, espinhosa, granulosa, que constituem a epiderme viável, e o estrato córneo (SANTOS et.al., 2015). A camada córnea, considerada a mais externa da epiderme, possui cerca de quinze a vinte micrômetros de espessura e é formada de queratinócitos embebidos em uma matriz lipídica composta principalmente por colesterol, ácidos graxos e ceramidas, sendo uma camada que possui baixa permeabilidade, visto que a estrutura é altamente ordenada pelos queratinócitos e pelas suas camadas lipídicas. Os queratinócitos, chamados também de corneócitos quando se encontram na camada córnea, transformam-se em células sem núcleos, achatadas e mortas, que conferem a propriedade de barreira da pele (DE JESUS et al., 2006).

A derme é considerada um tecido firme e elástico, favorece a resistência física ao corpo diante de uma agressão mecânica, promove sustentação e oferece nutrientes à epiderme, também acomoda anexos cutâneos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, além de células de origem conjuntiva e sanguínea (DE LIMA et al., 2015). Sua origem embrionária é do mesoderma e, histologicamente, é formada de tecido conjuntivo propriamente dito. Sobretudo, essa camada é constituída por células denominadas fibroblastos (responsáveis pela produção de fibras de colágeno e elastina), por enzimas como colagenase e estromelina, bem como de matriz extracelular. Outras células diferenciadas que compõem a derme são os macrófagos, os linfócitos e os mastócitos, que desempenham a defesa imunológica dessa estrutura intermediária. A derme é composta por uma grande quantidade de vasos sanguíneos e linfáticos, de estruturas nervosas sensoriais e de musculatura lisa. Classicamente é dividida em duas camadas: a camada superficial, ou papilar, formada por tecido conjuntivo propriamente dito do tipo frouxo e localizada imediatamente abaixo da epiderme; e a camada reticular, ou profunda, composta de tecido conjuntivo propriamente dito do tipo denso não modelado e situada profundamente em relação à

camada papilar (BORGES, 2016). Entre a epiderme e a derme, está presente a lâmina dermo-epidérmica, a qual permite que essas duas camadas estejam ancoradas, é sintetizada pela camada basal e tem como função ser uma barreira e filtro de nutrientes entre as camadas (BERNARDO et al., 2019).

A Hipoderme ou tela subcutânea é a camada mais profunda da pele, é composta por adipócitos e fibras colágenas que se conectam aos músculos e aos ossos, possui espessura variável, formando uma barreira protetora contra traumas, variações térmicas e armazenamento de gordura. Ela promove a sustentação da epiderme e derme e as une aos órgãos, desempenha um papel importante no armazenamento da maior parte da vitamina D produzida pelo organismo, funcionando como depósito nutritivo e reserva de energia para o organismo (ZYCHAR et al., 2016; BABO, 2021).

2.3 Lipodistrofia Ginóide e Adiposidade Localizada

A adiposidade localizada, também conhecida como lipodistrofia localizada, é definida como o aumento no diâmetro dos adipócitos acumulados em um local específico do corpo. Sua distribuição é classificada de acordo com a localização anatômica, sendo: andróide/central, com acúmulo de gordura predominante na região do abdômen e é mais comum em homens; ginóide/ periférica, com acúmulo predominante na parte inferior do corpo, como coxas e quadris, mais comum em mulheres; e mista, quando ocorre a associação dos dois tipos e/ou a gordura é distribuída de modo indeterminado pelo corpo (SAVEGNAGO, 2019).

Quando a gordura estocada se torna localizada, devido ao aumento da ingestão em relação ao gasto calórico se torna resistente ao emagrecimento. O padrão de distribuição é hereditário e mantém características familiares. É possível identificar dois tipos de depósito de gordura: os depósitos gerais (mobilizam-se facilmente) e o depósito hereditário (resistente ao emagrecimento). Não é uma questão de peso corporal e sim da distribuição da gordura que apresenta um metabolismo lipídico alterado (MELLO et al., 2012).

A gordura localizada, no entanto, é uma patologia do tecido gorduroso, em que a gordura se acumula em locais determinados mais que em outros locais. A má formação das células adiposas na infância é o principal motivo para a formação da

adiposidade, mas entre esses fatores, destaca-se entre os principais predisponentes: genética, idade, sexo e desequilíbrio hormonal. Entre os fatores determinantes, os quais podem agravar os predisponentes, pode citar o estresse, o fumo, sedentarismo, maus hábitos alimentares e disfunções no organismo geral (COSTA et al., 2013).

A lipodistrofia ginóide, vulgarmente conhecida por celulite, está presente quando existem alterações subcutâneas, que são visíveis na pele. Dessa forma, a pele deixa de ser lisa e apresenta ondulações que são conhecidas como pele “casca de laranja”. Tal condição afeta principalmente as mulheres, cerca de 85% das mulheres após a puberdade têm celulite, localizadas principalmente nas coxas e nádegas, mas podem ser encontradas em qualquer parte do corpo que tenha tecido adiposo subcutâneo (RIBEIRO, 2013).

A etiologia da celulite é desconhecida, mas uma variedade de causas parece contribuir para seu desenvolvimento, incluindo fatores estruturais, circulatórios, hormonais e inflamatórios (AFONSO, 2010). A predisposição para o seu aparecimento são diversos, entre eles estão: fatores genéticos, sexo, idade, desequilíbrios hormonais, hábitos de vida, perturbações metabólicas, disfunções hepáticas e perturbações hemodinâmicas (KRUPEK et al., 2012).

Nas mulheres, os septos fibrosos de tecido conjuntivo, que segregam a gordura nos canais, estão orientados longitudinalmente, da fáscia muscular até a derme. À medida que a camada de gordura se expande, ela é projetada superficialmente, criando a aparência não uniforme da pele. Nos homens, o entrecruzamento padrão do tecido conjuntivo nas coxas e glúteos que mantém a camada de gordura, evita a projeção do tecido adiposo na superfície da pele, como visto na figura 2 (TORRES et al., 2017).

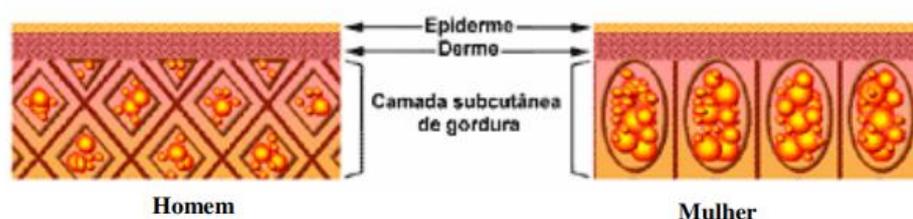


Figura 2. Organização das células na hipoderme do homem e da mulher.
Fonte: MORAIS, 2006.

A lipodistrofia, que traduz o aumento da espessura da camada subcutânea de gordura, pode ser descrita pela associação da hipertrofia e da hiperplasia dos adipócitos. A hipertrofia é caracterizada pelo aumento do volume das células adiposas, enquanto a hiperplasia refere-se ao aumento do número dessas mesmas células. Os adipócitos normalmente ficam carregados de gordura sob a forma de triglicerídeos que liberam essa reserva lipídica de acordo com as necessidades metabólicas do organismo. Uma disfunção desse processo pode ocasionar o excesso de triglicerídeos, provocando acúmulo anormal de massa adipocitária, “depósitos de gordura localmente concentrados” ou “depósitos de gordura localizada”. Se estes depósitos comprimem o tecido circundante, a microcirculação venosa e linfática pode diminuir, juntamente com as macromoléculas envolvidas no transporte linfático (figura 3) (MORAIS, 2006).



Figura 3. Estrutura da pele normal e com celulite. Fonte: MORAIS, 2006

Os estágios da lipodistrofia ginóide podem ser classificados em quatro tipos, do grau I ao IV. O grau I é assintomático e as irregularidades cutâneas são observadas apenas com a pressão do tecido ou com a contração muscular. Inicia-se a retenção de fluidos e, em razão ao armazenamento de lipídeos, os adipócitos começam a aumentar seu volume. No grau II observam-se pequenas alterações na superfície cutânea quando o indivíduo está na posição ortostática e sem pressão do tecido. Há comprometimento do fluxo sanguíneo em alguns locais e diminuição na elasticidade da pele. Não há alteração na sensibilidade à dor. No grau III predomina a aparência de “casca de laranja”. Há redução da temperatura no local, alteração na sensibilidade e dor à palpação. No grau IV há presença de nódulos maiores palpáveis e dolorosos, pele com aparência de “saco de nozes” com formação de depressões bem mais profundas, pele flácida e enrugada em alguns pontos e em outros,

compacta. Há fibrose do tecido com comprometimento nervoso (TORRES et al., 2017).

A lipodistrofia ginóide e a lipodistrofia localizada possuem impacto não só na estética, mas também na qualidade de vida. Graus avançados da celulite, por exemplo, podem levar a quadros de dor e alterações das atividades funcionais, na lipodistrofia localizada o acúmulo de gordura provoca uma excessiva polimerização dos mucopolissacarídeos, conseqüentemente, um aumento da retenção de água, sódio e de potássio provocando uma pressão no interstício aumentando a compressão de veias e vasos linfáticos, o que leva à degeneração de fibras elásticas, proliferação das fibras colágenas, hipertrofia dos adipócitos e edema, além de causar prejuízos psicológicos e à uma desagradável aparência da pele (TORRES et al., 2017; LEITE et al., 2017). Dessa maneira, nota-se a procura de substâncias ativas que podem ser usadas no tratamento de celulite e da gordura localizada. Nesse cenário, a cafeína, que atua sob o tecido adiposo promovendo a lipólise dos adipócitos.

2.4 Cafeína

A cafeína é um composto químico hidrofílico de fórmula $C_8H_{10}N_4O_2$, classificado como alcaloide do grupo das xantinas e designado quimicamente como 1,3,7-trimetilxantina (figura 4). Este alcaloide é encontrado em grande quantidade nas sementes de café e nas folhas de chá verde. Também pode ser achado em outros produtos vegetais, particularmente no cacau, no guaraná e na erva-mate. Grande parte da população ingere a cafeína de outras formas como, por exemplo, em bebidas energéticas, suplementos alimentares e medicamentos antigripais (DE MARIA et al., 2007).

