UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica.

Elizabeth Ramos Romero

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosmético.

Orientada: Elizabeth Ramos Romero
Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Ribeirão Preto

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ramos Romero, Elizabeth

Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica. 2017

131 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

1. Emulsões 2. Óleo de buriti 3. Óleo de cenoura.
4. Óleo de urucum 5. Acne 6. Ácido salicílico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Elizabeth Ramos Romero

Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica. 2017

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientador (a): Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*A minha família, que desde a distância me
acompanham com seu infinito amor,
são as rosas de meu coração.*

*In memoriam
Adolfo Romero.
“Comenzamos este viaje juntos”*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu *Ser Superior*, por dar a força e sabedoria para continuar todas as vezes que eu quis desistir.

Aos meus amados pais *Maria Nieves e Epaminondas*, e meus irmãos *Clara Patrícia e Carlos Alberto*, por ter uma palavra de motivadora, por seu constante amor, por vencer comigo muitos medos, por acreditar em mim sempre.

À *Embaixada do Brasil* por providenciar as provas e documentos para fazer mestrado.

À *Faculdade de Ciências Farmacêuticas* da Universidade de São Paulo (USP-RP) pela ajuda dada, e a oportunidade.

À *CAPES* pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador *Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha-Filho*, por abrir as portas de seu laboratório para uma estrangeira e por suas orientações acadêmicas e compreensão nas provas difíceis que a vida colocou para mim.

A *Maria Teresa Paez*, pela ajuda e colaboração durante o processo de mestrado.

Ao grupo de pesquisa *Kosmos*, pela ajuda e bom ambiente de trabalho, *Matheus Attademo* aluno de iniciação científica pela ajuda na construção deste trabalho. As meninas do grupo, por ensinar, corrigir meu português, pelas conversas e bons momentos.

Ao técnico *Eduardo Bortolin*, por ajudar sempre com os materiais e equipamentos que precisei para fazer este projeto, mas sobre tudo por ser meu amigo, minha família no Brasil, um sorriso e um abraço nunca faltou para mim.

Ao *Laboratório grupo de estabilidade de medicamentos, cosméticos e alimentos* da Faculdade de Química Farmacêutica e Alimentarias da *Universidade de Antioquia* em Medellín, Colômbia; *Susana Durango* pela colaboração na execução do meu trabalho.

Ao Laboratório *LAPROFAR* da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto (USP-RP), pela disposição para realizar parte de meu trabalho com vocês.

A *Prof. Dra. Nieve Aracari Jacometti* e à técnica *Angelica Chellegatti* pela disposição para me ajudar, abrir as portas de seu laboratório e realizar com muito amor os experimentos que foram precisos para este trabalho.

Aos amigos latino-americanos, pela amizade, horas de conversa em nosso espanhol e compartilhar longe de casa nossas culturas, em especial *Gretel Rodriguez* minha irmã cubana e *Ricardo Rubio* sempre dando um apoio para mim e para minha família.

E a todos que contribuíram direta e indiretamente para realizar e apoiar-me neste trabalho.

Obrigada!

“Mi alma me habló y dijo: "No te alegres con el elogio y no te angusties con el reproche." Antes de que mi alma me aconsejara yo dudaba del mérito de mi trabajo. Ahora me doy cuenta de que los árboles florecen en primavera y dan sus frutos en verano sin esperar elogio, y dejan caer sus hojas en otoño y quedan desnudos en invierno sin temor al reproche. Mi alma me habló y me hizo ver que no soy más que el enano ni menos que el gigante. Antes de que mi alma me hablara yo veía a la humanidad dividida en dos clases de hombres: una débil, de la que me compadecía, y una fuerte, a la que seguía o resistía desafiante. Pero ahora aprendí que soy como ambos y estoy hecho de los mismos elementos. Mi origen es su origen, mi conciencia es su conciencia, mi pretensión su pretensión y mi peregrinaje su peregrinaje”.

Khalil Gibran.

RESUMO

RAMOS R. E. Pesquisa e desenvolvimento de emulsões à base de óleos vegetais (buriti, cenoura e urucum) e bases auto emulsionantes aditivadas de óleo de melaleuca e ácido salicílico para o tratamento de pele acneica. 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A acne é uma doença que afeta uma porcentagem elevada do mundo de população, aspectos como o estresse, distúrbios hormonais, alimentação e poluição ambiental podem começar a desencadear esta doença que não só afeta a pele, mas também pode afetar a autoestima dos doentes ; em busca de alternativas que pode combater este problema e que seja benéfico para a pele impedindo efeitos nocivos, se começou a usar produtos de origem vegetal, a fim de reduzir dos produtos da acne como o excessivo ressecamento da pele; como uma nova alternativa, se trabalhou com óleos de buriti (*Mauritia flexuosa*), cenoura (*Daucus carota*) e urucum (*Bixa orellana*) que em diferentes culturas principalmente da área da Amazônia, são usados estes óleos como adstringente, antibacteriano e cicatrizantes, essas propriedades em conjunto com as propriedades queratolíticas do ácido salicílico a ação antibacteriana do óleo de melaleuca podem gerar um produto eficaz no tratamento da acne.

Características como a capacidade antioxidante dos óleos são avaliadas já que moléculas com estas propriedades podem enfraquecer as bactérias que causam acne, para isso foi realizada a metodologia Folin Ciocalteu e ABTS que permite determinar a quantidade de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante respectivamente; subsequentemente foi desenvolvida a formulação através da metodologia do diagrama ternário para determinar a existência de diferenças no comportamento de cada um dos óleos nas emulsões quanto às formas cosméticas originadas; em seguida, foi avaliado o comportamento da formulação com a mistura de óleos (buriti, cenoura e urucum) comparado com uma formulação que além da mistura de óleos, contém ácido salicílico e óleo de melaleuca, onde foi determinada diferenças físico-químicas (pH, condutividade, viscosidade), o estudo é feito por 90 dias. Para determinar a forma de uso da formulação foi desenvolvido o teste de espalhabilidade através da técnica das placas de vidro e placas de vidro em superfície áspera para o qual foi usado papel lixa de diferentes calibres, as formulações elaboradas foram comparadas com produtos comerciais onde foi observado a difusão das diferentes formulações em várias superfícies que permite dar uma ideia da quantidade e da força de cisalhamento que precisam os produtos para cobrir um área dependendo das condições desta área e da forma cosmética. Outra propriedade que foi avaliada foi o potencial queratolítico das formulações feitas em comparação com produtos comerciais e um agente cicatrizante, cuja finalidade é demonstrar a capacidade do ácido salicílico na dissociação das fibras de colágeno e queratina. Finalmente, é avaliada o potencial antimicrobiano das formulações através da técnica de microdiluição em microplacas sobre os microrganismos causadores da acne (*Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*) onde é comparado a eficácia delas formulações com produtos que encontrados no mercado.

ABSTRACT

RAMOS R.E. Research and development of emulsions composed by vegetable oils (buriti, carrot and annatto) and bases self emulsifying additivated of melaleuca oil and salicylic acid for the treatment of acneic skin. 2017. 128 f. Dissertation (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto. University of São Paulo, Ribeirão Preto.

Acne is a disease that affects a high percentage of the world population, issues such as stress, hormonal disorders, food and environmental pollution may begin to unleash this disease that not only affects the skin, but can also affect the self-esteem of patients; in search of alternatives that can combat this problem and that is beneficial to the skin by preventing harmful effects, if you started using products of vegetable origin, in order to reduce acne products like the excessive dryness of the skin; as a new alternative, if worked with oils of moriche Palm (*Mauritia flexuosa*), carrot (*Daucus carota*) and annatto (*Bixa Orellana*) that in different cultures mainly in the area of the Amazon, these oils are used as an astringent, antibacterial and healing, these properties in conjunction with the queratolíticas properties of salicylic acid on antibacterial action of tea tree oil can generate a product effective in the treatment of acne.

Characteristics such as the antioxidant capacity of the oils are evaluated since molecules with these properties can weaken the bacteria that cause acne, for this was carried out the methodology Folin Ciocalteu and ABTS that allows to determine the amount of phenolic compounds and the antioxidant capacity respectively, subsequently was developed through formulation of the methodology of the ternary diagram to determine the existence of differences in the behavior of each of the oils in the emulsions as at cosmetic forms originated; then, was evaluated the behavior of the formulation with the mixture of oils (buriti, carrot and annatto) compared with a formulation that in addition to the mixture of oils, contains salicylic acid and tea tree oil, where it was determined physicochemical differences (pH, conductivity, viscosity), the study and made by 90 days. In order to determine the form of use of the formulation, the spreadability test was done through the technique of glass plates and glass plates on rough surface for which sandpaper of different profiles was used, the formulations developed were compared with commercial products where diffusion of the various formulations on various surfaces was observed which gives an idea of the amount and shear force needed by the products to cover an area depending on the conditions of area and the cosmetic form. Another property that was evaluated was the keratolytic potential formulations in comparison with commercial products and a healing agent, whose purpose is to demonstrate the ability of salicylic acid in the decoupling of collagen fibers and keratin. Finally, we evaluated the potential of antimicrobial formulations through the technique of microdilution in Microplates on the microorganisms causing acne (*Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*) compared the effectiveness of these formulations with products found on the market.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Secção transversal da pele e anexos.....	4
Figura 2: Representação histológica dos estágios da diferenciação da epiderme	5
Figura 3: Tipos de pele comuns.....	17
Figura 4: Tipos de pele segundo Baumann.	17
Figura 5:Esquema das variadas formas da acne.	19
Figura 6:Tipos de emulsão.	23
Figura 7: Mecanismos de instabilidade de emulsões	24
Figura 8 : A árvore de Melaleuca alternifolia.....	28
Figura 9: A palma de buriti.....	29
Figura 10: A árvore de urucum.....	31
Figura 11: Mecanismo de ação do reativo de Folin Ciocalteu	41
Figura 12: Estabilização do ABTS + por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	43
Figura 13: Diagrama ternário para o desenvolvimento das emulsões.	45
Figura 14: Representação esquemática do ensaio de espalhabilidade.....	47
Figura 15: Curva de calibração com ácido gálico para o método Folin Ciocalteu.....	55
Figura 16: Curva de calibração método ABTS.	56
Figura 17: Determinação ponto de kraft para os diferentes autoemulsionantes.....	57
Figura 18: Regiões características do diagrama ternário.....	58
Figura 19: Área de formação de emulsões para os três auto emulsionantes e mistura de óleos.	59
Figura 20: Área considerada para realizar formulações do diagrama pseudoternário	59

Figura 21: Condutividade elétrica da amostra 36.6 durante teste de estabilidade acelerada....	66
Figura 22: Condutividade elétrica da amostra EF durante teste de estabilidade acelerada.	66
Figura 23: Valores de pH para amostra 36.6 durante teste de estabilidade acelerada.....	67
Figura 24: Valores de pH para amostra EF durante teste de estabilidade acelerada	67
Figura 25: Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada da formulação EF em diferentes temperaturas	69
Figura 26: Comportamento da viscosidade durante o teste de estabilidade acelerada da formulação EF em diferentes temperaturas.	70
Figura 27: Comparação dos valores de área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de vidro	73
Figura 28: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 1200	73
Figura 29: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 600	73
Figura 30: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 320	74
Figura 31: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 220	74
Figura 32: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de vidro	76
Figura 33: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa calibre 1200	77
Figura 34: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa calibre 600	77
Figura 35: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa de 320	77

Figura 36: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa de calibre 220.....	77
Figura 37: Reação de ácido salicílico com sais de ferro.....	80
Figura 38: Reação das amostras com ácido salicílico com sais de ferro.	81
Figura 39: Células de gelatina depois 24 horas depois de colocar as diferentes amostras testadas.	81
Figura 40: Valores das aberturas da gelatina nas diferentes amostras testadas.....	82
Figura 41: Amostra 2 (EF) e 5 (produto colombiano) em presença de sais de ferro.	82
Figura 42: placas com P. acnes em presença de resazurina 0,02% para as diferentes amostras.	84
Figura 43: Placas com S. epidermidis em presença de resazurina 0,02% para as diferentes amostras.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição lipídica do estrato córneo	8
Tabela 2- Proporções dos reagentes para elaboração da curva de calibração para o método de Folin Ciocalteu.....	42
Tabela 3- Proporções para curva de calibração método ABTS.....	43
Tabela 4 - Composição da célula de gelatina.	49
Tabela 5 -Resultados Folin Ciocalteu.....	55
Tabela 6 -Resultados da atividade antioxidante equivalente a trolox	56
Tabela 7- Composição das formulações do diagrama pseudoternario	60
Tabela 8 -Proporções das formulações estáveis	60
Tabela 9 -Formulações com adição de óleo de mealeuca	61
Tabela 10 -Formulações com óleo de melaleuca e ácido salicílico.....	62
Tabela 11 -Composição formulação final (EF)	63
Tabela 12 -Resultados para teste preliminares de estabilidade das formulações EF e 36.6.	63
Tabela 13 -Resultados para teste de estresse térmico das formulações EF e 36.6.	64
Tabela 14 -Resultados para ciclo gela desgela formulações EF e 36.6.	65
Tabela 15 -Tipos de lixa e tamanho de grânulo	71
Tabela 16 -Formulações comerciais avaliadas no teste de espalhabilidade	72
Tabela 17 -Ordem decrescente de espalhabilidade para os produtos testados em diferentes superfícies	75
Tabela 18 -Formulações para avaliação de espalhabilidade, aditivada de emolientes e/ou umectantes.	76