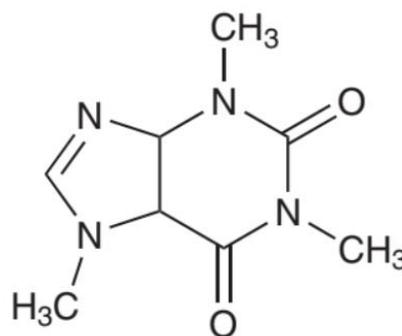


Figura 4. Estrutura química da cafeína. Fonte: Tassinari, 2011

A cafeína proporciona ação farmacológica heterógena e sistêmica, acarretando em alterações no sistema nervoso central, no sistema cardiovascular, através do aumento a pressão arterial, e na homeostase de cálcio, como também efeitos descritos no desempenho e comportamento humano, redução da fadiga, aumento da vigília, melhora na performance de atividades físicas, entre outras. Porém, a sua ingestão pode influenciar negativamente o controle motor e o sono, bem como causar desconforto em indivíduos com quadro de ansiedade (MAIA, 2018).

Por via oral, o principal mecanismo de ação da cafeína é através da inibição competitiva dos receptores de adenosina, visto que esse neurotransmissor quando se liga aos seus receptores A1 e A2a provoca a inibição da produção e da neurotransmissão da dopamina. Dessa forma, a cafeína agindo como antagonista a esses receptores de adenosina pode causar um aumento da ligação de neurotransmissores e receptores dopaminérgicos (GOMIDE et al., 2019).

Como princípio ativo dermatológico, devido ao seu forte efeito antioxidante, a cafeína contribui para um aumento de, aproximadamente, 25% de proteção anti-UVB *in vivo* em comparação com a amostra sem cafeína, sendo uma nova alternativa de adjuvante na formulação de filtros solares (ROSADO et al., 2019). No crescimento capilar foi comprovado que o emprego de cafeína de 0,001% e 0,005% levou a uma estimulação significativa do crescimento do folículo capilar humano *in vitro* (FISCHER et al., 2020). Estudos sugerem que a cafeína também estimula a lipólise por meio da inibição da atividade PDE e pelo aumento dos níveis de AMPc nos adipócitos, minimizando a aparência de celulites (TEAIMA, 2017).

Um ensaio *in vitro* obteve resultados positivos relacionados à permeação cutânea da cafeína. Neste estudo foi observado que a formulação com características de cristal líquido de fase hexagonal foi eficaz em aumentar a permeação cutânea à cafeína, facilitando assim sua ação. A cafeína aplicada desta forma fez com que houvesse uma redução significativa da espessura da hipoderme. Portanto, a pesquisa concluiu que o sistema desenvolvido é adequado para uso tópico, atua como promotor de permeação e garante a eficácia da cafeína no tratamento da celulite (LONGO, 2006).

Em um estudo *in vivo* foi avaliado a ação da cafeína e do Cafeisilane® C

após análise histológica em dorso depilado das ratas de linhagem Wistar. Os resultados obtidos mostraram que, quando comparado com o gel controle, tanto a cafeína como o Cafeisilane® C apresentaram melhor resposta quando incorporados em emulsão não iônica, ocorrendo redução no diâmetro das células adiposas em 17% para a cafeína e 16% para o Cafeisilane® C, além disso, ocorreu também a redução de 32% no número de células adiposas caso utilizado preparações com o Cafeisilane® C (TANO, 2003).

Os resultados obtidos por uma pesquisa *in vivo* que analisou índices de lipídios sanguíneos antes e após dez aplicações de ultrassom de 3MHz associado ao gel condutor acrescido de cafeína a 5% em região infra umbilical, mostraram um aumento médio nos níveis de colesterol total em 11,9%, lipoproteínas de baixa densidade em 17,52% e de triglicerídeos em 25,65%. Tais resultados indicam que a aplicação do ultrassom de 3MHz associado ao gel acrescido de cafeína a 5% produziu efeitos de aumento nos níveis de colesterol total e frações dos sujeitos pesquisados, após dez intervenções propostas pela pesquisa (BELONI, 2010).

Devido a sua ação na lipodistrofia ginóide e na gordura localizada, várias formulações contém esse alcaloide como um potencializador da resposta lipolítica. As características físico-químicas, como o peso molecular de 194,2 g/mol, a alta solubilidade em água de 20 mg/ml e o logP de - 0,07 da cafeína, dificulta a transposição da barreira cutânea, o que limita sua permeação cutânea por difusão passiva, dessa forma, para que a cafeína consiga difundir-se pelo estrato córneo e demais camadas da epiderme e exercer seus efeitos biológicos, é necessário associá-la a outros meios terapêuticos (VOGEL et al., 2020; LIS et al., 2019; TEAIMA et al., 2017).

2.5 Permeação Cutânea

As substâncias ativas podem atravessar a pele por três diferentes maneiras, primeiro, pela via intercelular, ocorre uma difusão da substância pela matriz da camada córnea, ou seja, ela passa entre os corneócitos, segundo, pela via transcelular, no qual o princípio ativo passa diretamente pelos corneócitos e pela matriz lipídica atravessando-as de forma direta, e por último, pela via apêndices, no qual a substância é absorvida pelas glândulas sebáceas e sudoríparas, além do folículo piloso (MOSER et al., 2001), essas estruturas são interessantes para

moléculas grandes e polares que não conseguem penetrar na pele através de outras vias, já que essas têm maior dificuldade em cruzar o estrato córneo intacto, que tem um caráter bastante lipofílico. Os apêndices apresentam uma rota paralela, na qual macromoléculas, íons e fármacos polares de baixo peso molecular podem permear, especialmente através dos folículos pilosos. Um esquema representativo dessas vias é mostrado na figura 5 (FERREIRA et al., 2015).

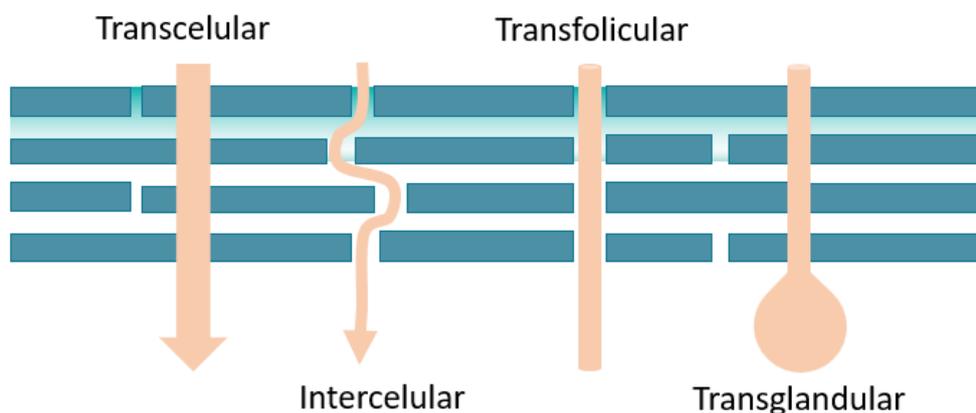


Figura 5. Representação esquemática da pele mostrando as diferentes rotas possíveis de penetração. Fonte: Adaptado de HADGRAFT, 2001

Vários métodos são descritos na literatura para avaliar a permeação cutânea e devido a dificuldade de se realizar experimentos *in vivo*, os métodos alternativos *in vitro* apresentam possibilidades de avaliação que transmitem confiabilidade e reprodutibilidade. Portanto, a escolha de modelos preditivos *in vitro* para a absorção cutânea são importantes uma vez que a correlação *in vitro/in vivo* pode ser estabelecida (SEIXAS et al., 2018).

A OECD nº 428 traz as diretrizes para avaliação da absorção cutânea pelo método *in vitro*, que é realizado com pele excisada (humana ou de outros mamíferos) em células de difusão. A célula de difusão mais usada é a célula de Franz, descrita por Thomas J. Franz em 1975 (FRANZ, 1975). O modelo ideal de biomembrana é a pele humana *ex vivo*, porém, devido à dificuldade de obtenção e às questões éticas, os modelos animais são largamente utilizados, onde a pele de porco apresenta-se como um modelo adequado, devido a sua capacidade preditiva e similaridade com a pele humana (KISHISHITA, 2019), como a espessura da epiderme, a composição lipídica, as características morfológicas e fisiológicas e a permeabilidade da membrana a diversos compostos. (DIAS, 2017)

No modelo de células de difusão tipo Franz (figura 6), após o preparo, o tecido é colocado entre dois compartimentos, denominados de compartimento doador e receptor. O compartimento receptor é preenchido com uma solução, geralmente tamponante, que favorece as condições *sink*, isto é, uma condição de não saturação do sistema dinâmico, possibilitando um fluxo contínuo da substância ativa. No compartimento superior é colocada uma solução ou formulação a ser testada. O fluido receptor é coletado e efetua-se a quantificação da substância. As metodologias para quantificação mais utilizadas são técnicas espectrofotométricas e cromatográficas (ZEN, 2012).

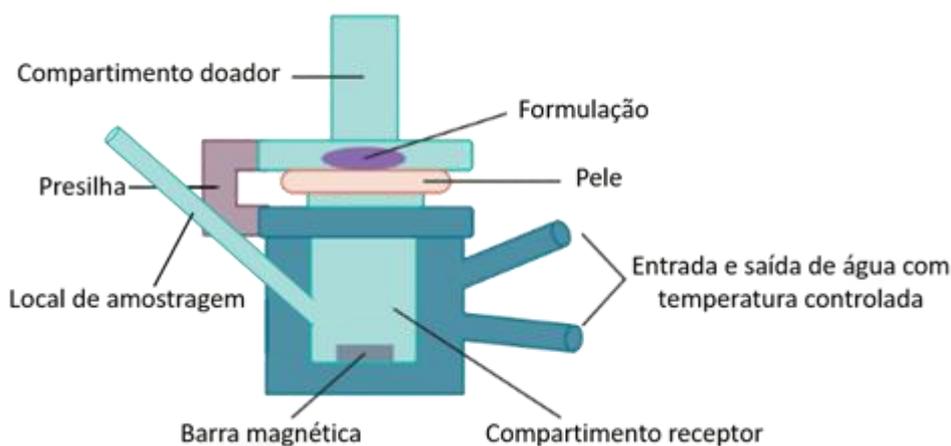


Figura 6. Esquema da câmara de difusão tipo Franz. Fonte: adaptado de Depieri et al., 2015

Ao final do ensaio de absorção cutânea, é possível também quantificar o fármaco remanescente no EC, retirando essa camada de células pela técnica de *tape stripping*, mostrada na figura 7, que consiste na retirada sequencial de camadas do EC com o uso de fitas adesivas adequadas, como ilustrado abaixo: (KISHISHITA, 2019).

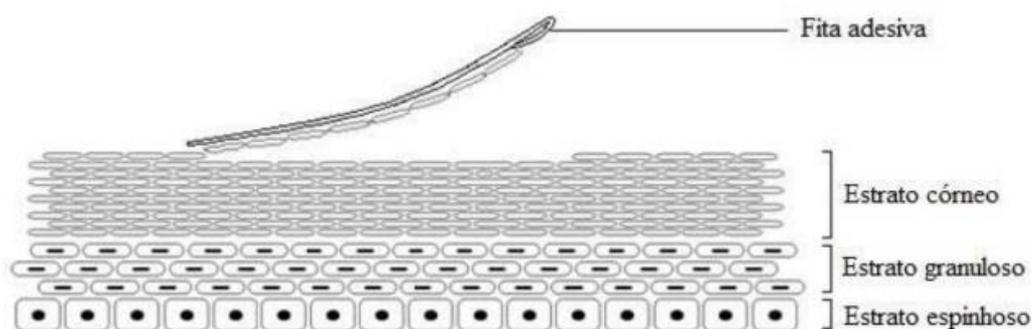


Figura 7. Remoção de uma camada de estrato córneo com fita adesiva.

Fonte: AU, 2010

Embora o tratamento tópico apresente vantagens irrefutáveis, amplamente descritas na literatura, a adequada permeação cutânea de compostos ativos para produzir uma resposta terapêutica ainda é um grande desafio no desenvolvimento de novos medicamentos e cosméticos. O estrato córneo, constituído por uma estrutura lipídica altamente ordenada, age como principal barreira protetora, tanto para evitar a perda excessiva de água quanto para proteger contra agentes externos danosos. Neste sentido, inúmeras substâncias ativas quando veiculadas em formas farmacêuticas convencionais apresentam grande dificuldade de permear até camadas mais profundas da pele, e quando permeiam somente quantidades subterapêuticas são detectadas, fazendo-se necessário o emprego de estratégias que aumentem a permeação cutânea das mesmas (BACCARIN, 2015).

Diversas estratégias para contornar os limites impostos pela baixa permeação de substâncias ativas são descritas na literatura. Promotores físicos e químicos podem ser utilizados, pois interagem continuamente com a pele para promover o fluxo da substância ativa. (ROSA, 2018). Os promotores de absorção são substâncias químicas que se utilizam como excipientes, incorporando-os aos sistemas transdérmicos e tópicos com a finalidade de que estes ajam como alternadores da permeabilidade cutânea de maneira reversível e segura. Podem permear ou interagir com constituintes do estrato córneo diminuindo, assim, a resistência da pele à difusão do fármaco ou, ainda, podem aumentar o fluxo do fármaco devido o incremento da atividade termodinâmica deste na formulação. Além dos promotores químicos, técnicas envolvendo processos físicos têm sido testadas com sucesso, e atuam favorecendo a penetração de compostos no estrato córneo por alterar

temporariamente e reversivelmente essa barreira. Dentre os métodos que ganharam destaque, pode ser citado a eletroterapia (NEMEN, 2010; BERTOLINI, 2009).

A aplicação de sistemas nanoestruturados em produtos farmacêuticos e cosméticos tem sido extensivamente pesquisada com o intuito de melhorar a permeação cutânea de substâncias ativas. Trata-se de sistemas caracterizados por apresentar tamanho dentro da escala nanométrica e possuir uma grande área superficial, o que confere certas vantagens para a aplicação tópica como a melhora na permeação cutânea de fármacos, a vetorização dos mesmos nas diversas camadas da pele, a incorporação de concentrações maiores de fármacos nas formas farmacêuticas com provável aumento da liberação nos tecidos, e a possibilidade de obtenção de perfis de liberação sustentados (BACCARIN, 2015).

Sendo assim, para promover que o fármaco alcance as camadas específicas da pele, durante o desenvolvimento das formulações tópicas existe uma busca constante para vencer essa barreira sem danificá-la visando promover concentração adequada do fármaco na camada da pele desejada (SANTOS, 2018).

2.6 Microemulsão

As microemulsões (MEs) foram descritas inicialmente por Hoar e Schulman em 1943 quando estudado sistemas monofásicos transparentes gerados pela titulação de uma emulsão leitosa com um álcool de cadeia média (HOAR; SCHULMAN, 1943). São definidas como sistemas termodinamicamente estáveis e isotropicamente translúcidos constituídos por uma fase oleosa e outra aquosa que são estabilizados por um filme interfacial de tensoativos e cotensoativos. (SOUSA, 2016).

A possibilidade de formação de uma microemulsão depende fortemente do equilíbrio entre as propriedades hidrofílicas e lipofílicas da mistura de tensoativo e cotensoativo, determinadas não apenas pelas suas estruturas químicas, mas também por outros fatores, como temperatura e força iônica. As condições equilibradas de tensoativo e cotensoativo possibilitam a condição máxima de redução da tensão interfacial entre a fase oleosa e a fase aquosa (MITTAL, 1999).

Comparando as microemulsões com as formulações convencionais, as MEs apresentam várias vantagens: melhoraram a solubilidade do fármaco,

apresentam estabilidade termodinâmica, facilidade de obtenção e promovem aumento na biodisponibilidade de substâncias ativas, em razão da grande quantidade de tensoativos presentes em sua formulação, a interação com o estrato córneo em que a bicamada lipídica seria desestruturada e a permeabilidade dos fármacos facilitada. Ainda, são sistemas adequados para veiculação tanto de fármacos solúveis em água, quanto insolúveis. Portanto, trata-se de um promissor veículo para administração tópica de medicamentos (SOUSA, 2016).

As microemulsões podem ser classificadas em três tipos: água em óleo (A/O), na qual as gotículas de água são dispersas em óleo; óleo em água (O/A), em que gotículas de óleo são dispersas em água e sistemas bicontínuos, nos quais as fases aquosa e oleosa estão entrelaçadas e estabilizadas por tensoativo nas interfaces entre as fases distintas (RUSHFORTH et al, 1986).

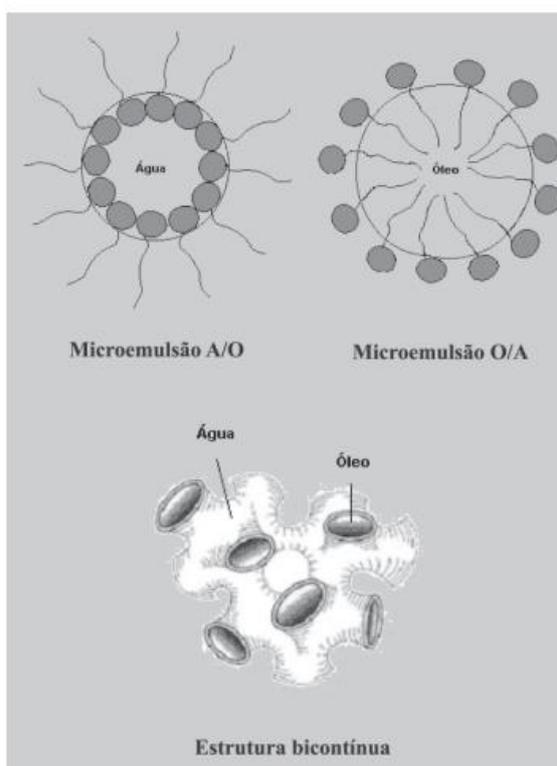


Figura 8. Representação esquemática da organização das microemulsões. (FORMARIZ et al., 2005).

As microemulsões possuem grande potencial de produzir nanosuspensões, explorando sua estrutura e servindo como ponto de partida para produção das mesmas. A substância ativa pode ser incorporada na fase interna e, ao

diluir as microemulsões, se dá origem à nanosuspensão pela extração do solvente parcialmente miscível utilizado como fase oleosa da microemulsão, conforme descrito por TROTTA et al., 2003.

2.7 Nanosuspensão

O desenvolvimento de carreadores nanoestruturados contendo substância ativa tem sido alvo de diversas pesquisas na área farmacêutica, objetivando otimizar a liberação de fármacos no organismo, aumentar a solubilidade e muitas vezes reduzir a toxicidade. A redução do tamanho de partículas pode resultar em propriedades inovadoras do material. Dentre os carreadores nanoestruturados, têm-se as nanosuspensões, que são sistemas apresentando diâmetro inferior a 1000 nm e são constituídos pela substância ativa sólida dispersa em meio aquoso através de agentes estabilizantes. As substâncias ativas nanosuspensas apresentam alterações significativas em suas propriedades físico-químicas, tais como aumento da solubilidade e da velocidade de dissolução, o que pode resultar em incremento da biodisponibilidade quando comparado à suspensão convencional (PESSOA, 2018).

As nanosuspensões podem ser obtidas por diferentes métodos. Na tecnologia de “bottom up”, o composto é dissolvido num solvente orgânico e subsequentemente é precipitado por adição de um anti-solvente na presença de um estabilizador, como o método de emulsificação com remoção do solvente orgânico. Já a tecnologia de “top down” envolve a desintegração do material em nanoestruturas e envolve a entrada de alta energia, como, por exemplo, homogeneização de alta pressão (PESSOA, 2018).

Uma das técnicas empregadas no “bottom up” é a utilização de um solvente parcialmente miscível em água capaz de extrair o solvente de uma microemulsão O/A adicionando água. O procedimento de difusão de solvente leva ao desenvolvimento de microesferas capazes de carrear substâncias ativas. Esse processo se baseia na miscibilidade da água nos solventes orgânicos, que, ao transferir uma emulsão ou microemulsão O/A transitória para a água, as gotículas poliméricas solidificam instantaneamente devido à difusão quase completa do solvente orgânico das gotículas poliméricas para a fase contínua. Controlando o processo e parâmetros, é possível obter partículas com características diferentes (QUITANAR et al., 1997; SAH, 2000; TROTTA et al., 2001).

O mecanismo responsável pela permeação cutânea de nanosuspensões é diretamente dependente do tamanho das partículas. A redução do tamanho das partículas na faixa nanométrica promove a formação de solução supersaturada ao redor das partículas, o que promove um aumento da permeabilidade através da pele devido a um aumento no gradiente de concentração. Vale ressaltar que as nanosuspensões tópicas consistem quase inteiramente de nanopartículas de substâncias ativas e uma pequena quantidade de tensoativos biocompatíveis, como a lecitina de soja, devido ao seu baixo potencial de toxicidade. (MISHRA et al., 2009; KOBIERSKI et al., 2009; LAI et al., 2015).