Tabela 19 -Ordem de maior a menor área para as formulações testadas em diferentes superfícies.....	78
Tabela 20 -Comparação entre os aminoácidos de colágeno e queratina	79
Tabela 21 -Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das diferentes amostras para <i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 6919.....	84
Tabela 22 -Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das diferentes amostras para <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 12228	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% m/m	Porcentagem massa em massa
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água em óleo
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação,
CATEC	Câmara Técnica de Cosméticos
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECM	<i>Extra Celular Matrix</i> (Estrutura de Matriz Extracelular)
EF	Formulação com óleos de buriti, cenoura e urucum, aditivada de ácido salicílico óleo de melaleuca
EPI	<i>Emulsion phase inversion</i>
FPS	Fator de proteção solar
FE	Formação de emulsão
FS	Formação de sólido
INCI	<i>International Nomenclature of Cosmetics Ingredients</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MH	Mueller Hinton
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standart</i>
NMF	<i>Natural Moisturizing Factor</i>
O/A	Óleo em água
SEB	<i>Self Emulsifying Bases</i>
SF	Separação de fases

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Pele.....	4
2.1.1 Epiderme.....	5
2.1.1.1 Queratinócitos.....	6
2.1.1.2 Camada basal.....	6
2.1.1.3 Camada escamosa.....	6
2.1.1.4 Camada granulosa.....	7
2.1.1.5 Camada córnea	8
2.1.1.6 Regulação da proliferação e diferenciação celular	9
2.1.1.7 Melanócitos	9
2.1.1.8 Junção epiderme- derme.....	10
2.1.1.9 Apêndices epidérmicos.....	10
2.1.1.10 Glândulas sudoríparas écrinas	11
2.1.1.11 Glândulas sudoríparas apócrinas	11
2.1.1.12 Cabelos	11
2.1.1.13 Glândulas sebáceas	12
2.1.2 Derme	12
2.1.2.1 Circulação.....	14
2.1.2.2 Músculos.....	14
2.1.2.3 Nervos.....	14
2.1.2.4 Mastócitos.....	15
2.1.3 Hipoderme (panículo)	15
2.1.4 Tipos de Pele	15

2.2 Acne	18
2.2.1 Manifestações.....	18
2.2.2 Classificação	19
2.2.3 Tratamento	19
2.3 Emulsões	22
2.4 Óleos vegetais	26
2.4.1 Óleo de Melaleuca alternifolia	27
2.4.2 Buriti	28
2.4.3 Cenoura	29
2.4.4 Urucum.....	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 Objetivos específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 MATERIAL	33
4.1.1 Fase oleosa	33
4.1.2 Fase aquosa.	34
4.1.3 Bases auto emulsionantes (Self Emulsifying Bases- SEB).....	34
4.1.4. Conservantes	36
4.1.5 Antioxidante.....	36
4.1.6 Agente de neutralização	36
4.1.7Aditivos	36
4.1.8 Células de gelatina	38
4.1.5 Reativos para testes de antioxidante.	39

4.2 MÉTODOS	41
4.2.1 Quantificação de fenóis totais	41
4.2.1.1 Curva de calibração	41
4.2.1.2 Preparo das amostras	42
4.2.2 Atividade antioxidante	42
4.2.2.1 Curva de calibração	43
4.2.2.2 Preparo das amostras	44
4.2.3 Determinação do Ponto Krafft	44
4.2.4 Desenvolvimento da emulsão	44
4.2.4.1 Obtenção das emulsões	44
4.2.4.2 Diagrama ternário	45
4.2.5 Análise macroscópica das formulações	45
4.2.6 Testes preliminares de estabilidade da emulsão	45
4.2.6.1 Teste de centrifugação	46
4.2.6.2 Determinação do valor de pH	46
4.2.6.3 Estresse térmico	46
4.2.7 Ciclo gela degela	46
4.2.8 Estabilidade acelerada	47
4.2.9 Comportamento Reológico	47
4.2.10 Avaliação da espalhabilidade	47
4.2.11 Avaliação da atividade queratolítica	48
4.2.12 Análises microbiológicas	49

4.2.12.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para <i>Propionibacterium acnes</i>	49
4.2.12.1.1 Preparo das amostras.....	49
4.2.12.1.2 Micro-organismos utilizados.....	50
4.2.12.1.3 Preparo do inóculo.	50
4.2.12.1.4 Preparo do padrão utilizado como controle positivo.....	50
4.2.12.1.5 Preparo da solução reveladora.	50
4.2.12.1.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras.....	50
4.2.12.1.7 Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático.....	51
4.2.12.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	51
4.2.12.2.1 Preparo das amostras.....	51
4.2.12.2.2 Micro-organismos utilizados.....	52
4.2.12.2.3 Preparo do inóculo	52
4.2.12.2.4 Preparo do antibiótico padrão utilizado como controle positivo	52
4.2.12.2.5 Preparo da solução reveladora	52
4.2.12.2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras.....	52
4.2.12.2.7 Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático.....	53
4.2.13 Análise estatística.....	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1 Determinação da capacidade antioxidante dos óleos vegetais	54
5.1.1 Quantificação de fenóis totais.	54
5.1.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS	55

5.2 Determinação do ponto de Kraft	57
5.3 Obtenção das emulsões	58
5.4 Análise macroscópica.....	60
5.5 Adição de outros compostos	60
5.6 Testes preliminares de estabilidade.....	63
5.7 Ciclos gela-degela	64
5.8 Estabilidade acelerada	65
5.9 Condutividade elétrica	65
5.10 Valores de pH.....	66
5.11 Determinações do comportamento reológico e viscosidade	68
5.12 Avaliações de espalhabilidade.	71
5.13 Avaliação de capacidade queratolítica	78
5.14 Análise microbiológica	83
5.14.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para <i>Propionibacterium acnes</i>	83
5.14.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para <i>Staphylococcus epidermidis</i>	84
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERENCIAS	88
APÊNDICE A	103
APÊNDICE B	104
APÊNDICE C	105

1 INTRODUÇÃO

A indústria de produtos naturais ou à base de produtos naturais encontra-se mundialmente em expansão. No caso específico de cosméticos naturais ou à base de cosméticos naturais, ainda não há problemas de excesso de demanda ou carência de produtos para suprir o mercado. No que se refere aos cosméticos que apresentam ingredientes naturais em sua composição, (ou seja, aqueles cuja produção envolve uso de recursos da biodiversidade brasileira – notadamente da Amazônia), estes têm despertado muito interesse por parte de empresas e consumidores nacionais e internacionais. Assim, entidades públicas e privadas têm reunido esforços para empreender pesquisas no sentido de desenvolver produtos que atendam à crescente demanda. Hoje em dia, alguns dos ingredientes naturais mais procurados para a fabricação de cosméticos naturais são: Óleo de sementes de Maracujá (*Passiflora*); Óleo de Andiroba (*Carapa guianensis*); Óleo de Buriti (*Mauritia venifera*); Óleo de Castanha-do-pará (*Bertholletia Excelsa*); Óleo de Copaíba (*Copaífera officinalis*); Óleo de Pracaxi (*Pentaclethra Filamentosa*); Manteiga de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*); Manteiga de Muru-Muru (*Astrocarium murumuru*); Manteiga de Ucuúba (*Virola sebifera*); e Mel e derivados (ANVISA, 2009).

Atualmente, conforme a Câmara Técnica de Cosméticos (CATEC), na Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, a definição de cosméticos no Brasil é a seguinte:

[...] Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (SEBRAE, 2008).

A definição adotada pelo Mercosul, através da Resolução nº 07 de 2005 é essencialmente a mesma definição de cosmético adotada pela União Européia (UE):

[...] Produtos para higiene pessoal, cosméticos, perfumes e as substâncias ou preparados formados por substâncias naturais e sintéticas, e suas misturas, para uso externo em diversas partes exteriores do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos

genitais externos, dentes e as membranas mucosas da cavidade bucal, com o exclusivo ou principal objetivo de limpar, perfumar, alterar a aparência e/ou corrigir odores corporais e/ou protegê-los e mantê-los em boas condições.

De acordo com a Resolução RDC nº 211, de 14 de julho de 2005, os produtos cosméticos são classificados em dois tipos:

Produtos Grau 1: São produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que se caracterizam por possuírem propriedades básicas ou elementares, cuja comprovação não seja inicialmente necessária e não requeiram informações detalhadas quanto ao seu modo de usar e suas restrições de uso, devido às características intrínsecas do produto.

Produtos Grau 2: São produtos de higiene pessoal cosméticos e perfumes cuja formulação cumpre com a definição adotada no item 1 do Anexo I desta Resolução e que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso.

O termo cosmecêutico foi criado, em 1984, pelo médico americano Albert M. Kligman (FAGUNDES, 2010) na intenção de conciliar a ciência moderna com alguns estatutos legais arcaicos. Hoje, segundo o autor, com os grandes avanços obtidos em pesquisas sobre a fisiologia da pele, é impossível não existir uma única substância que, em determinadas circunstâncias, não seja capaz de alterar a estrutura ou a função da pele. No mercado de produtos para cuidados pessoais, a palavra cosmecêutico pode significar dermocosmético, cosmético funcional, cosmético de desempenho ou, mesmo, neurocosmético. Esses termos causam controvérsia e confundem os consumidores. Então, em linhas gerais, cosmecêutico pode ser definido como um produto que combina os benefícios de um cosmético com um produto farmacêutico (FAGUNDES, 2010).

Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o termo cosmecêutico descreve os cosméticos que contêm ingredientes que são bioativos, ou seja, cuja eficácia foi avaliada e comprovada através de vários estudos e possuem propriedades terapêuticas, de combate a doenças ou problemas estéticos. Utilizam ativos cuja interação com o organismo é maior e comprovada e podem ser prescritos em formulações médicas individuais. Servem como uma ponte entre os produtos de cuidados pessoais e farmacêuticos (MACEDO, 2014).

No entanto o próprio Kligman afirma que:

O controle sobre a criação do termo se perdeu, já que tornou-se de uso comum no mundo encantado dos marqueteiros e possibilitou a incorporação de um número

ilimitado de ingredientes ativos de diferentes origens aos produtos de tratamento de pele, além de agregar aos cosméticos uma linguagem inteligente de marketing (FAGUNDES, 2010).

Mais conscientes a respeito de questões ambientais e de saúde, consumidores buscam produtos de beleza naturais e sustentáveis. A busca de novos princípios ativos (as substâncias que de fato têm algum efeito sobre a pele) aumentou na última década. Com a sofisticação das pesquisas, adquiriu-se também mais conhecimento sobre o que realmente funciona nos produtos que se propõem a tratar a pele, obtendo maior benefício nos tratamentos estéticos.

Atualmente o Brasil é o terceiro maior consumidor de produtos cosméticos, ultrapassando o Japão e reconhecidos mercados europeus- Alemanha, Inglaterra e França. Neste mercado interno os produtos para o cuidado da pele ocupam a sexta posição (ABIHPEC, 2015).

Os brasileiros estão cada vez mais preocupados com a preservação do ambiente, optando por produtos naturais e menos prejudiciais à natureza. Os produtos orgânicos que mais agradam são os de uso diário, como cremes para o corpo, sabonetes, shampoos e hidratantes. As substâncias naturais, quando utilizadas diariamente, contribuem de maneira significativa com a sustentabilidade.

A proposta desta pesquisa foi o desenvolvimento de produto cosmético para o cuidado da pele, contendo óleos vegetais da biodiversidade brasileira, como buriti, cenoura e urucum que além de atividade antioxidante e são reconhecidos como protetores solares. À dispersão desenvolvida adicionou-se óleo de melaleuca com atividade antimicrobiana e na etapa final, foi adicionado ácido salicílico. Desta forma o produto final indicado para o tratamento da acne, protege a pele da radiação ultravioleta e pode ser reconhecido como cosmecêutico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano perfazendo cerca de 15% do peso total do corpo humano. Desempenha muitas funções vitais incluindo proteção contra agentes externos físicos, químicos e biológicos, assim como evita a perda excessiva de água exercendo atividade termoregulatória. O sistema tegumentar é formado pela pele e anexos (figura 1). A pele é composta de três camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo.

A epiderme, camada mais externa, é constituída por células específicas os queratinócitos, preenchidas por queratina que desempenha função protetora.

A derme, camada intermediária é constituída fundamentalmente de proteínas estruturais fibrilares, como colágeno. A derme interliga a epiderme com o tecido subcutâneo- o panículo, que contém células gordurosas conhecidas como lipócitos.

A espessura destas camadas depende da região anatômica, por exemplo, nas pálpebras é menor do que 0,1mm enquanto na palma das mãos e solas dos pés a espessura da camada epidérmica é de aproximadamente 1,5 mm.

Figura 1: Secção transversal da pele e anexos
(Baseado em: KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011)

2.1.1 Epiderme

A epiderme é uma camada estratificada composta de dois tipos de células: queratinócitos e dendríticas. Os queratinócitos possuem pontes intercelulares e grande volume citoplasmático, ao contrário das células dendríticas. Além destas, a epiderme apresenta outras células como melanócitos, Langerhans, Merkel, sendo os queratinócitos a maior população celular desta camada. Normalmente a epiderme é dividida em quatro camadas considerando a morfologia e posição dos queratinócitos: camada basal (estrato germinativo), camada escamosa (estrato escamoso), camada granulosa (estrato granuloso) e camada córnea (estrato córneo). A camada mais interna, ligada à derme, constitui-se de células nucleadas. Estas três camadas mais internas da epiderme são também denominadas de estrato de Malpighi (figura 2).

A epiderme é uma camada continuamente renovada em seus constituintes e nela encontra-se ainda as aberturas de anexos cutâneos como glândulas sebáceas e sudoríparas, folículo piloso e ainda as unhas. As células da camada basal apresentam intensa proliferação exteriorizando-se e proporcionam a renovação da camada epitelial.

Figura 2: Representação histológica dos estágios da diferenciação da epiderme
(Baseado em: KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011)

2.1.1.1 Queratinócitos

No mínimo 80% das células na epiderme são derivadas de queratinócitos. O processo de diferenciação é devido à migração das células da camada basal para a superfície da pele promovendo a queratinização, um processo no qual os queratinócitos são preenchidos por queratina.

Primeiramente são elaborados filamentos de queratina organizados em alfa hélice, útil para a formação da célula. Um grupo de filamentos se converge em direção à membrana plasmática, originando os desmossomos. Ainda durante a queratinização, organelas celulares são eliminadas, o conteúdo celular é solidificado, originando envelope celular e a célula é conhecida finalmente como queratinócito. Este processo também é conhecido como diferenciação terminal.

2.1.1.2 Camada basal

Também conhecida como estrato germinativo, as células basais formam uma única camada aderidas umas às outras assim como às células da camada escamosa através de junções desmossomais. Os núcleos de cor escura e de forma oval ou alongada estão presentes, assim como a presença de melanina originária de melanócitos presentes em camadas adjacentes. Porém, nem todas as células desta camada têm o potencial de divisão. As células reproduzem-se lentamente em condições normais. No caso de processos de cicatrização a velocidade de divisão pode ser maior visando a recuperação do tecido. Normalmente a migração as células basais acontecem no período de 14 dias.

2.1.1.3 Camada escamosa

Sobrepondo-se a camada de células basais esta uma camada de 5-10 células de espessura e conhecida como a camada de células escamosas ou estrato espinhoso. A camada escamosa é composta por uma variedade de células que diferem na forma, estrutura e propriedades subcelulares, dependendo da sua localização. Células espinhosas suprabasal, por exemplo, são poliédricas e tem um núcleo arredondado, enquanto que as células das camadas espinhosas superiores são geralmente maiores em tamanho, tornam-se mais plana à medida que são empurradas para a superfície da pele, e contêm grânulos lamelares. Estes grânulos contêm glicoproteínas, glicolípidos, fosfolípidos, esteróis livres e hidrolases ácidas, incluindo proteases, lipases, fosfatases ácidas, e glicosidases. A abundância de enzimas hidrolíticas indica que os grânulos lamelares são um tipo de lisossoma. Embora os grânulos lamelares são principalmente ativos em células na interface entre camada granulosa e cornificadas, atuam

também em células da camada espinhosa superior para fornecer precursores de lípidos do estrato córneo para o espaço intercelular. Espaços intercelulares entre as células espinhosas são interligadas por desmossomos que promovem a ligação mecânica entre as células da epiderme e proporcionam resistência aos estresses físicos. Organizados de forma concêntrica em torno do núcleo, os filamentos de queratina no citoplasma estão conectados às placas desmossômicas em uma extremidade e permanecem livres na extremidade mais perto do núcleo. As placas desmossômicas são compostas por seis polipeptídeos encontrados no lado citoplasmático da membrana celular que são importantes na regulação do cálcio necessário para a preparação e manutenção desmossomal. Devido à aparência das margens de células como espinhos é que deu-se o nome de estrato espinhoso ao mesmo. Ligações junções comunicantes são Outro tipo de conexão entre as células epidérmicas ocorrem através de ligações comunicantes, essencialmente formando um poro intercelular, que permitem a comunicação fisiológica através de sinais químicos que é vital na regulação do metabolismo celular, crescimento e diferenciação.

2.1.1.4 Camada granulosa

É a camada mais superficial da epiderme contendo células vivas, composta por células achatadas contendo grânulos queratoialina no seu citoplasma. Estas células são responsáveis pela síntese e modificação de proteínas envolvidas em queratinização. A camada granular varia em espessura em proporção à da camada de células sobrejacente córnea. Por exemplo, em regiões de pele fina a camada granular pode ter apenas 1-3 camadas de células de espessura, enquanto que em regiões como as palmas das mãos e solas dos pés a camada granular pode apresentar 10 vezes esta espessura.

Os grânulos de queratoialina são basofílicos e irregulares na forma e tamanho, e são necessários tanto para a formação da matriz interfibrilar que contém filamentos de queratina assim como para o revestimento interno das células córneas. A ação enzimática dos grânulos de queratoialina resulta na produção de queratina "macia" na epiderme. Ao contrário, nos anexos cutâneos cabelos e unhas, não há grânulos de queratoialina, e os filamentos tonofibrilares que atravessam o citoplasma da célula enrijecem devido à incorporação de ligações dissulfeto, produzindo queratina "dura" nessas estruturas. Enzimas lisossômicas presentes apenas em pequenas quantidades na no estrato basal e espinhoso são encontradas em níveis elevados no estrato granuloso, porque a camada granular é uma zona queratogênica da epiderme. Neste estrato é preparada a dissolução das organelas celulares e as células da

camada granular passam pelo processo de diferenciação terminal abrupta para uma célula córnea queratinizada.

2.1.1.5 Camada córnea

As células córneas (corneócitos) do estrato córneo proporcionam proteção mecânica à epiderme e agem como uma barreira para evitar a perda de água e invasão por substâncias estranhas. Os corneócitos, que são ricos em proteínas e com baixo teor em lípidos, são circundados por uma matriz lipídica extracelular contínua. As células grandes, lisas, em forma poliédrica perderam o núcleo durante a diferenciação terminal e tecnicamente são consideradas células mortas. As propriedades físicas e bioquímicas das células desta camada variam de acordo com a posição, a fim de promover a descamação movendo-se para fora. Por exemplo, células no meio tem uma capacidade muito maior do que aquelas de camadas mais profundas, em relação à retenção de água devido à alta concentração de aminoácidos livres encontrados no citoplasma. As células profundas também são mais densamente compactas e exibem maior variedade de anexos intercelulares do que as camadas mais superficiais. Desmosomes sofrem degradação proteolítica à medida que as células avançam para o exterior, contribuindo para a perda de corneócitos durante a descamação.

Com espessura de cerca de 30 μm o estrato córneo é essencial para a vida, sendo a principal barreira contra perda de água do corpo, assim como proteção contra agentes biológicos e químicos (KOLARSICK; KOLARSICK; GOODWIN, 2011). A tabela 1 ilustra a composição lipídica do estrato córneo de região abdominal (FRIBERG, 1990).

Tabela 1- Composição lipídica do estrato córneo

Componentes	m/m de lipídeos totais
Esteróis livre	14,0
Ácidos graxos livres	19,3
C _{14:0}	3,8
C _{16:0}	36,8
C _{16:1}	3,6
C _{18:0}	9,9
C _{18:1}	33,1
C _{18:2}	12,5
C _{20:0}	0,3

Triglicerídeos	25,2
Lipídeos apolares	16,3
Esteróis/ esteress graxos	6,1
esqualeno	6,5
alcanos	3,7
... esfingolipídeos	18,1

(Fonte: FRIBERG, 1990)

2.1.1.6 Regulação da proliferação e diferenciação celular

Considerada como tecido de regeneração, a epiderme é obrigada a manter um número constante de células e regular as interações e junções entre as células epidérmicas. Assim deve atuar na aderências entre queratinócitos, nas interações de queratinócitos e células mais internas, na adesão entre a lâmina basal e a derme subjacente, e no processo de diferenciação terminal para produzir corneócitos além de regular células em desenvolvimento ao longo da vida. A morfogênese e diferenciação epidérmica é regulado em parte pela derme subjacente, que desempenha também um papel crítico na manutenção da estrutura e função pós-natal. A interface dermo-epidérmica é também um local crítico no desenvolvimento de apêndices da pele. A manutenção de uma espessura constante da epiderme depende das propriedades intrínsecas de células epidérmicas, tais como a capacidade de sofrer apoptose, a morte celular programada. A apoptose segue um padrão ordenado de alterações morfológicas e bioquímicas que resultam em morte celular, sem prejuízo para as células vizinhas, como é frequentemente o caso em necrose. Este importante mecanismo homeostático é regulado por um certo número de moléculas de sinalização celulares, incluindo hormônios, fatores de crescimento e citocinas.

Na pele, a apoptose é importante no desenvolvimento, na regulação do número de células, na defesa contra células mutantes, vírus infectados ou danificados. A diferenciação terminal é um tipo de apoptose que evoluiu para proporcionar ao queratinócito a atividade protetora.

2.1.1.7 Melanócitos

Os melanócitos células dendríticas, presentes na pele predominantemente na camada basal. Estão em contato com os queratinócitos a partir de ramificação sem que ocorra junções celulares. São responsáveis pela produção do pigmento melanina e a sua transferência para os queratinócitos. A melanina é produzida em uma organela arredondada, ligada à membrana,

conhecido como melanossoma através de uma série de reações mediadas por receptores estimulados por hormônios e catalisadas por enzimas. Ao final do processo de formação dos melanócitos, os melanossomas são transferidos para os melanócitos que se encontram mais próximo da superfície da pele e daí aos queratinócitos.

Em indivíduos de pele branca, estes melanossomas estão agregados em complexos que contêm dois ou três melanossomas, enquanto em indivíduos de pele escura os melanossomas tendem a serem removidos mais rapidamente a partir destes complexos. A pele intensamente pigmentada pode ser atribuída à maior produção de melanossomas nos melanócitos, ao grau mais elevado de melanização em cada melanossoma, ao tamanho maior dos melanossomas, à maior quantidade de dispersão dos melanossomas nos queratinócitos, e à taxa mais lenta de degradação do melanossoma em comparação ao tipo de pele mais clara.

O aumento à exposição à luz ultravioleta promove aumento na melanogênese com correspondente aumento na transferência de melanossomas para os queratinócitos onde estarão agregados ao lado superficial do núcleo. Isto resulta em bronzeamento da pele, aumentando a capacidade da célula em absorver a luz e, assim, proteger a informação genética no núcleo evitando danos da radiação.

2.1.1.8 Junção epiderme- derme

A interface entre a epiderme e a derme é formada por uma zona de membrana basal que permite a troca de células e fluido e que mantém prende esta região em conjunto. Os queratinócitos basais são os componentes estruturais mais importantes da junção dermo-epidérmica; os fibroblastos dérmicos também estão envolvidos, mas em menor grau. A lâmina basal é uma camada sintetizada por células basais da epiderme, consistindo principalmente em colágeno do tipo IV e microfibrilas dérmicos. As membranas plasmáticas das células basais estão ligadas à lâmina basal por hemidesmossomos. A junção dermo-epidérmica atua como suporte para a epiderme, estabelece polaridade e direção de crescimento celular, dirige a organização do citoesqueleto das células basais, fornece sinais de desenvolvimento, e funciona como uma barreira semipermeável entre as camadas.

2.1.1.9 Apêndices epidérmicos

Incluem unhas, glândulas sudoríparas écrinas e apócrinas, folículos pilosebáceos originários do desenvolvimento celular da epiderme. Após processos de lesão, estes anexos são capazes de reepitelização através da migração de queratinócitos a partir de epitélio para a superfície da epiderme. Regiões como face e couro cabeludo contêm uma grande quantidade

de unidades pilossebáceas, e após a lesão, a reepitelização ocorre mais rapidamente nestas zonas do que naquelas com menor número de anexos como a região dorsal do corpo.

2.1.1.10 Glândulas sudoríparas écrinas

As glândulas sudoríparas écrinas estão envolvidas na regulação do calor e são mais abundantes nas solas dos pés e menos abundantes na região dorsal. Apresenta estrutura tubular, ou ductal, constituída de conduto espiral intraepidérmico, a porção dérmica linear e conduto em espiral secretor que se abre para a superfície da pele e é composto por sua vez de células do conduto dérmico que migraram para a superfície.

Os condutos se abrem diretamente no lúmen da glândula e células epiteliais grandes, ricas em glicogênio iniciam a formação de suor em resposta a um estímulo térmico.

2.1.1.11 Glândulas sudoríparas apócrinas

Se as glândulas écrinas estão envolvidos principalmente na regulação térmica, glândulas apócrinas estão envolvidos na liberação do odor corporal. Nos seres humanos estas glândulas sudoríparas estão essencialmente confinadas às regiões da axila e períneo, e ao contrário de glândulas sudoríparas écrinas não se abrem diretamente na superfície da pele. O conduto secretório destas glândulas se abrem acima da abertura das glândulas sebáceas. A estrutura destas glândulas estão inseridas na hipoderme, e tornam-se ativas na puberdade como resposta à formação de diferentes hormônios. Apresenta secreção viscosa com odor característico.

Um outro tipo de glândulas apócrinas desenvolvem-se durante a puberdade a partir de precursores semelhantes aos das glândulas écrinas abrindo-se diretamente na pele. Descoberto durante o isolamento de suor axilar humano a partir de pacientes com hiperidrosis axilar, uma condição caracterizada pelo aumento anormal das taxas de transpiração, estas glândulas são encontradas nas axilas do adulto em número variável de indivíduo para indivíduo, abrindo-se diretamente na superfície da pele. Apresentam taxa de secreção, cerca de 10 vezes maior do que a glândula écrinas.

2.1.1.12 Cabelos

Além do importante papel psicossocial, os cabelos têm funções biológicas importantes, incluindo a proteção dos elementos e distribuição do suor na pele. Os folículos pilosos variam consideravelmente em tamanho e forma, dependendo da região corporal, mas todos têm a mesma base estrutura. O número e distribuição dos folículos capilares por todo o corpo e o

futuro fenótipo de cada cabelo é estabelecida durante o desenvolvimento fetal; há folículos extras são adicionados após o nascimento. A localização e espaçamento entre os folículos são determinados por genes que são expressos na morfogênese dos folículos. As células basofílicas da camada basal da epiderme são induzidas a crescer a um ângulo para baixo na derme, originando o folículo que continua a desenvolver-se até, finalmente, alargando na base originando a papila dérmica. A diferenciação celular ocorre na porção inferior da papila dérmica formando o cone do folículo piloso, depois o cabelo, a cutícula, e as duas bainhas internas da raiz. Diferenciação também ocorre nos segmentos superiores do folículo para produzir o canal do cabelo na derme superior, através da epiderme, e abrindo para a superfície. Abaixo da abertura da glândula sebácea, aparece outra estrutura em anexo que é o músculo eretor.

O músculo eretor (feixe de músculo liso) prende-se à bainha externa da raiz dos folículos. A chamada protuberância, que é a zona de fixação folicular do músculo eretor, contém células epiteliais responsáveis pela regeneração de folículos. Do lado oposto à localização da glândula sudorípara está a glândula sebácea cujo ducto, abre-se no folículo piloso, superior àquele da glândula sudorípara, próximo à camada basal da epiderme.