2.8 Eletroterapia

A RDC nº 573/2013 CFF define que a eletroterapia consiste no uso de correntes elétricas dentro da terapêutica. Os aparelhos de eletroterapia utilizam uma intensidade de corrente muito baixa, em miliamperes e microamperes. Os eletrodos são aplicados diretamente sobre a pele e o organismo será o condutor. Na eletroterapia temos que considerar parâmetros como: resistência, intensidade, voltagem, potência e condutividade (RDC nº 573, 2013).

Com base nos princípios biofísicos que norteiam a eletroterapia, a corrente elétrica corresponde ao fluxo de cargas ao longo de um material condutor gerado por uma diferença de potencial (ddp) entre dois polos, um positivo e outro negativo. A carga pode constituir-se de elétrons, formando assim uma corrente eletrônica, ou de íons, formando uma corrente iônica. Os íons estão presentes em soluções eletrolíticas de ácidos, bases e sais, tais como aquelas que compõem os tecidos biológicos. No organismo vivo, em que a condução é feita principalmente pelos íons, os negativos se chamam ânions e os positivos, cátions. A denominação se dá de acordo com o polo que os atrai (CISNEROS et al., 2006).

Para que aconteça o movimento de elétrons é preciso que existam zonas com escassez e zonas com excesso destes. Dado que a matéria tende a estar eletricamente equilibrada, o movimento acontecerá do local em que há excesso para aquele em que há falta. Chama-se de ânodo a zona em que há falta de elétron. A zona com excesso é chamada de cátodo. O ânodo é carregado positivamente e o cátodo, negativamente. É importante entender que, quando falamos de movimentos de cargas elétricas no interior do organismo, não são os elétrons que se movem, mas

sim os eletrólitos dissolvidos na água e nos tecidos. Estas agitações moleculares, geradoras de energias no tecido, são conhecidas por movimento Browniano (CISNEROS et al., 2006).

Na fisioterapia a eletroterapia é utilizada para aprimorar e restabelecer a performance muscular, reparo tecidual, controle da dor, aumento da atividade funcional, entre outros (NELSON et al., 2003). Além de vários fins terapêuticos, a eletroterapia também é usada para fins estéticos. Diversas técnicas podem ser utilizadas para esse propósito, como a eletrolipoforese, radiofrequência, corrente russa, galvanopuntura, ultrassom, microcorrentes, iontoforese entre outras.

Por definição, a eletrolipoforese é uma técnica destinada ao tratamento das adiposidades e acúmulo de ácidos graxos localizados. Caracteriza-se pela aplicação de uma corrente específica de baixa frequência (ao redor de 25 Hz) que atua diretamente no nível dos adipócitos e dos lipídios acumulados, produzindo lipólise e favorecendo sua posterior eliminação. Denominam-se radiofrequências (RF) as radiações compreendidas no espectro eletromagnético entre 30 KHz e 3 GHz, é um tipo de radiação eletromagnética que em frequências mais elevadas gera calor nos tecidos biológicos. A técnica é considerada não ablativa, induzindo a produção de colágeno sem ruptura da pele, e as frequências mais empregadas em equipamentos utilizados em dermato-funcional estão entre 0,5 MHz e 1,5 MHz, mas também encontramos no mercado alguns aparelhos com frequência em torno de 6 MHz e 40,68 MHz. Atualmente, a corrente russa pode ser definida como uma corrente alternada de média frequência (entre 2.500 Hz e 5.000 Hz), que pode ser modulada por bursts (rajadas) e é utilizada com fins excitomotores (BORGES, 2010; RDC nº 573, 2013).

A galvanopuntura foi definida ainda como uma técnica em que se utilizam microcorrentes de baixa frequência, polarizadas, emitidas por meio de uma agulha introduzida na epiderme, com a finalidade de produzir um "levantamento" dos estratos mais superficiais e prevenir, dessa forma, o envelhecimento cutâneo. Embora a galvanopuntura tenha sido concebido inicialmente para o tratamento de rugas/linhas de expressão, atualmente também encontramos grande utilidade dessa técnica nas sequelas de estiramento da pele, caracterizadas como estrias. Por terapia ultrassônica entende-se: tratamento mediante vibrações mecânicas com uma

frequência superior a 20.000 Hz. As frequências do ultrassom usadas terapêuticamente podem oscilar entre 0,7 MHz e 3 MHz. É o uso do ultrassom para aumentar a absorção cutânea de fármacos aplicados topicamente. A microcorrente pode ser definida como um tipo de eletroestimulação que utiliza correntes com parâmetros de intensidade na faixa dos microamperes, e são de baixa frequência, podendo apresentar correntes contínuas ou alternadas. Também é chamada de MENS (Micro Electro Neuro Stimulation). Diferentemente das outras modalidades eletroterapêuticas, a característica que distingue a microcorrente é que ela não visa à excitação de nervos periféricos. Por ter características subsensoriais, não causa desconforto ao paciente. (BORGES, 2010; RDC nº 573, 2013). A iontoforese é outra técnica de promoção de permeação muito utilizada. Ela consiste na associação de uma corrente elétrica contínua ou alternada a substâncias ativas de aplicação tópica, que potencializa sua liberação através do estrato córneo, aumentando a eficácia terapêutica de diversos tratamentos (VIANNA et al., 2010).

2.9 Iontoforese

A iontoforese é uma técnica que utiliza eletricidade em uma corrente contínua e de baixa intensidade para aumentar a permeabilidade da pele e outros tecidos à penetração de substâncias. Os íons são conduzidos através de uma barreira que, de outra forma, dificultaria sua passagem. Quando a corrente elétrica se inicia, as cargas positivas das substâncias se movem do ânodo em direção ao cátodo, enquanto as cargas negativas se movem em direção oposta através da barreira da pele, como observado na figura 8 (DA SILVA et al., 2018).

As principais vias de acesso dos íons transferidos por iontoforese são os poros de glândulas sudoríparas, enquanto o estrato córneo, os pelos foliculares e as glândulas sebáceas pouco contribuem para a penetração iônica, uma vez que apresentam elevada impedância elétrica relativa (OLIVEIRA et al., 2005). Deste modo, é conseguido superar umas das maiores barreiras da permeação cutânea.

Os mecanismos envolvidos no transporte iontoforético são (1) a eletrorrepulsão, criada pela interação substância ativa–campo elétrico, que provê força adicional para direcionar íons de polaridade semelhante ao do eletrodo sob o qual são colocados; (2) a eletrosmose, que é o movimento de parte do solvente juntamente com os componentes neutros e iônicos nele diluídos através da pele; e

(3) o aumento da permeabilidade intrínseca da pele pela aplicação do fluxo elétrico. Pelo mecanismo da eletrorrepulsão, tanto substâncias de valência positiva quanto negativa serão liberadas, desde que sejam colocadas sob o eletrodo que apresente a mesma carga elétrica. Assim, substâncias de valência positiva deverão ser colocadas sob o polo positivo, enquanto as de valência negativa, somente no polo negativo (OLIVEIRA et al., 2005).

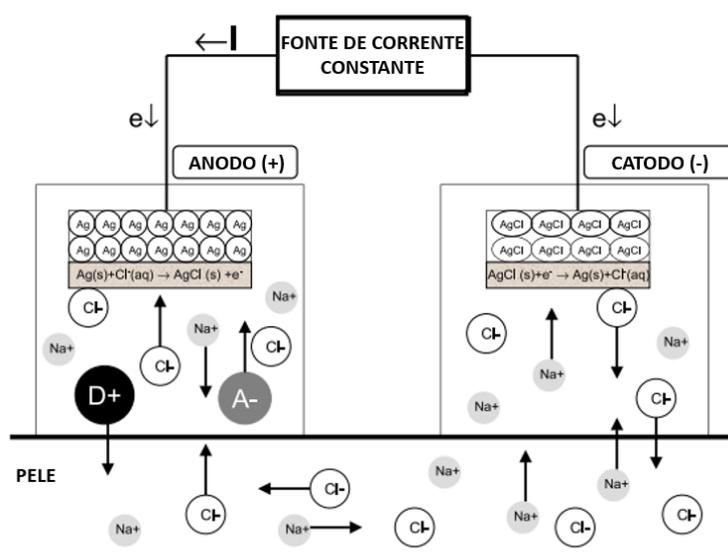


Figura 9. Iontoforese utilizando sistema de eletrodos de Ag/AgCl. O ânodo contém um fármaco ionizável D + e seu contra íon A- e Na+Cl-. Fonte: KALIA et al., 2004.

A maioria dos ativos liberados pelos sistemas cutâneos convencionais são moléculas pequenas, potentes e relativamente lipofílicas. A administração cutânea de fármacos polares e que apresentam carga é particularmente difícil, devido à lipofilicidade intrínseca do estrato córneo. A iontoforese apresenta o potencial de vencer várias limitações associadas à liberação tópica e transdérmica, como promover a penetração de moléculas polares e de grande massa molecular, aumentar a liberação de substâncias de meia-vida curta diretamente nos tecidos, além de permitir um melhor controle no transporte de substâncias ativas, garantindo dosagem adequada e boa aceitação pelo paciente. A baixa variabilidade biológica paciente/paciente promovida pelo controle da corrente elétrica é outra vantagem da iontoforese quando comparada à administração passiva (sem corrente elétrica) de substâncias (GRATIERI et al., 2008).

As maiores desvantagens do transporte de fármacos por iontoforese são os riscos de queimaduras e choques resultantes da utilização de correntes elétricas elevadas e por longos períodos, que não são recomendados. Os riscos de queimadura podem ser causados por fatores como o contato dos eletrodos com o olho, superdosagem, presença de lesões no local de aplicação, alterações significativas de pH e elevada intensidade da corrente (FIALHO et al., 2004).

Vários princípios ativos, em diferentes tipos de fontes iônicas, são indicados para a transferência por iontoforese. Entre as indicações, dependendo da substância utilizada, pode-se citar seu uso para ação anti-inflamatória, antioxidante, antiedematosa, hidratante, cicatrizante, antisséptica, bactericida, entre outras (DA SILVA et al., 2018).

Monteiro e Silva et al. (2021) avaliou o uso de ácidos fenólicos derivados de plantas (ácido gálico, caféico e ferúlico) isoladamente ou em combinação para aplicações dermatológicas e farmacêuticas. O ácido gálico mostrou a maior atividade antioxidante, e, quando foi utilizado a iontoforese, notou-se um aumento da atividade antioxidante na pele depois de apenas 20 minutos (MONTEIRO E SILVA et al., 2021).