2.1.1.13 Glândulas sebáceas

As glândulas sebáceas são encontradas em maior número na face e couro cabeludo, mas estão presentes em quase todos os outros locais do corpo, com exceção das pálpebras, da mucosa bucal e vermelhão frontal dos lábios, o prepúcio e a mucosa do pênis, dos pequenos lábios, e a aréola do sexo feminino. As células das glândulas sebáceas contêm gotículas lipídicas abundantes conhecidas como sebo no seu citoplasma e estão dispostas em lóbulos externamente ao segmento superior do folículo piloso. Células germinativas basais circundantes ao lóbulo originam células repletas de lípidos, que são, em seguida, expelidos pelo conduto sebáceo para o folículo capilar.

2.1.2 Derme

A derme é um sistema integrado de tecido conjuntivo fibroso, filamentoso, e amorfo que regula entrada de estímulo induzido nervos, redes vasculares, apêndices derivados epidermicamente, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Outras células de origem sanguínea, incluindo linfócitos, células de plasma, e outros leucócitos, são encontrados na derme em resposta a vários estímulos. A derme compreende a maior parte da pele e fornece sua flexibilidade, elasticidade e resistência à tração. Protege o corpo contra lesão mecânica, liga-

se a água, auxilia na regulação térmica, e inclui receptores de estímulos sensoriais. A derme interage com a epiderme na manutenção das propriedades de ambos os tecidos.

As duas regiões interagem durante o desenvolvimento, na morfogênese da junção dermo-epidérmica e apêndices epidérmicos e na reparação e remodelação da pele, quando ferimentos são cicatrizados. A derme não apresenta uma sequência óbvia de diferenciação celular como a epiderme mas a estrutura e organização dos componentes do tecido conjuntivo são previsíveis e dependente da profundidade.

Os componentes da matriz, incluindo colágeno e tecido conjuntivo elástico, também variam de modo dependente da profundidade e submetidos a rotação e remodelação na pele normal, em processos patológicos, e em resposta a estímulos externos.

O principal componente da derme é o colágeno, pertencente à família de proteínas fibrosas com, pelo menos, 15 tipos geneticamente distintos em pele humana. Como proteína estrutural principal para todo o corpo, o colágeno é encontrado em tendões, ligamentos, no revestimento dos ossos, e da derme. O colágeno é importante material de resistência ao estresse da pele. As fibras elásticas, por outro lado, desempenham um papel na manutenção da elasticidade, mas contribuem pouco em relação à deformação e estiramento da pele. Fibras colágênicas existem num estado constante de fluxo, sendo degradadas por enzimas proteolíticas chamadas collagenases sendo substituídas por novas fibras de colágênicas. O colágeno representa 70% de peso em seco da pele.

Os fibroblastos integram a molécula de pro-colágeno, uma cadeia polipeptídica específica helicoidal. Em seguida, a célula segrega as fibroblastos, e montam as fibrilas de colágeno. Os amino ácidos glicina, hidroxiprolina e hidroxilisina enriquecem a molécula de colágeno. Os colágenos fibrilares encontrados na pele compreendem grupo principal e são das proteínas mais abundantes no corpo. O constituinte principal da derme é colágeno do tipo I.

As fibras de colágeno são encontradas na derme papilar, enquanto feixes de colágeno de maior peso molecular são encontrados notadas na derme reticular. O colágeno do tipo IV é encontrado na zona da membrana basal, e o principal componente estrutural das fibrilas de apoio é o colágeno tipo VII, o qual é produzido principalmente por queratinócitos. A fibra elástica difere tanto estruturalmente e quimicamente do colágeno e consiste de dois componentes: filamentos de proteínas e elastina, uma proteína amorfa. Os fibroblastos unem fibras elásticas à matriz extracelular da derme, que é composta de glicosaminoglicanos. As fibras são finas na derme papilar e espessas na derme reticular. O ácido hialurônico é um

componente minoritário da derme normal, mas é o principal mucopolissacarídeos que se acumula em estados patológicos.

2.1.2.1 Circulação

A vasculatura dérmica é composta de dois plexos intercomunicantes: o subpapilar, ou plexo superficial, encontrado na junção papilar e reticular da derme composto de vênulas, e do plexo inferior na interface dermo-subcutânea. As papilas dérmicas são fornecidos por capilares, arteríolas finais, e vênulas do plexo superficial. O plexo mais profundo é formado por vasos sanguíneos maiores e é mais complexo. A circulação sanguínea na pele humana varia significativamente em resposta às condições de exposição: vasodilatação e aumento do fluxo sanguíneo da pele, juntamente com a transpiração, são cruciais para a dissipação de calor durante a exposição ao calor e exercício. Durante a exposição ao frio, vasoconstrição na pele diminui a perda de calor do corpo para evitar a hipotermia. Controle alterado do fluxo de sangue da pele pode prejudicar consideravelmente a capacidade em manter a temperatura corporal normal.

2.1.2.2 Músculos

Musculatura involuntária ou lisa da pele ocorre nos órgãos genitais externos e nas auréolas ao redor dos mamilos. As fibras musculares eretoras do folículo piloso estão localizadas no tecido conjuntivo da derme superior e estão associadas ao folículo piloso abaixo das glândulas sebáceas. Situadas em ângulo tal, que o folículo, quando contraído, é posicionado verticalmente, e esta deformação da pele é conhecida como causando "arrepio". Ocorrem também pequenos feixes de músculo liso entre veias e artérias chamados de corpos glômicos, que existem nos dedos, faces laterais das palmas das mãos e plantas dos pés. Regulam a temperatura do corpo e do fluxo sanguíneo. Musculatura estriada ou músculo voluntário é encontrado na pele do pescoço e na pele do rosto como o músculo de expressão.

2.1.2.3 Nervos

Nervos, juntamente com arteríolas e vênulas, são encontrados em grande quantidade formando feixes neurovasculares da derme. Corpúsculos de Meissner, encontrados nas papilas dérmicas, auxiliam na mediação do toque e encontram-se predominantemente na região interna das mãos e dos pés. Corpúsculos de Meissner ocorrem em maior abundância nas mãos, com maior concentração nas pontas dos dedos. Corpúsculos de Vater-Pacini presentes nas extremidades nervosas geram a sensação de pressão e estão localizados na parte mais

profunda da derme. São encontrados comumente na genitália, mamilo e região anogenital. Dor, temperatura e sensação de coceira são transmitidos por fibras nervosas não mielinizadas que terminam em torno de folículos pilosos e na derme papilar. A vasoconstrição é regulada pelas fibras adrenérgicas pós- ganglionares do sistema nervoso autônomo. Este sistema regula as secreções das glândulas apócrinas e a contração dos músculos dos folículos pilosos.

2.1.2.4 Mastócitos

Os mastócitos são células secretoras especializadas derivadas da medula óssea e distribuídos no tecido conjuntivo em todo o corpo. Embora presente em grande número na derme papilar, também são encontrados na hipoderme. Na derme normal, os mastócitos aparecem como células ovaladas. Grande número de mastócitos está localizado ao redor dos vasos sanguíneos. Tradicionalmente associadas com respostas alérgicas, estas células também são capazes de agir em processos inflamatórios e na imunidade do indivíduo.

2.1.3 Hipoderme (panículo)

Embriologicamente, ao final do quinto mês, as células de adiposas começam a desenvolver-se no tecido subcutâneo. Estas células também chamadas de lipócitos estão separadas por septos fibrosos compostos de grandes vasos sanguíneos e colágeno. Varia em espessura dependendo do local da pele. Considerado um órgão endócrino, o tecido subcutâneo fornece ao corpo a fluidez e funciona como um armazém de energia.

2.1.4 Tipos de Pele

Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia Dermatológica (SBCD, 2011) e Sociedade Brasileira de Dermatologia (SBD, 2014) cada pessoa tem um tipo de pele, resultante da combinação de três fatores:

- Quantidade de água – interfere na elasticidade da pele;
- Quantidade de lipídios – interfere na nutrição e suavidade;
- Nível de sensibilidade – determina a resistência da pele.

Os tipos de pele mais comuns são (Figura 3) :

- ✓ Pele normal – tem poros pouco visíveis e aspecto rosado. Há uma quantidade ideal de água e lipídios, que resulta em uma pele sem imperfeições e com um nível adequado de sensibilidade. Aparecimento de rugas variável, mais intenso na região dos olhos. Menos frequente dentre todos os tipos de pele e é pouco propensa ao desenvolvimento de espinhas e manchas;

- ✓ **Pele seca** – em função da genética, das variações hormonais ou de fatores externos como vento ou radiação solar, tem poros praticamente invisíveis e nenhuma luminosidade, além de ser áspera e, não raro, apresentar manchas vermelhas. Maior tendência ao aparecimento de rugas. Uma pele extremamente seca pode descamar, principalmente nas costas da mão e no lado exterior dos braços, antebraços e pernas;
- ✓ **Pele oleosa** – apresenta aspecto lustroso ou engordurado, poros dilatados e, ocasionalmente, espinhas. A oleosidade varia de um dia para o outro, e é causada pela hiperatividade das glândulas sebáceas, que produzem mais sebo do que o necessário em decorrência da entrada na puberdade, alterações hormonais, estresse, uso de certos medicamentos e exposição ao calor ou humidade excessiva. As glândulas oleíferas produzem lipídios em excesso, e podem fazer com que a pele deste tipo deixe resquícios de óleo nas pontas dos dedos. Menor tendência ao aparecimento de rugas e linhas de expressão. A pele oleosa apresenta os poros dilatados, e maior tendência à formação de acne, cravos e espinhas;
- ✓ **Pele mista** – apresenta normalmente poros dilatados no nariz, testa e mento, tendo uma oleosidade mais intensa nesta área e leve tendência a formar cravos (zona T). Na região das bochechas, há pele normal ou seca, com aparecimento de rugas variável. A pele mista tem espessura mais fina, com tendência à descamação e ao surgimento de rugas finas e precoces.

Figura 3: Tipos de pele comuns
(Fonte: *Dicas da perola*, 2016)

Para Baumann (2008), existem pelo menos 16 tipos diferentes de pele, baseados em características secretórias. Formação de rugas e presença / ausência de pigmentação : DSPT; DSNT; DSPW; DSNW; OSPT; OSNT; OSPW; OSNW; ORPT; ORNT; ORPW; ORNW; DRPT; DRNT; DRPW; DRNW (sendo dry/ oily; sensitive/ resistant, pigmented/ non-pigmented and wrinkle- prone/tight, representados por D/O, S/R, P/N E W/T- Seca /oleosa, sensível / resistente, pigmentada / não pigmentada e propensas a rugas/ esticada, representado como S / O, S / R, P / N, e W / E) (figura 4).

<div>DRPT</div> <div>13</div> <div>DRY RESISTANT PIGMENTED TIGHT</div>	<div>DRNT</div> <div>14</div> <div>DRY RESISTANT NON-PIGMENTED TIGHT</div>	<div>DSPT</div> <div>1</div> <div>DRY SENSITIVE PIGMENTED TIGHT</div>	<div>DSNT</div> <div>2</div> <div>DRY SENSITIVE NON-PIGMENTED TIGHT</div>
<div>DRPW</div> <div>15</div> <div>DRY RESISTANT PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>DRNW</div> <div>16</div> <div>DRY RESISTANT NON-PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>DSPW</div> <div>3</div> <div>DRY SENSITIVE PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>DSNW</div> <div>4</div> <div>DRY SENSITIVE NON-PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>
<div>ORPT</div> <div>9</div> <div>OILY RESISTANT PIGMENTED TIGHT</div>	<div>ORNT</div> <div>10</div> <div>OILY RESISTANT NON-PIGMENTED TIGHT</div>	<div>OSPT</div> <div>5</div> <div>OILY SENSITIVE PIGMENTED TIGHT</div>	<div>OSNT</div> <div>6</div> <div>OILY SENSITIVE NON-PIGMENTED TIGHT</div>
<div>ORPW</div> <div>11</div> <div>OILY RESISTANT PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>ORNW</div> <div>12</div> <div>OILY RESISTANT NON-PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>OSPW</div> <div>7</div> <div>OILY SENSITIVE PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>	<div>OSNW</div> <div>8</div> <div>OILY SENSITIVE NON-PIGMENTED WRINKLE PRONE</div>

Figura 4: Tipos de pele segundo Baumann.
(Fonte: Baumann, 2008)

2.2 Acne

A acne é uma doença que afeta 89% da população brasileira (ORTEGA, 2015) e entre 80 e 90% da população mundial, além de ser uma doença de pele, tem uma componente psicológica para as pessoas que sofrem de acne; a nível social, a pele é considerada como órgão que demonstra a saúde e beleza do indivíduo (SMITHARD; GLAZEBROOK; WILLIAMS, 2001; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012).

A acne é uma doença de pele bastante frequente, que acomete a maior parte dos adolescentes, porém não se restringindo somente a eles. É bastante comum em adultos, principalmente nas mulheres (ORTEGA, 2015).

A adolescência é um período de muitas mudanças no organismo, tanto do ponto de vista físico como psíquico. É também uma das fases da vida em que a aparência é muito importante, ou seja, o comprometimento estético determinado por alterações da pele pode tornar o adolescente inseguro, tímido, deprimido, infeliz, com rebaixamento da autoestima e com consequências sérias que podem persistir pelo resto da vida (SMITHARD; GLAZEBROOK; WILLIAMS, 2001; WILLIAMS; DELLAVALLE; GARNER, 2012;).