Cázares-Delgadillo et al. (2018) investigou o efeito da corrente elétrica sobre o transporte iontoforético de ácido ascórbico e ácido elágico em pele suína *in vitro*, foi constatado que a corrente galvânica contínua associada à corrente de pulso por apenas 5 minutos foi capaz de aumentar significativamente a liberação ou penetração de ácido ascórbico presente em composições cosméticas, já o modo corrente de pulso unipolar foi capaz de melhorar significativamente a passagem de ácido elágico em sua forma neutra em composições cosméticas por eletrosmose, dessa forma, foi percebido que ajustar modos de corrente elétrica específicos considerando o estado de ionização dos ingredientes ativos permitiria o projeto de tratamentos cosméticos curtos e personalizados que melhoram significativamente a eficiência de penetração dos ingredientes ativos e possivelmente reduzem as doses aplicadas (CÁZARES-DELGADILLO et al., 2018).

Kurokawa et al. (2016) realizou uma pesquisa utilizando peeling químico de ácido glicólico e subsequente iontoforese com vitamina A, C e E, no tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória, erosões com pápulas vermelhas inflamadas e cicatrizes atróficas não inflamadas em pacientes com acne vulgar. Nesse estudo foi

observado uma melhora notável na maioria dos pacientes após o tratamento (KUROKAWA et al., 2016). Apesar dos inúmeros estudos na área, ainda há muito que estudar a fim de aproveitar ao máximo o potencial da iontoforese na área cosmética, nesse sentido, a associação da iontoforese com a cafeína parece ser promissora.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolver formulações nanotecnológicas direcionadas à aplicação iontoforética em procedimentos estéticos

3.2 Específico

- Obter e caracterizar sistemas microemulsionados previamente desenvolvidos;
- Obter e caracterizar nanosuspensões contendo cafeína preparadas a partir de microemulsões previamente selecionadas;
- Desenvolver metodologia analítica de quantificação da cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Desenvolver método de extração para recuperação da cafeína pele de orelha de porco.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

A cafeína foi fornecida pela Farmácia Definitiva (Olinda, Brasil). O álcool benzílico, o fosfato bibásico anidro e o metanol grau HPLC foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea® (São Paulo, Brasil). A lecitina de soja, álcool isopropílico e o carbonato de propileno foram obtidos da Lipoid® (Ludwigshafen, Alemanha), Merck® (Darmstadt, Alemanha) e Sigma- Aldrich® (San Luiz, Estados Unidos), respectivamente. O ácido clorídrico foi adquirido da Alphatec® (São Paulo, Brasil). A água deionizada de alta pureza ($0,055 \mu\text{S cm}^{-1}$ e $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) foi obtida através de Ultrapurificador Direct-Pure (Purelab clássico DI, Elga, UK).

4.2 Obtenção das microemulsões

Para o preparo das microemulsões, utilizou-se como tensoativo a lecitina de soja, por ser não tóxico, de ocorrência natural e amplamente empregada no preparo de microemulsões biocompatíveis (ABOOFAZELI, et al., 1994) e como cotensoativo o álcool isopropílico. Para a fase oleosa foram utilizados o álcool benzílico ou o carbonato de propileno, por serem solventes parcialmente miscíveis em água e de baixa toxicidade. Água foi usada como fase aquosa.

As microemulsões foram previamente selecionadas a partir de diagramas de fases previamente elaborados, cuja proporção de tensoativo e cotensoativo (T:CT) foi de 1:2. As amostras MAB-3 e MAB-4 são compostas por álcool benzílico na fase oleosa (FO) e ambas têm proporção de T:CT/FO 6:4; já as formulações MCP-5 e MCP-10 apresentam carbonato de propileno como fase oleosa e têm como proporção de T:CT/FO 6:4 e 9:1, respectivamente. As composições estão descritas na tabela 1.

	T:CT	FASE OLEOSA	ÁGUA
Fase oleosa: Álcool Benzílico			
MAB-3	2,4g	1,6g	1000µL
MAB-4	2,4g	1,6g	2400µL
Fase oleosa: Carbonato de propileno			
MCP-5	2,4g	1,6g	2400µL
MCP-10	3,6g	1,6g	4000µL

Tabela 1. Composição das microemulsões selecionadas para esse estudo. Fonte: Autoria própria. *T:CT – Proporção tensoativo/cotensoativo.

4.3 Obtenção das nanosuspensões

Em 1g das microemulsões selecionadas foram adicionados cafeína a 3% e as nanosuspensões foram preparadas adicionando 25 uL de água por vez até chegar ao seu ponto de turvação ou até atingir o montante de 2 mL. A mistura dos componentes foi realizada sob agitação contínua em um agitador magnético, utilizando a metodologia similar à proposta por Trotta *et al.* (2003).

4.4 Caracterização das microemulsões e nanosuspensões

Inicialmente foi realizada uma inspeção visual macroscópica. Em seguida, as microemulsões e as nanosuspensões obtidas foram avaliadas quanto ao diâmetro médio das partículas e índice de polidispersão, através de técnica de espalhamento dinâmico de luz, utilizando equipamento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK), em triplicata e à temperatura controlada de 25° C e ângulo de 90°, sem diluição.

4.4.1 Determinação do pH

Os valores de pH das microemulsões e das nanosuspensões foram determinados através da leitura direta da amostra após inserção do eletrodo, usando pHmetro de bancada IONLAB® PHS-3E previamente calibrado utilizando tampões de pH 4 e 7 antes do uso.

4.4.2 Teste de estabilidade frente à centrifugação

As microemulsões foram submetidas a centrifugação, utilizando a centrífuga Daiki® DT-4500, condicionada a 3000 rpm durante 15 minutos, por 5 vezes.

4.5 Seleção do líquido extrator utilizado no procedimento de *tape stripping*

Para a seleção de um solvente extrator adequado, foram realizados testes utilizando metanol e água de forma separada e em três diferentes proporções: 50:50; 60:40 e 70:30 (MeOH:H₂O v/v). A pele de orelha de porco foi delimitada e, com o auxílio de agulhas, fixadas em uma superfície recoberta com papel alumínio, o estrato córneo foi removido utilizando 15 fitas adesivas 3M® (Sumaré, Brasil), modelo Durex® Transparente. Após o procedimento de retirada das fitas (*tape stripping*), as mesmas foram inseridas em tubo plástico de fundo cônico, adicionadas de 10 mL do solvente extrator a ser testado e contaminadas com volumes conhecidos de solução metanólica padrão de cafeína (1 mg/mL), para obtenção de uma concentração de 10 µg/mL. Os tubos de extração ficaram em repouso por 30 minutos, foram agitados durante 30 minutos e submetidos a banho de ultrassom ao longo de 15 minutos. Logo após as amostras foram filtradas em filtros 0,45µm de PVDF (Merck-Millipore®, Darmstadt, Alemanha). Alíquotas foram acondicionadas em vials e a quantificação da cafeína foi realizada por CLAE.

4.6 Condições cromatográficas e metodologia analítica para quantificação de cafeína (por CLAE)

As análises de determinação da cafeína foram executadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os experimentos foram realizados em cromatógrafo Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com detector DAD (detector de arranjo de diodos), operando a 220 nm com bomba LC-20AD e software LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japão). A separação foi realizada em coluna C18 de fase reversa (HyperClone®, Phenomenex) 250 x 4,6 mm (5 µm). A fase móvel foi constituída por metanol e água acidificada com ácido clorídrico 0,07% (pH 2,0 ± 0,1), na proporção 60:40 v/v, com vazão de 1,0 mL/min e volume de injeção de 20 µL. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 8 minutos e o tempo de retenção da cafeína foi de cerca de 5 minutos.

4.6.1 Obtenção da curva de calibração para quantificação da cafeína no fluido receptor

A primeira curva de calibração foi realizada com a finalidade de analisar as amostras que serão obtidas a partir do fluido receptor no procedimento de células do tipo Franz. A partir de uma solução-mãe de cafeína em metanol 1 mg/mL foram

realizadas diluições a fim de obter as seguintes concentrações: 0,5; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; e 40,0 µg/mL. As amostras foram preparadas em balões volumétricos e o volume dos balões foi completado utilizando uma solução de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). As amostras para a construção da curva de calibração foram injetadas diretamente no cromatógrafo.

4.6.2 Obtenção da curva de calibração para quantificação da cafeína na pele de orelha de porco

Para a análise de amostras provenientes de estudos futuros de permeação cutânea da cafeína, foi elaborada uma segunda curva de calibração. Diante do conhecimento da melhor condição do líquido extrator, a partir de uma solução-mãe de cafeína em metanol 1 mg/mL foram realizadas diluições a fim de obter as seguintes concentrações: 0,5; 2,0; 4,0; 10,0; 20,0; e 40,0 µg/mL. As soluções foram preparadas a partir da diluição MeOH e H₂O (60:40 v/v). As amostras da curva de calibração foram injetadas diretamente no cromatógrafo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Características das microemulsões

As microemulsões possuem diversas propriedades notáveis, como alta absorção e permeação devido ao menor tamanho de partícula, baixa tensão superficial, estabilidade termodinâmica, alta capacidade de solubilização de moléculas hidrofílicas e lipofílicas, pequeno tamanho de gotícula, bem como seu custo-benefício. Basicamente, a microemulsão são as emulsões com tamanho de gotícula inferior a 100 nm. Essas gotículas são invisíveis devido ao seu reduzido, muito menor do que o tamanho do comprimento de onda da luz visível (400-800 nm), elas são incapazes de refletir a luz e não são visíveis através do microscópio óptico que torna o sistema de microemulsão transparente (MA et al., 2015; SHUKLA et al., 2018).

Os ensaios organolépticos fornecem parâmetros, como aspecto, cor e odor, que permitem avaliar, de imediato, o estado em que se encontra a amostra em estudo por meio de análises comparativas, com o objetivo de verificar alterações como: separação de fases, precipitação e turvação permitindo reconhecimento primário do produto. Esses parâmetros são utilizados para avaliação visual das formulações, tornando possível notar a ocorrência de alguma alteração macroscópica (BRASIL, 2008). As formulações, mesmo utilizando diferentes proporções de T:CT, fase oleosa e água, permaneceram transparentes, sem a presença de partículas suspensas e turvação, conforme pode ser observado na figura 10. A faixa de pH das amostras obtidas variou entre 6,0 a 7,0. Portanto, dentro da faixa tolerância biológica para produtos cutâneos (5,5 a 8,0) (SILVA, 2009).