As principais modificações que ocorrem na pele e nos cabelos estão relacionadas à atividade hormonal que se inicia nessa fase. Na puberdade tem início a produção de hormônios sexuais, os principais responsáveis pelas alterações das características da pele, assim como pelo desencadeamento da acne (pele oleosa, cravos, espinhas, nódulos, cicatrizes). Acomete com maior frequência a face, podendo ocorrer nas costas, ombros e peito. Esses hormônios são chamados andrógenos e estrógenos e são produzidos tanto pelos ovários (mulher) e testículos (homem) como pelas glândulas supra-renais (duas pequenas glândulas situadas sobre os rins) em ambos os sexos. A produção dos andrógenos é maior nos homens e a dos estrógenos é maior nas mulheres. São os andrógenos os responsáveis pelo início do funcionamento das glândulas sebáceas mais ativas na face, peito, costas e couro cabeludo. Essas glândulas estão presentes desde o nascimento, mas são inativas até a puberdade, época em que, em pessoas com predisposição genética, desencadeia mudanças relacionadas ao conteúdo de gordura (secreção sebácea) da pele e do couro cabeludo.

2.2.1 Manifestações

Os sintomas da acne variam de acordo com cada pessoa e, na maioria das vezes, são de pequena a média intensidade. As manifestações variadas incluem (Figura 5):

- Comedões (cravos): folículos pilosos entupidos com sebo;

- Pápulas: lesões sólidas mais altas, com 5mm ou menos, arredondadas, endurecidas e eritematosas;
- Pústulas: lesões com contêm pus;
- Nódulos: lesões caracterizadas pela inflamação, que se expandem por camadas mais profundas da pele e podem levar à destruição de tecidos, causando cicatrizes.
- Cistos: maiores que as pústulas, inflamados, expandem-se por camadas mais profundas da pele, podem ser muito dolorosos e deixar cicatrizes (SBCD, 2011).

MÉDIA		MODERADA		SEVERA

Folículo piloso normal	Comedão - abertura preta	Comedão - abertura branca	Pápula	Pústula	Nódulo

Figura 5: Esquema das variadas formas da acne.
(Fonte: Canadian dermatology Association, 2016)

2.2.2 Classificação

A acne pode ser classificada de acordo com sua gravidade:

- Acne Grau I - presença apenas de comedões (cravos), sem lesões inflamatórias (espinhas);
- Acne Grau II - comedões, pápulas e pústulas;
- Acne grau III - comedões, espinhas, pústulas e cistos.
- Acne Grau IV - comedões, espinhas, lesões císticas maiores que podem se interconectar pela pele (acne conglobada), formando “túneis”. (SBCD, 2011)

2.2.3 Tratamento

A acne deve ser tratada o mais precocemente possível. Não se deve tomar mais a postura de não se preocupar e não tratar a acne por ser considerada “própria da idade”, “de desaparecimento espontâneo com o tempo” ou “de não ser doença”. O controle dessa doença é recomendável não só por razões estéticas (melhora da aparência geral), como também para

preservar a saúde da pele e a saúde psíquica, além de prevenir cicatrizes (marcas da acne) tão difíceis de corrigir na idade adulta.

A seguir algumas recomendações básicas para os indivíduos portadores de acne:

- Pode ocorrer piora relacionada ao estresse, período menstrual, certos medicamentos como os corticoides, exposição exagerada ao sol, contato com óleos, graxas ou produtos gordurosos, época do ano (pode piorar no inverno) e, principalmente, ao hábito de mexer nas lesões (“espremer cravos e espinhas”).
- A acne não é contagiosa e não se relaciona à “sujeira” da pele ou do sangue.
- O bom cuidado começa com higiene adequada da pele com um sabonete ou produto de limpeza indicado. A limpeza excessiva é prejudicial à pele como um todo (irrita a pele) e pode piorar a acne.
- A acne não se relaciona diretamente com a alimentação e, apesar de vários tabus, não é necessária nenhuma dieta ou restrição alimentar para seu tratamento.
- A acne pode melhorar após a exposição ao sol, porém essa melhora é apenas temporária e a exposição exagerada acarreta piora do quadro. As pessoas com acne, como todos, devem se expor ao sol de maneira cuidadosa, racional e orientada.
- A acne é uma doença que tem tratamento e que pode ser curada ou controlada. Isso leva tempo e não acontece da noite para o dia. O tratamento vai variar de acordo com a sua gravidade e localização e em função de características individuais.
- Há opções tanto de tratamento local, quanto por via oral ou combinação de ambos.
- O procedimento denominado limpeza de pele, quando bem indicado pelo dermatologista e bem executado por esteticista treinado, pode ser um ótimo complemento do tratamento de algumas formas de acne. Mas nunca a limpeza de pele feita, às vezes, por leigos, pode ser considerada uma forma de tratar a acne, mesmo leve. Da mesma forma, os chamados *peelings* ou esfoliações químicas podem ser úteis como coadjuvantes ao tratamento. Procure o seu dermatologista.
- O portador de acne não deve em nenhuma hipótese manipular (“cutucar, espremer”) as lesões, pois isso pode levar à infecção, inflamação e cicatrizes.
- É importante compreender como fazer o tratamento e criar uma rotina para que ele seja realizado com facilidade e possa levar aos resultados desejados.
- Vale lembrar que a melhor forma de se evitar as cicatrizes da acne é o seu tratamento adequado e o mais precoce possível (BAGATIN, 2014).

Para o tratamento da acne é necessário verificar se a doença apresenta lesões não inflamatórias (“cravos”) e/ou inflamatórias (“espinhas”, nódulos, cistos) e/ou cicatrizes. Nas apresentações menos graves o tratamento pode ser apenas local, com inúmeros produtos existentes no mercado, isolados ou combinados: ácido salicílico, peróxido de benzoíla, retinoides (tretinoína, adapaleno), antibióticos (clindamicina e eritromicina, de preferência associados, no mesmo produto, aos retinoides ou peróxido de benzoíla) e ácido azelaico. Caso não seja observado melhora, associa-se o tratamento por via oral, utilizando-se antibióticos específicos, da classe das ciclinas (tetraciclina, doxiciclina, minociclina, limeciclina) ou macrolídeos (eritromicina) ou sulfas (sulfametoxazol-trimetoprim), sempre associados ao tratamento local com retinoides ou peróxido de benzoíla ou ácido azelaico. Recomenda-se o tratamento com antibiótico oral por, no máximo, três meses, em um ou até três ciclos. O tratamento hormonal, com anticoncepcionais orais, é sempre útil para as mulheres, desde que não existam contraindicações.

A isotretinoína por via oral é recomendada caso não haja boa resposta aos tratamentos anteriores e se houver tendência para processos cicatriciais e mesmo um importante impacto negativo na qualidade de vida, e desde que não existam contraindicações. Contudo, esta droga é absolutamente contraindicada quando há possibilidade de gravidez, porque pode causar danos graves ao feto. Os efeitos colaterais mais comuns são os que acontecem na pele e mucosas (ressecamento dos lábios, nariz, olhos, pele do corpo), aumento do colesterol, triglicerídeos e enzimas hepáticas. Portanto, são necessários exames de sangue antes e durante o tratamento. Recomenda-se fazer teste de gravidez e mesmo não engravidar, aguardar a menstruação para iniciar o tratamento e se assegurar sobre uso de métodos anticoncepcionais iniciados um mês antes, durante todo o tratamento e por um período de um mês após a suspensão da droga. Não existem riscos para gestações no futuro. Assim, a experiência mundial, de aproximadamente 40 anos desde a sua introdução, é de que é uma droga segura e altamente eficaz, ou seja, droga de escolha para casos resistentes às outras formas de tratamento.

Os procedimentos complementares que ajudam no controle da acne são: extração de “cravos”, drenagem de abscessos, infiltração com corticoides em lesões nodulares muito inflamadas ou em cicatrizes elevadas, peelings químicos, microdermabrasão, alguns tipos de laser e luzes. Orientação para não manipular as lesões e proteção solar, são ações coadjuvantes importantes durante o tratamento (BAGATIN, 2014).

Na escolha do tipo de tratamento, é importante determinar o ingrediente ativo, o veículo a ser utilizado, e o tipo de pele do paciente. Por exemplo, para pele seca ou sensível é recomendado a aplicação de cremes do tipo óleo em água (O/A) por serem menos oleosos e não causar ressecamento da pele. Já para peles oleosas recomenda-se a aplicação de produtos na forma de géis por serem menos oleosos (GÓMEZ, 2013).

Para esta pesquisa foi proposto o uso de um beta hidroxiácido: o ácido salicílico. É agente queratolítico amplamente utilizado em produtos antiacne, cuja função principal é a dissolução dos elementos intercelulares reduzindo a coesão dos corneócitos. Devido ao caráter lipofílico tem um efeito comedogênico forte, tem um efeito anti-inflamatório também porque afeta a cascata do ácido araquidônico implicada nas reações proinflamatórias (RESZKO; BERSON; LUPO, 2009).

O ácido salicílico atua como esfoliante no caso de produtos com valor de pH não superior a 4, sendo o valor ideal igual a 3,5. Com valor mais elevado de pH (mais alcalino) o ácido salicílico atua como agente hidratante e calmante, e não esfoliante (KORNHAUSER; COELHO; HEARING, 2012). A concentração ótima está entre 1,0% e 2,0% de para formulações cosméticas principalmente géis e loções (GERSON, 2013).

2.3 Emulsões

Em pesquisa e desenvolvimento de produtos cosméticos os pesquisadores são desafiados a formular conforme as exigências do consumidor, dentro da legislação vigente no país e influenciados pela volatilidade de mercado, não medindo esforços para produzir produtos estáveis e eficazes com aspectos estéticos e propriedades sensoriais adequados. O processo de desenvolvimento de um produto cosmético na forma de emulsão é muito complexo e exige a pesquisa em vários setores a fim de obter um produto estável, seguro e eficaz.

Emulsões são consideradas como dispersão de um líquido em outro onde é imiscível, originando gotas de diferentes tamanhos. A estabilidade de tal emulsão depende das propriedades superficiais

Uma emulsão é um sistema heterogêneo consistindo de duas fases líquidas com pelo menos um líquido imiscível intimamente disperso em outro na forma de glóbulos. O líquido contido no interior dos glóbulos é denominado fase descontínua ou dispersa (fase interna), enquanto que aquele contendo os glóbulos é conhecido como fase contínua ou dispersante (fase externa). Uma emulsão líquida sem agente emulsificante ou estabilizador separará

rapidamente em duas fases. Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, que pode aumentar com a adição de estabilizador polimérico (proteínas, gomas, polímeros sintéticos) ou inorgânico (argilas modificadas ou não, por introdução de cadeias orgânicas, sílica-gel); sólidos finamente divididos (alumina hidratada, óxidos básicos, sais de sulfato de bário, de metais pesados com ácidos graxos) e os agentes tensoativos (CUNHA, 1970). Dispersões líquidas compostas por um líquido orgânico (óleo) em uma solução aquosa são indicadas pelo símbolo O/A e as dispersões de glóbulos aquosos em um líquido orgânico, como A/O (Figura 6) (CLAYTON, 1943; BECHER, 1965; IUPAC, 1972; MARUNO, 2009).

Figura 6: Tipos de emulsão.

(Fonte: figura dada pelo autor)

Um dos grandes desafios para a produção de emulsões é a estabilidade, definida pela farmacopéia americana, como a capacidade em manter dentro de limites específicos e durante o prazo de validade, as mesmas características que apresentam a partir do momento de fabricação. Ainda, de acordo com Cunha (1970) e Moraes, Rocha Filho e Burgess (2009), uma emulsão estável é aquela que conserva as devidas proporções entre seus constituintes e

mantém o filme interfásico, mesmo após exposição à tensões decorrentes de fatores como temperatura, agitação e aceleração da gravidade. Para garantir a estabilidade de um sistema emulsificado, faz-se necessária a realização de testes de estabilidade, que têm como objetivo assegurar a estabilidade química, físico-química e microbiológica do sistema em função do tempo e assim determinar o tempo de prateleira, ou prazo de validade (*shelf-life*) (AZZINI; LICURSI; ROCHA FILHO, 1999). Submeter sistemas emulsificados às diferentes condições de temperatura e de gravidade são as condições rápidas mais frequentemente utilizadas para avaliar o comportamento de produtos cosméticos (ANVISA, 2004; FERRARI, 2002; FERRARI et al., 2003; MASSON, et al., 2005; MORAIS, 2008; RIEGER, 1996).

Por serem sistemas termodinamicamente instáveis, o desenvolvimento de sistemas emulsionados exige dos formuladores, compreensão dos fenômenos físico-químicos que podem ocorrer durante o prazo de validade e como minimizar ou protela-los (PATHER et al., 1995). A perda da estabilidade físico-química destes sistemas manifesta-se principalmente através de três fenômenos, entre outros (Figura 7):

(i) **Floculação** - processo onde os glóbulos emulsificados agregam-se em aglomerados mantendo o filme interfacial intacto (GULLAPALLI; SHETH, 1999);

Figura 7: Mecanismos de instabilidade de emulsões
(Fonte: figura dada pelo autor)

(ii) **Cremeação** - processo onde ocorre migração dos glóbulos, devido à diferença de densidade dos líquidos dispersos, que acarreta a heterogeneidade da distribuição dos glóbulos

pela fase externa ou dispersante. Em uma emulsão O/A, por exemplo, os glóbulos migram para a superfície do produto e formam uma camada mais densa (MASSON, 2005; SCHUELLER; ROMANOSWIKI, 1999; SILVA; SOARES, 1996). É reversível, uma vez que os glóbulos dispersos também mantêm a integridade do filme interfacial. A aplicação de suave agitação torna-se suficiente para redispersar os glóbulos pela fase dispersante. A cremeação pode favorecer o processo de coalescência uma vez que os glóbulos encontram-se intimamente ligados, apenas separados pela fase emulsificante (PATHER; NEAU; PATHER, 1995; SILVA; SOARES, 1996; TADROS, 2004).