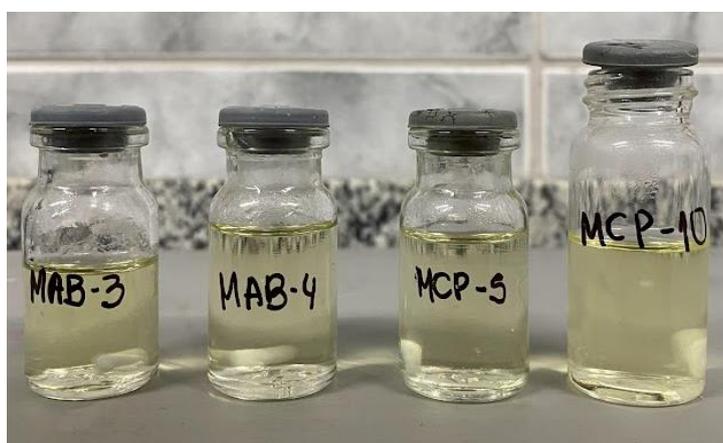


Figura 10. Microemulsões finalizadas. Fonte: Autoria própria.

Todas as amostras resistiram ao estresse físico quando submetidas a centrifugação, como mostrado na Tabela 2. A força da gravidade atua sobre os produtos e sistemas, fazendo com que suas partículas se movam no seu interior. A centrifugação produz estresse na amostra, simulando um aumento na força de gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis instabilidades. Estas poderão ser observadas na forma de precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto, coalescência, entre outras (BRASIL, 2008).

PARÂMETROS	MAB-3	MAB-4	MCP-5	MCP-10
Características organolépticas	Límpida	Límpida	Límpida	Límpida
Resistência a centrifugação	Aprovado	Aprovado	Aprovado	Aprovado
Tamanho de gotícula (nm)	484,8 181,6	14,42 0,1908 ±	30,65 4,275 ±	37,41 13,54 ±
PDI	0,990 0,007	0,128 0,029 ±	0,182 0,052 ±	0,225 0,04 ±

Tabela 2. Características físico-químicas das microemulsões. Fonte: Autoria própria. *PDI – índice de polidispersividade.

A determinação do tamanho das gotículas e de sua distribuição corresponde a um dos parâmetros mais importante para caracterizar as microemulsões e avaliar a estabilidade dos sistemas microemulsionados, além de ser importante no favorecimento da permeação cutânea da substância ativa na pele (DAMASCENO et al., 2012). Além do tamanho de gotícula, é importante obter o índice de polidispersividade (PDI), que fornece informações sobre o tamanho das partículas analisadas. O PDI se refere à variedade do tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade. Esse valor varia de 0 a 1 e, quanto menor, mais monodispersa e, conseqüentemente, menos heterogênea é a amostra. (ALBERNAZ, 2014). Com relação ao tamanho das gotículas e aos valores de PDI, descritas na Tabela 2, as microemulsões possuem tamanhos e valores de PDI aceitáveis, exceto a formulação MAB-3 que apresentou, tanto tamanho de gotículas quanto valor de PDI, altos. Este fato pode ser atribuído a inadequações ocorridas na sua preparação.

As microemulsões selecionadas possuem uma baixa quantidade de água, afetando seu uso em meio aquoso, condição ideal para o emprego da iontoforese. Como forma de contornar tal cenário, foram desenvolvidas nanosuspensões, uma vez

que, a sua obtenção é uma maneira promissora de aumentar a quantidade de água presente nas formulações, sendo um método adequado para ativos hidrofílicos.

Do ponto de vista físico-químico, a formação das nanosuspensões conforme proposto por Trotta *et al.* 2003 é bastante similar à formação de nanopartículas poliméricas obtidas pelo método de emulsificação-difusão do solvente relatado por Souto *et al.* 2012. O método envolve a preparação de uma emulsão do tipo O/A, cuja fase interna é constituída por um solvente orgânico parcialmente hidromiscível como, por exemplo, álcool benzílico, carbonato de propileno ou acetato de etila, que é previamente saturado com água, de modo a assegurar um equilíbrio termodinâmico inicial de ambas as fases. O polímero é dissolvido no solvente saturado, formando-se uma fase orgânica na qual é disperso ou dissolvido o princípio ativo. Esta fase é emulsificada, sob agitação intensa, numa solução aquosa, contendo um tensoativo do tipo O/A, como, por exemplo, o PVA ou um poloxâmer. A adição subsequente de água ao sistema, provoca a difusão do solvente orgânico na fase externa. Dependendo do seu ponto de ebulição, o solvente pode ser eliminado por evaporação ou por ultrafiltração, obtendo-se, no final, a dispersão aquosa de nanopartículas (SOUTO *et al.*, 2012).

5.2 Caracterização das nanosuspensões adicionadas de 2 mL de água

Levando em consideração a metodologia sugerida por Trotta *et al.* 2003, as nanosuspensões foram preparadas utilizando o quantitativo de 2 mL de água proposto. Em suas características organolépticas observa-se que as preparações realizadas a partir das microemulsões com álcool benzílico atingiram uma característica translúcida em seu ponto de turvação, enquanto as preparadas a partir de microemulsões com carbonato de propileno mostraram-se opacas, como pode ser visto na figura 11. O pH das amostras manteve-se por volta de 6,0 até 7,0, tornando as formulações biocompatíveis.



Figura 11. Nanosuspensões finalizadas. Fonte: Autoria própria.

O desempenho de uma forma farmacêutica depende, dentre outros fatores, da sua eficácia e segurança. Uma das formas de avaliação das formulações consiste na realização dos testes de caracterização físico-química em que informações relevantes acerca do produto são obtidas. Conforme a tabela 3, no que se refere ao tamanho de partícula, as formulações apresentaram valores inferiores a 150 nm, estando dentro do limite recomendado, exceto NSAB-3-CAF. Com relação aos valores de PDI, nota-se que apenas a amostra NSAB-4-CAF apresentou um valor aceitável.

PARÂMETROS	NSAB-3-CAF	NSAB-4-CAF	NSCP-5-CAF	NSCP-10-CAF
Características organolépticas	Translúcido	Translúcido	Opaco	Opaco
Tamanho de partícula (nm)	677,5 179,5 ±	147,0 15,52 ±	98,09 2,762 ±	76,27 7,675 ±
PDI	0,881 0,121±	0,177 0,121 ±	0,406 0,032 ±	0,684 0,211 ±

Tabela 3. Características físico-químicas das nanosuspensões. Fonte: Autoria própria. *PDI – índice de polidispersividade.

Diante dos resultados, é possível constatar que a amostra MAB-3 não atingiu tamanho de partícula adequado para ser caracterizado como microemulsão, diante desse fato nota-se que as nanosuspensão derivadas dessa amostra apresentam altos tamanhos de partículas, PDI e elevado desvio padrão. Acredita-se que nessa amostra possa ter ocorrido erros metodológicos impedindo a formação adequada da microemulsão e conseqüentemente das nanosuspensões. Com o propósito de analisar melhor os sistemas nanoestruturados que se formaram, foram investigadas as características de nanosuspensões no ponto de turvação.

5.3 Caracterização das nanosuspensões considerando o ponto de turvação

Foram realizados testes com a finalidade de encontrar o ponto de turvação das nanosuspensões. O ponto de turvação da amostra diz respeito, teoricamente, ao ponto em que houve a formação da nanosuspensão, levando em conta a mudança de aspecto que ocorre durante o processo, vale destacar que a mudança de cor pode ter ocorrido devido a precipitação da cafeína quanto pela desestabilização das microemulsões. Diante dos resultados, nota-se que amostras preparadas a partir de microemulsões que receberam menor quantidade de água atingiram o ponto de turvação com uma maior quantidade de água, sendo a preparação NSAB-3-CAF-T a que suportou uma maior capacidade de água e a amostra NSCP-10-CAF-T turvou com uma menor fração de água, como é mostrado na tabela 4. Constata-se que as características organolépticas observadas nas nanosuspensões no seu ponto de turvação não sofreram alterações, evidenciando que a incorporação de uma maior quantidade de água, como acontece nas nanosuspensões que receberam 2 mL de água, não alterou significativamente este parâmetro. Uma imagem das nanosuspensões finalizadas é mostrada na figura 12.

ME	T:CT	FO	ÁGUA	NP	ÁGUA ACRESCIDA
MAB-3	2,4g	1,6g	1000 μ L	NSAB-3-CAF-T	600 μ L
MAB-4	2,4g	1,6g	2400 μ L	NSAB-4-CAF-T	450 μ L
MCP-5	2,4g	1,6g	2400 μ L	NSCP-5-CAF-T	425 μ L
MCP-10	3,6g	1,6g	4000 μ L	NSCP-10-CAF-T	225 μ L

Tabela 4. Quantidade de água acrescida para chegar ao ponto de turvação.
Fonte: Autoria própria.



Figura 12. Imagem das nanosuspensões em seu ponto de turvação. Fonte: Autoria própria.

Conforme descrito na tabela 5, as nanosuspensões NSCP-10-CAF-T e NSAB-3-CAF-T apresentaram diâmetro inferior a 1000 nm já em seu ponto de turvação, apesar de apresentarem PDI maior do que o desejado. Nas demais nanosuspensões é possível observar altos tamanhos de partículas e valores de PDI. Acredita-se que tal fato se deu pela aglomeração das partículas devido a quantidade de água insuficiente para promover o desagrupamento das partículas no meio.

PARÂMETROS	NSAB-3-CAF-T	NSAB-4-CAF-T	NSCP-5-CAF-T	NSCP-10-CAF-T
Características organolépticas	Translúcido	Translúcido	Opaco	Opaco
Tamanho de partícula (nm)	88,93 81,22 ±	1291,0 149,5 ±	1382 160,3 ±	140,2 8,001±
PDI	0,459 0,156 ±	0,741 0,449 ±	0,763 0,072 ±	0,887 0,053 ±

Tabela 5. Características físico-químicas das nanosuspensões em seu ponto de turvação. Fonte: Autoria própria. *PDI – índice de polidispersividade.

Nas amostras MAB-4 e MCP-5, nota-se que essas microemulsões diferem apenas na substância que compões da fase oleosa, por esse motivo ambas as amostras dão origem da nanosuspensões que atingem um ponto de turvação com quantidade de água aproximadas, e que seus tamanhos de partículas e PDI são similares neste cenário. Nas nanosuspensões que receberam 2 mL de água, é notável certa similaridade no tamanho de partículas, porém a amostra NSAB-4-CAF, preparada com álcool benzílico, mostra-se ser mais homogênea devido ao valor de PDI baixo, levando a acreditar que mudança na FO possa ter influenciado nos resultados observados.

5.4 Padronização da metodologia analítica

A escolha de uma metodologia analítica adequada é de fundamental importância para gerar resultados que possam ser interpretáveis e confiáveis, dados analíticos não confiáveis podem comprometer conclusões de estudos e conduzir a decisões inadequadas. Por esse motivo, é importante que haja a padronização da metodologia analítica para quantificação da cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A partir de condição cromatográfica estabelecida, foi preparado curvas de calibração visando a utilização em estudos futuros de células do tipo Franz e de *tape stripping*. A curva de calibração da cafeína em tampão fosfato 0,1M apresentou equação ($y = 78,163x$) com um coeficiente de correlação (R^2) de 0,9997, enquanto a curva utilizando MeOH:H₂O (60:40 v/v) obteve uma equação ($y=90,516x$), com R^2 de 0,9999; como mostrado na figura 13. Segundo a RDC N° 166/2017, da ANVISA, que estabelece os critérios para a validação de métodos analíticos, o coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990 (BRASIL, 2017). Sendo assim, o valor de R^2 obedece aos limites estabelecidos. As amostras possuem tempo de retenção em tampão fosfato e metanol e água 60:40 (v/v) em média de aproximadamente 5,12 e 5,18 minutos, respectivamente.



Figura 13. Curva analítica da cafeína em (1) tampão fosfato 0,1 M e (2) Metanol e água (60:40 v/v), obtida por cromatografia líquida de alta eficiência. Fonte: Autoria própria.

5.5 Seleção do solvente extrator utilizado nos estudos de *tape stripping*

A técnica de *tape stripping* é amplamente usada e aceita para estudar a cinética e a penetração de fármacos na pele, permitindo determinar a localização e a distribuição de substâncias no estrato córneo (BETTONI, 2009). Para garantir o sucesso do procedimento é necessário selecionar um líquido extrator capaz de recuperar a cafeína presente na amostra. Nas amostras adicionadas apenas de

metanol foi possível perceber a precipitação da cafeína, o que foge do propósito estabelecido, além de tornar a amostra inadequada para ser injetada no HPLC.

As demais amostras não demonstraram precipitação e foram analisadas. Os cromatogramas dessas análises são mostrados na figura 14. As extrações feitas apenas com água apresentaram tempo de retenção de 6,2 minutos, atrasando consideravelmente o aparecimento do pico da cafeína, além de apresentar uma taxa de recuperação de apenas 87,16%, já as amostras em que utilizaram água e metanol na proporção de 50:50 e 70:30 apresentaram tempos de retenção de 5,6 e 5,4 minutos e taxas de recuperação de 102,79% e 104,85%, respectivamente, essas proporções também demonstraram heterogeneidade nas duplicatas realizadas. Por esses motivos, os líquidos extratos citados foram desconsiderados. As amostras que receberam H₂O:MeOH na proporção de 60:40 apresentaram tempo de retenção de 5,3 minutos, taxa de recuperação de 98,70% e homogeneidade nas duplicatas, diante disso, essa condição foi escolhida para análises futuras dos procedimentos de *tape stripping*.

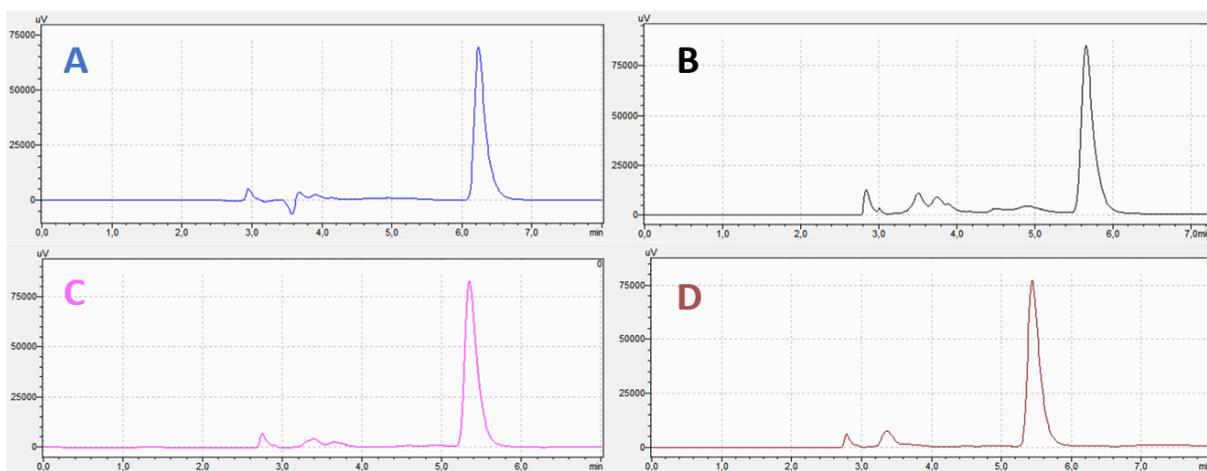


Figura 14. Cromatógrafo das extrações realizadas nos estudos de *tape stripping* utilizando água (A) e metanol e água nas proporções de 50:50 (B), 60:40 (C), 70:30 (D), respectivamente. Fonte: Autoria própria.

6. CONCLUSÃO

De acordo com o exposto, pôde-se verificar que as microemulsões obtidas e caracterizadas possuem tamanho de gotícula dentro do preconizado, bem como valores baixos de PDI, já nas nanosuspensões foi percebido que a amostra NASB-4-CAF mostrou ser uma candidata promissora visando a aplicação futura da iontoforese. Foi possível padronizar uma metodologia analítica capaz de quantificar a cafeína e escolher um solvente extrator adequado para uso em posteriores estudos de *tape stripping*. Dessa forma, é possível concluir que os estudos pilotos aqui evidenciados mostram-se promissores na investigação da cafeína objetivando seu uso futuro em procedimentos estéticos utilizando a iontoforese. Vale ressaltar que, mais estudos precisam ser realizados a fim de obter conclusões mais satisfatórias na área estudada.

7. REFERÊNCIAS

ABIHPEC - Associação Brasileira de Indústria da Higiene Pessoal, **Perfumaria e Cosméticos**, 2021

ABOOFAZELI, R. et al. Investigations into the formation and characterization of phospholipid microemulsions. III. Pseudo-ternary phase diagrams of systems containing water-lecithin-isopropyl myristate and either an alkanolic acid, amine, alkanediol, polyethylene glycol alkyl ether or alcohol as cosurfactant. **International journal of pharmaceutics**, v. 111, n. 1, p. 63-72, 1994.

AFONSO, João Paulo Junqueira M. et al. Celulite: artigo de revisão. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, v. 2, n. 3, p. 214-219, 2010.

ALVES, Natália Cristina. Penetração de ativos na pele: revisão bibliográfica. **Amazônia: science & health**, v. 3, n. 4, p. 36 a 43-36 a 43, 2015.

ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de Brosimum gaudichaudii, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. Dissertação de mestrado. Universidade de Brasília, 2014.

AU, Wai Ling; SKINNER, Michael F.; KANFER, Isadore. Comparação do tape stripping com o ensaio de branqueamento da pele humana para a avaliação da bioequivalência de formulações tópicas de propionato de clobetasol. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 1, pág. 11-20, 2010.

BABO, Marta Carina Teixeira. **Estudo da composição de cosméticos hidratantes faciais comercializados**. Tese de Doutorado. Universidade Fernando Pessoa, 2021

BACCARIN, Thaisa. **Desenvolvimento de Nanoemulsões contendo constituintes de Punica granatum para aplicação cutânea visando sua utilização na fotoproteção**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

BAYER, Raymond. **História da Estética**. Editorial Estampa, Lisboa, p. 13-91, 1995.

BELONI, Cláudia Regina Rodrigues. **Análise do perfil lipídico sérico em mulheres após terapia por ultrassom de 3mhz e gel condutor acrescido de cafeína a 5%**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, 2010.

BETTONI, Clarissa Cassini. **Avaliação da penetração cutânea de nanocápsulas de isotretinoína por tape stripping in vitro em pele humana e suína**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, 2009.

BERNARDO, Ana Flávia Cunha; SANTOS, Kamila dos; SILVA, Débora Parreiras da. **Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade**. **Revista Saúde em foco**, v. 1, n. 11, p. 1221-33, 2019.

BERTOLINI, Wagner Luiz Heleno Marcus. **A influência do D-limoneno como promotor de absorção de ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: avaliação in vitro e in vivo da permeação e retenção cutâneas**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2009.

BOHJANEN, Kimberly. **Estrutura e funções da pele**. **Dermatologia Clínica**. Seção I Bases para diagnóstico e tratamento. 2017.

BORGES, Fábio dos Santos. **Modalidades terapêuticas nas disfunções estéticas**. 2. Ed. Phorte Editora LTDA, 2010.

BORGES, Fábio dos Santos; SCORZA, Flávia Acedo. **Terapêutica em estética: conceitos e técnicas**. 1. Ed. Phorte Editora LTDA, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos – uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. Brasília, 2008.

CARVALHO, Michelle Lima; FIGUEIREDO, Frederico De Carvalho. **Contribuições da estética para a qualidade de vida**. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 39459-39473, 2020.

CÁZARES-DELGADILLO, Jennyfer et al. Investigation of different iontophoretic currents profiles for short-term applications in cosmetics. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 4, p. 266, 2018.

CISNEROS, Ligia de Loiola; SALGADO, Audrey Heloisa Ivanenko. **Guia de Eletroterapia: princípios biofísicos, conceitos e aplicações clínicas**. 1. Ed. Coopmed, 2006.

COSTA, Marine Nunes da et al. **Inserção e atuação do profissional farmacêutico na saúde estética-uma revisão integrativa**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Campina Grande, 2022.

COSTA, Priscila Santos; MEJIA, Dayana Priscila Maia. **Efeitos fisiológicos da endermoterapia combinados a massagem modeladora no tratamento de gordura localizada na região do abdômen**. Pós-graduação (Fisioterapia Dermato-Funcional), Faculdade Cambury, 2013.