Uma forma bastante utilizada com o objetivo de evitar a cremeação em sistemas emulsificados tem sido amplamente estudada e consiste na adição de polímeros doadores de viscosidade à fase externa da emulsão O/A. Geralmente são polímeros hidrossolúveis e acredita-se estabilizarem emulsões por; (i) modificação das propriedades reológicas da fase externa, ou (ii) adsorção à interface formando uma barreira estérica ou eletroestática ou (iii) uma combinação destes dois efeitos (GULLAPALLI; SHETH, 1999; RIEGER 1996).

Este efeito, chamado estabilização eletro-estérica é amplamente empregado e é considerado por alguns autores como o principal fator responsável pela estabilidade físico-química de sistemas emulsificados (FRIBERG; GOLDSMITH; HILTON, 1988; HOLMBERG et al., 2002; WIACEK; CHIBOWSKI, 1999). Gullapalli e Sheth (1999) relataram que o processo de cremeação e posterior separação de fases em emulsões à base de óleo mineral obtidas com tensoativos não-iônicos (*oleth-3* e *oleth-10*), foi controlado após adição de metilcelulose, carboximetilcelulose ou goma xantana. Os autores atribuíram este efeito estabilizante ao aumento da viscosidade da fase contínua do sistema.

(iii) **Coalescência** - processo onde dois ou mais glóbulos aproximam-se uns dos outros e há energia suficiente no sistema, por exemplo, proporcionada pela variação da temperatura para se unirem, e formar uma gotícula maior na fase dispersa (RIEGER, 1996). Processos de coalescência são citados na literatura como resultados da perda da integridade do filme interfacial (CAPEK, 2004; ROLAND et al., 2003). O processo de coalescência provoca aumento no tamanho dos glóbulos resultando em separação irreversível da emulsão em duas fases distintas (MASSON et al., 2005; MORAIS, 2008; PATHER; NEAU; PATHER, 1995).

Uma formulação considerada quimicamente estável é aquela que mantém, dentro dos limites estabelecidos, a integridade química dos componentes podendo ser adjuvante da formulação ou o ativo (despigmentantes, filtros solares, vitaminas, conservantes microbiológicos e antioxidantes) considerado essencial para a eficácia e segurança do

produto. Alterações químicas como oxidação e hidrólise podem resultar em perda da atividade, formação de compostos tóxicos, irritantes ou indesejáveis além de alterar a aparência do produto (BOODTS, 2003).

A estabilidade de uma formulação farmacêutica ou cosmética está relacionada não só à conservação das propriedades intrínsecas do ativo, e da forma farmacêutica/ cosmética que o veicula (estabilidade física), como também à carga microbiana. Há duas razões para controlar o número de microrganismos em produtos de uso tópico: evitar a instabilidade do produto decorrente do crescimento microbiano e proteger o consumidor de germes patogênicos. A contaminação microbiana está associada à perda da eficácia do produto, seja por degradação dos componentes da formulação ou por alteração de parâmetros físico-químicos fundamentais para a estabilidade do produto. Consequências típicas de contaminação microbiana em um produto cosmético são: (i) alteração do valor de pH, resultando em faixas de colorações distintas ou em precipitações; (ii) produção de gases, provocando odor desagradável; (iii) ação enzimática promovendo a degradação de tensoativos (lípsases) ou de macromoléculas (celulases), promovendo a quebra de emulsões (PINTO; KANEKO; OHARA, 2003)

Estabilidade toxicológica define-se como a capacidade do produto em não apresentar efeitos tóxicos imediatos ou acumulados tais como dermatite de contato, fotossensibilização, eritema, eczema após mesmo o seu prazo de validade.

Finalmente, define-se como estabilidade funcional, a capacidade do produto em manter a função específica para a qual foram desenvolvidos mesmo após o prazo de validade. A conservação desta função é essencial para garantir a eficácia e segurança de uso do produto (MASSON et al., 2005). Em suma, a qualidade final de um produto cosmético se inicia na pré-formulação que, aliado às boas práticas de fabricação (BPF), devem garantir que esse produto seja eficaz. A qualidade é extremamente importante para garantir ao consumidor segurança do produto acabado (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; BOOCK, 2007)

2.4 Óleos vegetais

Desde os primórdios da humanidade, os óleos e manteigas vegetais têm sido usado para tratar a pele a reter sua beleza natural e para curar as desordens da pele. Dependendo dos recursos vegetais localmente disponíveis e a experiência adquirida ao longo dos tempos, cada país e respectivas regiões adquiriram o uso de óleos e manteigas naturais. Atualmente estes óleos e manteigas vegetais oferecem ao formulador de cosméticos e às pessoas de marketing

um ponto diferencial do produto que age, atraindo o consumidor e mesmo poderá definir uma linha de produto cosméticos.

A formulação cosmética, incluindo princípios ativos de origem estritamente natural, deve concebido para proteger a pele contra agentes nocivos endógenos ou exógenos, comobem como para equilibrar reequilibrar a homeostase dérmica alterada por dermatose e pelo processo natural de envelhecimento. Desta forma, o tratamento da pele, pode ser realizado com a aplicação de uma pequena quantidade de produto espalhada na pele na forma de uma camada fina, permitindo a hidratação natural Assim, a composição dos produtos cosméticos poderá (ABURJAI, NATSHEH; 2003):

- reduzir a quantidade de perda de água transepidérmica por evaporação;
- proteger a barreira da pele
- para restaurar o equilíbrio da queratinização;
- para evitar a descamação e fissuras;
- para aumentar a resistência da pele a baixas temperaturas;
- proteção contra radiação ultravioleta.

Para Downing et al., 1986 indivíduos portadores de acne demonstram possuir níveis baixos de ácido linoleico no conteúdo de lipídeos da superfície da pele. Os autores explicam que a concentração linoleato no manto lipíco depende da quantidade de ácido linoleico presente nas célula epidérmicas originária do processo de diferenciação celular. Ainda estes autores afirmam que as baixas concentrações de linoleato causa um estado de deficiência em ácidos graxos essenciais na epiderme podendo mesmo originar processos de hiperqueratose.

2.4.1 Óleo de *Melaleuca alternifolia*

É um óleo essencial com propriedades voláteis, derivados principalmente a partir da planta nativa *Melaleuca alternifolia* de origem australiano; também pode encontrar o nome do óleo da árvore do chá ou óleo da árvore do chá; é amplamente utilizado pelas suas propriedades antimicrobianas, que é incorporada como um ingrediente ativo em muitas formulações para o tratamento de infecções da pele e para o tratamento da acne. O óleo esta constituído por hidrocarbonetos de terpeno principalmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois correspondentes, é fracamente solúvel em água e é miscível com solventes não polares (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

Quando cresce naturalmente, a árvore de *M. alternifolia* atinge alturas de cerca de 5 a 8 metros. O habitat natural de *M. alternifolia* é baixa altitude, pantanoso subtropical, não ocorre naturalmente fora da Austrália. A extração do óleo é mediante técnicas de extração por destilação a vapor das folhas e ramos terminais de *M. alternifolia*. Uma vez condensada, o óleo de cor amarela pálida e límpida é separada do destilado aquoso. O rendimento de óleo é tipicamente de 1 a 2% em peso de material vegetal. (TROPICALS, 2003)

Figura 8 : A árvore de *Melaleuca alternifolia*
(Fonte: top tropicals , 2003)

O extrato oleoso da árvore do chá mostra um largo espectro de atividade deste óleo como antibacteriana, antifúngico, antiprotozoários e antiviral. No caso específico da acne microrganismos como *Propionibacterium acnes* e *S. epidermidis* tornar-se susceptível ao tratamento com este óleo, já que diminui a proliferação de microrganismos que estão diretamente envolvidas com esta doença; estudos têm demonstrado eficácia deste componente em comparação com o peróxido de benzoíla, embora em ambos os casos foi mostrado para reduzir as lesões inflamadas (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006).

2.4.2 Buriti

O buriti (*Mauritia flexuosa*) e Palmeira nativa da região amazônica, encontrada no Brasil, Colômbia, Peru, Equador, Bolívia e Venezuela (GROSSI, 2015). Pode ser conhecido nome com Buriti, moriche, canangucha, Miriti, *Morete aguaje* e palmeira real. O *Mauritia flexuosa* é uma palmeira, que pode atingir uma altura de 40 metros que cresce principalmente em florestas tropicais (figura 9) (TRUJILLO; TORRES; SANTANA, 2011).

Figura 9: A palma de buriti
(Fonte: siforestal, 2006)

O óleo a partir desta planta é rica em carotenóides, ácido ascórbico e ácidos graxos, que constitui uma excelente fonte de provitamina A, como um resultado das grandes quantidades de β -caroteno. Suas propriedades de proteção solar, e o poder hidratante permitem que este óleo seja incorporado em várias formulações cosméticas (ZANATTA, et al., 2010)

Outras propriedades estudadas são a atividade antimicrobiana e cicatrizante, de acordo com um estudo por Batista *et al.* (2012), O óleo de buriti pode melhorar o processo de cicatrização, uma vez que a presença de carotenóides e vitamina E como alfa-tocoferol tem um efeito benéfico sobre o processo de reparação do tecido por ligação aos radicais livres produzidos na ferida e, assim, proteger a membrana celular de peroxidação lipídica celular. Além disso, concentrações elevadas de ácidos graxos insaturados têm um papel importante na regeneração de tecidos, sendo um elemento importante para a formação e a deposição de fibras de colágeno na cicatrização é promovendo a estimulação e proliferação celular. No caso da atividade antimicrobiana, encontrou-se uma inibição de cepas de microrganismo gram negativo e gram positivos.

2.4.3 Cenoura

Cenoura (*Daucus carota*) é uma espécie nativa da Europa, atualmente pode ser cultivada em quase todo mundo, que se caracteriza como uma planta de pequeno porte medindo cerca de 10 cm sendo aproveitada a raiz, que contém grandes quantidades de

provitamina a, β -caroteno e outras moléculas antioxidantes, que atuam na eliminação de radicais livres, prevenindo assim a peroxidação lipídica (SCIENCE, 2016).

O óleo de cenoura é usado principalmente para fins cosméticos, é utilizado como um produto bronzeador, principalmente porque estimula a produção de melanina. É um óleo emoliente e calmante; tem um elevado teor de ácidos graxos insaturados que promove a absorção rápida e completa através da pele (CAMPESTRE, 2005).

A capacidade antimicrobiana de óleo de cenoura foi estudada em pesquisa feita por Ali-Shtayeh, Al-assali e Jamous (2013), que descobriu que os componentes presentes na cenoura podem inibir o crescimento de vários microrganismos Gram-positivos, incluindo *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* já que estes microrganismos podem ser sensíveis a carotenos, motivo pelo qual este óleo pode ser usado em formulações antiacne (ALI-SHTAYED; AL-ASSALI; JAMOUS, 2013; DIAS; WEINGART; ZARUR, 2011).

2.4.4 Urucum

Urucum (*Bixa orellana*) é uma planta com 3 e 10 metros de altura. Suas folhas são simples, grandes, em forma de coração e dispostas alternadamente (figura 10). O fruto é de forma ovoide, com diâmetro de 2 a 5 centímetros de diâmetro, cor marrom-avermelhada, podendo apresentar ou não espículas de seda, é cultivada em diferentes regiões da América Latina e é conhecido como achiote, urucum ou onote. É usado principalmente como corante alimentício, e para o preparo de cosmético decorativo e proteção solar pelas comunidades indígenas.

Diferentes propriedades são atribuídas ao óleo extraído das semente devido à diversidade de locais e culturas onde está planta é encontrada. Pode-se citar atividade adstringente, antisséptico, emolientes, antibacteriano, antioxidante, anti-inflamatório, além da capacidade fotoprotetora; isto possibilita seu uso em formulações cosméticas já que também é facilmente incorporado em cremes, loções creme, protetor solar, hidratantes labiais (PEREZ; CUEM; BECERRA, 2003).

Figura 10: A árvore de urucum
(Fonte: recursos biológicos, 2012)

O óleo obtido é rico em tocotrienol , beta caroteno , óleo essencial, óleo fixo, ácidos graxos saturados e insaturados , flavonoides e vitamina C, contem substancias como bixina e norbixina compostos que inibem a peroxidação lipídica atrapalhando os radicais livres, mas atividade antimicrobiana do óleo não tem sido demonstrada (KLOCKER, 2007).

3 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver emulsões O/A contendo óleos de buriti, cenoura e urucum, aditivadas com ácido salicílico e óleo de melaleuca, usando como tensoativo uma base auto emulsionante de caráter aniônico, para tratamento e proteção da pele acneica.

3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos de cenoura, buriti e urucum pelas metodologias ABTS e Folin Ciocalteu;
- Formular emulsões O/A a partir do método do diagrama ternário de fases para os diferentes óleos, usando três diferente auto emulsionantes para escolher a formulação mais estável;
- Avaliar a influência da adição de óleo de melaleuca e ácido salicílico sobre a estabilidade das emulsões;
- Avaliar a estabilidade e características físico-químicas das emulsões;
- Caracterizar as emulsões por reologia;
- Estudar a espalhabilidade das emulsões comparando-as com formulações comerciais;
- Estudar variáveis que podem alterar a espalhabilidade de uma formulação como é a adição de emolientes e umectantes;
- Desenvolver uma metodologia para avaliar a capacidade queratolítica das formulações estudadas;
- Determinar a capacidade queratolítica das emulsões;
- Determinar a eficácia microbiologia das emulsões desenvolvidas sobre os microrganismos causantes da acne (*Propionibacterium acnes* e *Staphilococcus epidermidis*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Nomes dados segundo *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients* (INCI)

4.1.1 Fase oleosa

Óleo de buriti

Mauritia flexuosa Fruit Oil (INCI) (Mapric do Brasil)

Aparência: líquido oleoso brilhante.

Cor: Levemente amarelado.

Odor: Característico.

Índice de Saponificação (mg KOH/g): 182,3 – 190 198,45

Índice de Refração (25°C) :1, 465

Densidade: 0,909 g/mL

Óleo de cenoura

Daucus Carota Sativa Seed Oil (INCI) (Fagron do Brasil)

Aparência: líquido transparente, oleoso brilhante.

Cor: Levemente laranja.

Odor: Característico.

Índice de Saponificação (mg KOH/g): 180 – 190

Índice de Refração (25°C): 1,470

Densidade: 0,911 g/mL

Óleo de urucum

Annato (Bixa Orellana) Oily Extract. (INCI) (Fagron do Brasil)

Aparência: Óleo Transparente

Cor: Levemente avermelhado.

Odor: Característico.

Índice de Saponificação (mg KOH/g): 160 – 215

Índice de Refração (25°C): 1, 469

Densidade: 0,910 g/mL

Óleo Melaleuca

Melaleuca alternifolia leaf oil (INCI) (Fagron)

Estado: Líquido

Cor: levemente amarelado

Olor: Característico

Densidade (g/cm³): 0,885 – 0,906

Índice de refração (20°C): 1,475 – 1,482

4.1.2 Fase aquosa.

Água purificada por osmose reversa recém obtida.

4.1.3 Bases auto emulsionantes (*Self Emulsifying Bases- SEB*)

Hostaphat® KL 340D *Trilaureth-4-phosphate* (INCI) (Clariant do Brasil)

Aparência (25°C): líquido opaco

Cor: incoloro

Odor: característico

Valor de EHL: 14,0 (aproximado)

Valor de pH (solução aquosa a 1,0%) : 6,5-7,5

Propriedades: Triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, caracterizado por um efeito emoliente e emulgador universal, aumentando a capacidade de retenção de água na pele; Por ser um éster fosfórico, tem grande afinidade com os fosfolipídeos da pele. O seu valor de HLB elevado permite fabricação de emulsões com óleos polares e filtros UV. Quantidades baixas são suficientes para alcançar emulsões altamente estáveis.

Concentração de uso: 3,0 – 10,0 %

Hostacerin® SAF

Mineral oil, isopropyl palmitate, trilaureth-4 phosphate, rapeseed oil sorbitol ester, ammonium acryloyldimethyltaurate, VP copolymer (INCI) (Clariant do Brasil)

Aparência: líquido

Cor: Branco

Odor: Característico

É uma associação entre doadores de viscosidade e emulsionantes desenvolvida para possibilitar a preparação de emulsões com caráter aniônico a frio, contém:

- Doador de viscosidade: Aristoflex[®] AVC (*Ammonium Acryloyldimethyl-taurate / VP Copolymer*): formador de gel com excelente estabilidade e sensorial agradável.
- Emulsionantes: Emulsogen[®] SRO (*Rapeseed Oil Sorbitol Esters*): emulsionante de origem vegetal extremamente suave, baseado em óleo de canola e isento de óxido de etileno ou PEG; Hostaphat KL[®] 340D (*Trilaureth-4 Phosphate*): triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, caracterizado por um efeito emoliente e emulgador universal, aumentando a capacidade de retenção de água na pele; por ser um éster fosfórico, tem grande afinidade com os fosfolipídios da pele.
- Emolientes: Óleo mineral e palmitato de isopropila.

Indicações: Formação de emulsão tipo (O/A) em temperatura ambiente, compatível com diversos princípios ativos farmacêuticos e cosméticos, incluindo hidroquinona, filtros solares, alfa-hidroxiácidos, ácido salicílico, ácido tricloroacético, entre outros.

Concentração de uso: 3,0 – 10,0%

Crodafos[®] CES *Cetearyl Alcohol (and) Dicetyl Phosphate (and) Ceteth-10 Phosphate* (INCI) (Croda do Brasil).

Aparência: Pastilha

Cor: Branco a creme

Odor: Característico

Valor de pH (solução aquosa a 1,0%) : 2.0 – 3.5

Propriedades: Cera condicionadora e emulsificante base fosfato. Versátil emulsificante O/A; auto espessante; naturalmente substantivo a pele; estrutura como fosfolipídios; sensação condicionadora; comportamento tixotrópico; liberação simultânea de óleo e água; promove maior resistência à água em protetores solares; a inversão de fases contribui para a estabilidade. Cera condicionadora e emulsificante base fosfato conferindo excelente funcionalidade a uma larga gama de produtos para o cuidado pessoal.

Indicação: Creme e loções para o cuidado da pele; Produtos para a proteção solar; Produtos infantis; produtos étnicos; maquiagem; condicionadores para cabelo; colorantes para cabelo; permanentes; depilatórios.

Concentração de uso: 1,0 – 10,0 %

4.1.4. Conservantes

Phenova®

Phenoxyethanol, Methylparaben, Ethylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Isobutylparaben (INCI) (Croda do Brasil)

Estado físico: líquido

Cor: transparente

Odor: característico

Solubilidade: em solventes orgânicos, tensoativos e emulsificantes.

Espectro: Amplo, ação contra bactérias gram-positivas e negativas, fungos e leveduras.

Concentração de uso: 0,25 a 1,0%.

4.1.5 Antioxidante

BHT

Butylated hydroxytoluene (INCI) (Mapric)

Estado físico: Sólido

Cor: Incolor

Olor: Praticamente inodoro

Solubilidade: insolúvel em água.

4.1.6 Agente de neutralização

AMP 95

Aminomethyl Propanol (INCI) (Mapric)

Estado físico: Líquido

Cor: incolor

Odor: característico

Solubilidade: solúvel em água e sistemas alcóolicos

Valor de pH (solução aquosa 1%): 11,3

AMP 95 é uma amina orgânica com alto poder neutralizante, indicada para carbômeros, filtros ácidos, ácidos graxos, etc.

4.1.7 Aditivos

Ácido salicílico

Salicylic Acid (INCI) (Lab Synth)

Estado físico: pó fino

Cor: Branco

Olor: Inodoro.

Solubilidade: pouco solúvel em água (1g /500 mL), solúvel em compostos polares

Valor de pH: 3,0

Sulfato de Zinco

Zinc Sulfate (INCI) (Reagen)

Estado físico: cristal ou pó cristalino

Cor: branco

Odor: inodoro

Solubilidade em água: 350 g/l

Valor do pH em solução aquosa ao 5,0%: 4,0 - 5,2

Glicerina

Glycerin (INCI) (Mapric)

Estado físico: Líquido

Cor: incolor

Odor: inodoro

Solubilidade: miscível em água

Valor do pH: neutro.

Propilenoglicol

Propylene Glycol (INCI) (Mapric)

Estado físico: Líquido

Cor: incolor

Odor: inodoro

Valor do pH: 9,0 -10,0 solução a 90%

Solubilidade: miscível em água.

Miristato de isopropila

Isopropyl Myristate (INCI) (Mapric)

Estado físico: Líquido

Cor: Incoloro

Odor: Inodoro

Valor do pH: 6,0 – 7,0 em solução saturada

Solubilidade: em água

Palmitato de isopropila

Isopropyl Palmitate (INCI) (Mapric)

Estado físico: Líquido

Cor: Incolor

Odor: Inodoro

Solubilidade: em água

4.1.8 Células de gelatina

Gelatina

Gelatin (INCI) (Neutra)

Estado físico: produto em pó fino

Cor: ligeiramente amarelo

Odor: característico

Solubilidade em água: Solúvel em água por volta de 35°C, dilata devido à hidratação em água fria.

Conteúdo: Proteína (83,0 – 90,0%), água (8,0 – 12,0%), outros sais (restante).

Glutamato

Glutamic Acid (INCI) (Ajinomoto)

Estado físico: forma de cristais ou pó cristalino

Cor: incolor

Odor: inodoro

Valor de pH: 6,7 – 7,2

Solubilidade: em água (74,0 g/ 100 mL de água)

Ureia

Urea (INCI) (Mapric)

Estado físico: Sólido cristalizado em forma de pérolas.

Cor: Branca.

Odor: Inodoro.

Valor de pH (solução a 10%): 8,00 a 10,00.

Solubilidade: Solúvel em água com abaixamento de temperatura (120g / 100 mL de água a 25°C)

PCA Na

Sodium PCA (INCI) (Ajinomoto)

Hidratante e umectante para pele e cabelos.

Propriedades PCA-Na é agente umectante natural derivado do ácido glutâmico. Conhecido por ser abundante na pele humana e um dos principais componentes do fator natural de hidratação (NMF), auxilia a pele e os cabelos a manterem-se com uma aparência saudável e viçosa. Solúvel em água.

Lanolina

PEG-75 Lanolin (INCI) (Croda)

Cera hidrofílica de cor amarela que apresenta as propriedades de emoliência, de condicionamento e de sobreengorduramento da lanolina original, podendo ser classificada como lanolina hidrossolúvel para fins de rotulagem. É um tensoativo não irritante, atóxico e não iônico que pode tolerar altas concentrações de eletrólitos, permanecendo estável.

Keratin complex

Aqua, Cocodimonium Hydroxypropyl Hydrolized Keratin and Hydrolized Keratin. (INCI) (Croda)

É um complexo de queratinas hidrolisadas e quaternizadas. O processo de quaternização de proteínas intensifica os efeitos destes ativos, pois aumenta a afinidade destes produtos pela pele e cabelos, sendo mais eficazes até mesmo quando usado em menores concentrações. As queratinas hidrolisadas que compõem o Keratin Complex apresentam peso molecular aproximado de 600 Daltons,

4.1.5 Reativos para testes de antioxidante.

Reativo de Folin-Ciocalteu

(Merck)

Forma: líquido

Cor: amarelo

Odor: ligeiramente pungente

Ácido gálico

3,4,5-Trihydroxybenzoic acid (IUPAC) (Sigma Aldrich)

Cor: Branco

Forma: Pó

Pureza (titulação com NaOH): $\geq 98,0$ %

Carbonato de cálcio

Calcium carbonate (IUPAC) (Sigma Aldrich)

Cor: Branco

Forma: Pó granular.

Pureza (com HCl) $\geq 99,5$ %

ABTS

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (IUPAC) (Sigma Aldrich)

Cor: Verde

Forma: Pó fino

Pureza (HPLC): $\geq 98,0$ %

Trolox

6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. (IUPAC) (Merck)

Cor: Branco

Forma: Pó

Pureza (HPLC): $\geq 98,0$ %

Persulfato de sódio

Forma: pó

Cor branco

Valor de pH (a 25°C): 2,5 - 4,5

Ponto de fusão: 100 °C

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Quantificação de fenóis totais

Para a quantificação de fenóis totais foi empregado o método de Folin Ciocalteu, que se fundamenta na atividade redutora dos compostos derivados de wolfrâmio e molibdênio. Utiliza como reativo a mistura de ácidos fosfowolfrâmico e fosfomolibdídico em meio básico, que sofrem redução ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolfrâmio (W_8O_{23}) e molibdênio (Mo_8O_{23}) (Figura 11). A absorbância da cor azul desenvolvida é avaliada no comprimento de onda de 760 nm (BLAINSKI; LOPES; MELLO, 2013; GARCIA; FERNANDEZ; FUENTES, 2012).

Figura 11: Mecanismo de ação do reativo de Folin Ciocalteu
(Fonte: GARCIA; FERNANDEZ; FUENTES, 2012)

Nesta metodologia é usado como molécula padrão o ácido gálico, que contém em sua estrutura três radicais hidroxilas unidos ao anel do ácido benzoico para reagir com o reativo de Folin Ciocalteu.

4.2.1.1 Curva de calibração

Foi preparada uma solução de ácido gálico a 0,1 mg/mL e adiciona-se os reativos em cada tubo de ensaio conforme a ordem que se encontra na tabela 2. Após a adição de Na_2CO_3 (1,250 mg), homogeneiza-se durante 5 segundos em vórtex (Thermo Scientific modelo Mixer, Thermo Fisher, Waltham, USA) e, em seguida, adiciona-se o reativo de Folin Ciocalteu (250 μ L) e agita-se novamente em vórtex por 5 segundos. Os tubos foram mantidos durante 2 horas em ambiente escuro e após procedeu-se à leitura em espectrofotômetro (Cary 50 UV Vis, Varian Inc, USA) em comprimento de onda de 760 nm.

Tabela 2- Proporções dos reagentes para elaboração da curva de calibração para o método de Folin Ciocalteu

Tubo	Volume (µL) de solução 0,1 mg/mL de ácido gálico	Água purificada (µL)	Na₂CO₃ (mg)	Reativo de Folin (µL)	Ácido gálico (mg/L)
1	0,0	500,0	1,250	250	0,0
2	40,0	460,0	1,250	250	2,0
3	80,0	420,0	1,250	250	4,0
4	120,0	380,0	1,250	250	6,0
5	160,0	340,0	1,250	250	8,0
6	200,0	300,0	1,250	250	10,0
7	240,0	260,0	1,250	250	12,0
8	280,0	220,0	1,250	250	14,0
9	320,0	180,0	1,250	250	16,0
10	360,0	140,0	1,250	250	18,0

4.2.1.2 Preparo das amostras

200 µL da amostra foram colocados em tubo de ensaio de 5 mL, completa-se o volume com acetato de etila para obter-se concentração final de 500 µL. Posteriormente adiciona-se 1,250 µL de solução de Na₂CO₃ a 20%, e por último é colocado 250 µL do reativo de Folin; manter em ambiente escuro por 40 minutos, e procede-se à leitura em espectrofotômetro a 760 nm (ÁLVAREZ, et al., 2008).

4.2.2 Atividade antioxidante

Para avaliar a capacidade antioxidante dos óleos de buriti, cenoura e urucum, foi empregada a metodologia ABTS, na qual o radical ABTS[•] reage com a maioria dos compostos antioxidantes incluindo compostos fenólicos, tiois e vitamina C. Durante a reação o radical catiônico ABTS[•] de cor verde escura, é transformado para a forma neutra de cor verde clara (figura 12) e a reação é monitorizada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 732 nm (BORGES, et al., 2011).

Figura 12: Estabilização do ABTS + por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.
(Fonte: BORGES, et al., 2011).