CFF. Conselho Federal de Farmácia. Aprova as atribuições do farmacêutico no exercício da saúde estética e da responsabilidade técnica por estabelecimentos que executam atividades afins. **Resolução nº 573** de 22 de maio de 2013.

_____. Regula a prescrição farmacêutica e dá outras providências. **Resolução nº 586**, de 29 de agosto de 2013.

_____. Define os requisitos técnicos para o exercício do farmacêutico no âmbito da saúde estética, ampliando o rol das técnicas de natureza estética e recursos terapêuticos utilizados pelo farmacêutico em estabelecimentos de saúde estética. **Resolução nº 616**, de 25 de novembro de 2015.

DAMASCENO, Bolívar PGL et al. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 290-300, 2012.

DA SILVA, Erivanildo Gonçalves Vieira; HEBLING, Leticia Maria Graballos Ferraz. Iontoforese: uma Técnica Subutilizada. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 22, n. 2, p. 124-127, 2018.

DE JESUS, Gerson Souza; DA SILVA FERREIRA, Adriana; MENDONÇA, Adriana Cerqueira. Fonoforese x permeação cutânea. **Fisioterapia em Movimento (Physical Therapy in Movement)**, v. 19, n. 4, 2006.

DE LIMA, Angélica Aparecida; DE SOUZA, Thaís Helena; GRIGNOLI, Laura Cristina Esquisatto. Os benefícios do microagulhamento no tratamento das disfunções estéticas. **Revista Científica da FHO/Uniararas**, v. 3, n. 1, 2015.

DE MARIA, Carlos AB; MOREIRA, Ricardo FA. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

DEPIERI, Livia Vieira et al. Avanços no estudo bioanalítico da entrega de drogas através da pele. **Parto Terapêutico**, v. 6, n. 5, pág. 571-594, 2015.

DIAS, Marília Evellyn de Santana. **Avaliação in vitro da cinética de liberação e permeação cutânea da β -lapachona encapsulada em lipossomas incorporados em hidrogel**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2017.

FERREIRA, Andrea Granada et al. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de Bciclodextrina-b-poli (e-caprolactona) e maltoheptaose7-b-poli (e-caprolactona) visando a incorporação e liberação tópica de fármacos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2015.

FIALHO, Sílvia Ligório; CUNHA JÚNIOR, Armando da Silva. Iontoforese no transporte ocular de drogas. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, p. 839-845, 2004.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **J Invest Dermatology**. v. 64, p. 190-195, 1975.

FISCHER, T. W. et al. New effects of caffeine on corticotropin-releasing hormone (CRH)-induced stress along the intrafollicular classical hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (CRH-R1/2, IP3-R, ACTH, MC-R2) and the neurogenic non-HPA axis (substance P, p75NTR and TrkA) in ex vivo human male androgenetic scalp hair follicles. **British Journal of Dermatology**, v. 184, n. 1, p. 96-110, 2020.

GRATIERI, Taís; GELFUSO, Guilherme Martins; LOPEZ, Renata Fonseca Vianna. Princípios básicos e aplicação da iontoforese na penetração cutânea de fármacos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1490-1498, 2008.

GOMIDE, Lígia Maria Micai et al. Cafeína e café: a dualidade entre seus efeitos tóxicos e antioxidantes. **Revista InterSaúde**, v. 1, n. 1, p. 73-85, 2019.

HADGRAFT, Jonathan. Skin, the final frontier. **International journal of pharmaceuticals**, v. 224, n. 1-2, p. 1-18, 2001.

HARRIS, Maria Inês Nogueira de Camargo. **Pele: Estrutura, Propriedade E Envelhecimento**. 2. Ed. Senac, 2005

KALIA, Yogeshvar N. et al. Iontophoretic drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 56, n. 5, p. 619-658, 2004.

KISHISHITA, Juliana. **Desenvolvimento e avaliação biofarmacotécnica/farmacodinâmica de formulações tópicas contendo betametasona**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

KRUPEK, Tuane et al. Mecanismo de ação de compostos utilizados na cosmética para o tratamento da gordura localizada e da celulite. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 3, 2012.

KUROKAWA, Ichiro; OISO, Naoki; KAWADA, Akira. Adjuvant alternative treatment with chemical peeling and subsequent iontophoresis for postinflammatory hyperpigmentation, erosion with inflamed red papules and non-inflamed atrophic scars in acne vulgaris. **The Journal of dermatology**, v. 44, n. 4, p. 401-405, 2016.

LEITE, F. O.; SOUZA, T. V.; RIBAS, E. S.; FRANCESCONI, E. P. M. S.; BIGHETTI, A. E. Evaluated of esthetical methods to reduce localized fat in sedentary women. **Scientific Electronic Archives**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 73–77, 2017.

LIS, Celina Cristiane et al. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de um gel contendo cafeína. **Revista saúde e desenvolvimento**, v. 13, n. 16, 2019.

LONGO, Daniela Paula. **Obtenção, caracterização e estudo de liberação in vitro e permeação in vivo de sistemas microestruturados contendo cafeína**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2006.

MA, Huixian et al. A novel topical targeting system of caffeine microemulsion for inhibiting UVB-induced skin tumor: characterization, optimization, and evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 16, n. 4, p. 905-913, 2015.

MAIA, Tiago César dos Santos. **Liberação e permeação dérmica in vitro de hidrogel de cafeína em comparação ao uso de papaína como promotora de permeação**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2018.

MONTEIRO E SILVA, Silas Arandas et al. Target action of antioxidants using iontophoresis. **Journal of cosmetic dermatology**, v. 20, n. 2, p. 664-676, 2021.

MORAIS, Gilsane Garcia. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite)**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2006.

MOSER, Katrin et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European journal of pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 52, n. 2, p. 103-112, 2001.

NELSON, Roger M. HAYES Karen. W.; CURRIER, Dean. P. **Eletroterapia clínica**. 3. Ed. Manole, 2003.

NEMEN, Daiane. **Sistemas nanoestruturados lipídicos contendo resveratrol: preparação, caracterização e avaliação da penetração cutânea**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

OECD. **Guideline for the testing of chemicals**, no 428. Skin Absorption: in vitro Method, Paris, France, 2004.

OLIVEIRA, A. S.; GUARATINI, M. I. CASTRO, C. E. S. Fundamentação teórica para iontoforese. **Rev Bras Fisioter**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2005.

OLIVEIRA, Ângela Zélia Moreira de. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. Dissertação de mestrado em tecnologia farmacêutica, Universidade do Porto. 2009.

ROSA, Juliana. **Modulação da solubilidade e permeação cutânea da isoniazida através da cocrystalização com coformadores" inteligentes"**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

ROSADO, Catarina et al. Another reason for using caffeine in dermocosmetics: sunscreen adjuvant. **Frontiers in physiology**, v. 10, p. 519, 2019.

RIBEIRO, Célia Pereira. **Benefícios da cafeína na terapêutica**. Tese de Mestrado. Instituto Superior De Ciências Da Saúde Egas Moniz, 2013.

SANTANA, Regiane Cristina Moi Cunha. **Envelhecimento do sistema tegumentar: revisão sistemática da literatura**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2004.

SANTOS, Gustavo Augusto Pereira dos. **Utilização dos métodos alternativos no desenvolvimento e avaliação de formas farmacêuticas dermatológicas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

SANTOS, Paloma Oliveira; MIYASHIRO, P. Y.; SILVA, V. A. A nanotecnologia em formulação cosmética. **São Paulo: FMU**, 2015.

SAVEGNAGO, Winnie Prado. **Eficácia e segurança da mesoterapia no tratamento da lipodistrofia localizada com foco no uso do desoxicolato de sódio e fosfatidilcolina**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2019.

SEGRE, Marco; FERRAZ, Flávio Carvalho. O conceito de saúde. **Revista de saúde pública**, v. 31, p. 538-542, 1997.

SEIXAS, Karoline Belém. **Avaliação de formulações tópicas contendo metronidazol e lapachol sob a ótica dos métodos alternativos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, 2018

SHUKLA, Tripti et al. Biomedical applications of microemulsion through dermal and transdermal route. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 108, p. 1477-1494, 2018.

SOUTO, Eliana B.; SEVERINO, Patrícia; SANTANA, Maria Helena A. Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, p. 101-106, 2012.

TANO, Clara Tsugumi Nakamura. **Avaliação histológica do tecido adiposo da pele de ratas sob ação de cafeína e Cafeisilane® C**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2003

TASSINARY, João Alberto et al. Avaliação dos efeitos do ultrassom terapêutico sobre a cafeína e verificação da liberação em sistema de difusão vertical. **Química Nova**, v. 34, p. 1539-1543, 2011.

TEAIMA, Mahmoud H. et al. Non-ionic surfactant based vesicular drug delivery system for topical delivery of caffeine for treatment of cellulite: design, formulation, characterization, histological anti-cellulite activity, and pharmacokinetic evaluation. **Drug development and industrial pharmacy**, v. 44, n. 1, p. 158-171, 2017.

TORRES, Kelly De Abreu; FERREIRA, Lilian De Abreu. Ativos cosméticos para o tratamento da lipodistrofia ginóide e adiposidade localizada. **Psicologia e Saúde em debate**, v. 3, n. 2, p. 115-130, 2017.

TROTTA, Michele et al. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. **Journal of Controlled Release**, v. 76, n. 1-2, p. 119-128, 2001.

TROTTA, Michele et al. Preparation of griseofulvin nanoparticles from water-dilutable microemulsions. **International journal of pharmaceutics**, v. 254, n. 2, p. 235-242, 2003.

TROTTA, Michele; DEBERNARDI, Francesca; CAPUTO, Otto. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. **International journal of pharmaceutics**, v. 257, n. 1-2, p. 153-160, 2003.

VIANNA, Damiana R.; SILVA, Bárbara V.; HAMERSKI, Lidilhone. Eletroporação e iontoforese para liberação de fármacos através da pele. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 4, p. 271-279, 2010.

VOGEL, Eliane Maria et al. **Avaliação da qualidade de cosméticos com ativo cafeína em bases galênicas gel e creme elaborado por farmácias magistrais na cidade de Campo Mourão-PR.** 2020. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

ZEN, Bianca Steffen et al. **Desenvolvimento e avaliação da permeação e retenção cutânea de sistemas nanoemulsionados do ácido linoléico conjugado (CLA).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ZYCHAR, Bianca Cestari; KATAOKA, V. Y.; AUDI, C. A prospecção da nanotecnologia cosmética no setor da estética e suas principais nanoestruturas. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 4, n. 4, p. 1-19, 2016.