4.2.2.1 Curva de calibração

Pesou-se 38,40 mg de reativo ABTS em balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com etanol. Esta solução de ABTS foi oxidada misturando-se numa proporção 1:1, com solução de persulfato de potássio 2,45 mM (solução em água purificada). A mistura deve ser preparada 12 horas antes de seu uso e mantida à temperatura ambiente e em ausência de luz. Ajustou-se a absorbância da solução resultante de ABTS a 732 nm com etanol até que atinja a absorbância de $1,02 \pm 0,01$.

Preparo da solução mãe de trolox- pesou-se 20 mg do reativo, colocou-se em balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume de 25 mL com etanol.

1,955 μL desta solução foi colocado em balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume para 25 mL, que será a solução estoque.

Em seguida as soluções foram preparadas conforme tabela 3.

Tabela 3- Proporções para curva de calibração método ABTS

Tubo	Solução de ABTS inicial	Etanol (μL)	Solução Estoque de trolox (μL)	Concentração trolox ($\mu\text{mol/L}$)
1	2250	250	0	0,0
2	2250	225	25	2,5
3	2250	200	50	5,0
4	2250	150	100	10,0
5	2250	100	150	15,0
6	2250	50	200	20,0
7	2250	0	250	25,0

Os reativos foram adicionados em tubo de ensaio de 5 mL na ordem apresentada na tabela 3, pela ordem seguinte: solução de ABTS, etanol e finalmente a solução Estoque de trolox.

Homogeneizou-se em vórtex durante 5 segundos.

Após 1 minuto e procedeu-se à leitura a 732nm (ÁLVAREZ, et al., 2008).

4.2.2.2 Preparo das amostras

3 g da amostra foram colocados em balão volumétrico de 5,0 mL, completou-se o volume com acetato de etila.

Em tubo de ensaio de 5 mL foram colocados pela ordem: 2250 µL de reativo ABTS, 225 µL de etanol e, por último 25 µL da amostra solubilizada com acetato de etila.

Homogeneizou-se o tubo com auxílio de um vórtex durante 5 minutos.

Após 1 minuto, procedeu-se à leitura em comprimento de onda de 732 nm (ÁLVAREZ, et al., 2008).

4.2.3 Determinação do Ponto Krafft

Para os tensoativos aniônicos o ponto Krafft é aquele onde o aumento de temperatura, aumenta a solubilidade do emulsionante em função da temperatura. Para a realização deste estudo foi preparada uma solução a 1,0 % em água, colocada em banho maria em placa de aquecimento com agitação constante, iniciando com a temperatura no valor de 35°C e incrementando a cada 30 minutos até o valor de 100°C. Em cada valor de tempo foi determinada a condutividade com auxílio do condutivímetro (Digimed, modelo DM-32, Digimed, Campo Grande, Brasil) e o teste foi feito em triplicata (MANOJLOVIC, 2012).

4.2.4 Desenvolvimento da emulsão

4.2.4.1 Obtenção das emulsões

As emulsões foram preparadas pelo método de *Emulsion Phase Inversion* (EPI). Os tensoativos Crodafo[®] CES e Hostaphat[®] KL 340D e as fases, aquosa e oleosa, foram aquecidos separadamente a $75 \pm 5^\circ\text{C}$. A fase aquosa foi vertida lentamente sob a fase oleosa contendo tensoativo, mantendo-se o sistema sob agitação constante de 600 rpm (agitador Ika, modelo RW 20, IKA, São Paulo, Brasil) até que atingisse a temperatura ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). Após 24 horas as formulações foram avaliadas mediante centrifugação (Fanem modelo 206-R, Fanem, São Paulo, Brasil) (MARUNO; ROCHA FILHO, 2010).

No caso de Hostacerin[®] SAF a emulsão foi preparada à temperatura de $25 \pm 5^\circ\text{C}$, mantendo-se o sistema sob agitação constante no tempo máximo de 20 minutos (informação do fornecedor). Após 24 horas, as formulações mais estáveis foram avaliadas mediante centrifugação.

4.2.4.2 Diagrama ternário

As formulações foram desenvolvidas seguindo o método do diagrama ternário (figura 13), os três vértices do triângulo equilátero correspondem a 100% que estabelecem as concentrações dos três componentes da emulsão (água-óleo-tensioativo). O diagrama foi obtido inicialmente variando as concentrações de 10,0 em 10,0 %, com a finalidade de determinar características em cada região, foi feito separadamente para cada um dos óleos (buriti, cenoura e urucum), usando Crodafo[®] CES (MORAIS et al., 2006)

Figura 13: Diagrama ternário para o desenvolvimento das emulsões.

4.2.5 Análise macroscópica das formulações

As análises das amostras foram realizadas 24 horas após o preparo descrevendo as características organolépticas e a homogeneidade das formulações identificando possíveis processos de instabilidade tais como, coalescência e cremação (FERRARI et al., 2003).

4.2.6 Testes preliminares de estabilidade da emulsão

As emulsões classificadas como macroscopicamente estáveis após 24 horas de preparo foram submetidas aos testes preliminares de estabilidade: centrifugação, valores de pH, condutividade elétrica e estresse térmico (triplicata) (ANDRADE, 2008).

4.2.6.1 Teste de centrifugação

Foram pesadas $5,0 \pm 0,2$ g de amostra e com auxílio da centrífuga (Fanem modelo 206-R, Fanem, São Paulo, Brasil), as amostras foram submetidas em ciclos de 3000 rpm durante 30 minutos (ANVISA, 2004).

4.2.6.2 Determinação do valor de pH

1,0 g da amostra foi diluída com 9,0 de água recém purificada e após homogeneização o valor de pH foi determinado com o peagômetro (Genaka modelo DG 1800, Gehaka, São Paulo, Brasil) (DAVIS, 1997).

4.2.6.3 Determinação de condutividade elétrica

Foi usado o condutivímetro (Digimed, modelo DM-32, Digimed, Campo Grande, Brasil) inserindo diretamente o eletrodo na amostra (DAVIS, 1997).

4.2.6.3 Estresse térmico

As emulsões acondicionadas em tubos de ensaio foram submetidas ao estresse térmico, submetendo ao aquecimento em banho termostatzado (Nova Técnica Ltda-Modelo 281, Nova Técnica, Piracicaba, Brasil) na faixa de temperatura $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ a $100 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sendo o intervalo de aumento de temperatura de 5 em 5°C . As amostras foram mantidas em cada temperatura por 30 minutos, e após cada período foram avaliadas as características organolépticas e a presença de separação de fases (BRACONI et al., 1995).

Para o teste foi empregada a nomenclatura

N= Normal

LM=Levemente Modificado

M= Modificada

IM= Intensamente Modificada

4.2.7 Ciclo gela degela

As amostras foram armazenadas em condições de temperaturas alternadas, em intervalos de tempo de 24 horas (24 horas a $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, e 24 horas a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, equivalente a um ciclo), em um total de 12 ciclos. Posteriormente foram avaliados (triplicata) parâmetros físico-químicos como valores de pH e condutividade elétrica e parâmetros organolépticos (ANVISA, 2004).

4.2.8 Estabilidade acelerada

A duração do estudo foi de 90 dias. As amostras foram submetidas a diferentes temperaturas de armazenamento: estufa ($45 \pm 2^\circ\text{C}$), refrigerador ($4 \pm 2^\circ\text{C}$), ambiente ($25 \pm 5^\circ\text{C}$). As amostras (triplicata) foram analisadas nos tempos 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias (ANVISA, 2004; FERRARI et al., 2003).

Os parâmetros físico-químicos avaliados foram: valores de pH, condutividade e viscosidade.

4.2.9 Comportamento Reológico

O estudo do perfil reológico e viscosidade da emulsão foi realizado utilizando-se reômetro do tipo cilindro coaxial (Brookfield modelo LVDV III, Brookfield, Middleboro, Estados Unidos), operando o Software Rheocalc. Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) utilizando-se a haste SCA-25. As determinações foram realizadas com velocidade de rotação progressivamente mais altas e subsequentemente diminuídas visando a obtenção das curvas ascendente e descendente, respectivamente. A velocidade de rotação foi determinada de acordo com a capacidade de leitura do aparelho e consistência de emulsão.

4.2.10 Avaliação da espalhabilidade.

Foram usadas lixas d'água com diferentes perfis de superfície que simulam diferentes texturas da pele denominadas como 220, 320, 600 e 1200 e recortadas em retângulos de 9x23 cm. Este retângulo foi dividido em três menores e no centro dos mesmos foram aplicados $25 \pm 0,5$ mg do produto conforme indica a figura 14.

Figura 14: Representação esquemática do ensaio de espalhabilidade.

Placas de vidro de tamanho (7x7 cm) e peso $50,5 \pm 1,0$ foram colocadas sobre as amostras do produto e após cinco minutos determinou-se as medidas, maior e menor, da figura formada (triplicata). Caso a figura formada seja a de um círculo a área será determinada pela equação:

$$A = \frac{D^2 \cdot \pi}{4}$$

Onde A: Área de espalhabilidade (mm^2)

D: diâmetro (mm)

Para comparação foi empregado o método de placas de vidro, para avaliar a espalhabilidade em superfície lisa, permitindo assim, determinar a diferença com as superfícies ásperas das lixas. Foi empregado uma placa de vidro (13 x13 cm), no centro da qual foi aplicada $25,0 \pm 0,5$ mg de amostra e sobre esta foi colocada uma placa de vidro (7x7 cm) de peso conhecido $50,5 \pm 1,0$ g, sob essa placa posicionou-se uma folha de papel milimetrado. Depois de 5 minutos, foi realizada a leitura de três retas maiores abrangidas pela amostra, em três posições diferentes, com auxílio da escala do papel milimetrado. Este procedimento foi repetido em triplicata e, caso a figura formada seja a de um círculo, a área de espalhabilidade será calculada conforme a equação citada acima (KNORST; BORGHETTI, 2006).

4.2.11 Avaliação da atividade queratolítica.

Quinze gramas da solução aquosa com a composição da tabela 4 foram distribuídos em recipientes plásticos redondos transparentes de $57,0 \pm 0,3$ mm de diâmetro e $16,0 \pm 0,3$ mm de altura e mantidos em geladeira à temperatura de $4,0 \pm 2^\circ\text{C}$. Após três horas e com auxílio de uma lâmina fina fez-se três cortes paralelos e de mesmo tamanho, sem que atinjam as paredes e/ ou fundo do recipiente. Com auxílio de uma pipeta ou espátula, aplica-se o produto a avaliar na quantidade de $60,0 \pm 0,5$ mg (quintuplicatas) espalhando uniformemente pela superfície da gelatina. Após 24h em geladeira, examina-se a superfície da gelatina observando-se se ocorre ou não aberturas maiores nos cortes e, determinando-se a medida maior dos mesmos. Os resultados foram expressos como média da maior abertura observada no corte após 24 horas. Foram aplicados os seguintes produtos (quintuplicatas):

- 1) Solução etanólica de ácido salicílico a 2,0%;
- 2) Formulação final (EF);
- 3) Produto comercial brasileiro que tem como ativos: 3,0% de ácido salicílico e dipropionato de betametasona 0,05 %;
- 4) Solução aquosa de alantoína a 10,0%;
- 5) Formulação sem ácido salicílico e óleo de melaleuca.
- 6) Produto comercial colombiano que tem como ativos: ácido salicílico, e extratos de *salix alba*, *arctium majus*, *citrus medica limonum*, *gentiana lutea*, *juniperus communis* e *thymus vulgaris* (fórmula qualitativa conforme citado na embalagem).

Tabela 4 - Composição da célula de gelatina.

Componentes (INCI)	% m/m
<i>Gelatin</i>	7,0
<i>Sodium PCA</i>	0,5
<i>PEG lanolin</i>	0,5
<i>[Aqua, Cocodimonium Hydroxypropyl Hydrolized Keratin and Hydrolized Keratin]</i>	1,0
<i>Urea</i>	0,5
<i>Glutamic Acid</i>	0,5
<i>Purified water</i>	90,0

4.2.12 Análises microbiológicas

4.2.12.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para *Propionibacterium acnes*.

Utilizou-se o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2007), atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com adaptações.

4.2.12.1.1 Preparo das amostras.

Foram preparadas soluções em DMSO (1,0 mg/125 µL) dos produtos assim identificadas:

- 2: Formulação EF;
- 3: Formulação 36.6;

4: Produto comercial colombiano;

5: Produto comercial brasileiro.

Após completa solubilização das preparações foram adicionados 875 µL de caldo Mueller Hinton (MH).

4.2.12.1.2 Micro-organismos utilizados.

Utilizou-se a linhagem proveniente da *American Type Culture Collection: Propionibacterium acnes* ATCC 6919.

4.2.12.1.3 Preparo do inóculo.

Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, culturas de 72 horas do micro-organismo indicador, desenvolvidas em ágar Schaedler suplementado com vitamina K (1 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura, hemina (5 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura e sangue desfibrinado de carneiro (5,0%) foram transferidas para tubo contendo 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. Padronizou-se esta suspensão comparando-a com leitura de transmitância equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %). Em seguida, transferiu-se 1,0 mL desta solução para um novo tubo contendo 9,0 mL de solução salina 0,9%. Após, transferiu-se 2,0 mL desta para um tubo contendo 10 mL de caldo Schaedler suplementado com vitamina K (1 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura e hemina (5 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura, de modo a fornecer a cada 20 µL pipetado no poço, o inóculo de 1×10^6 UFC/mL.

4.2.12.1.4 Preparo do padrão utilizado como controle positivo.

Pesou-se 1,0 mg de penicilina G (Sigma) e diluiu-se em 10 mL de tampão fosfato de potássio 1,0%, pH 6,0 esterilizado. Transferiu-se 1,0 mL desta solução para tubo de ensaio contendo 4,0 mL de caldo Schaedler suplementado com vitamina K (1 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura, hemina (5 mg/mL) 100µg/100 mL de meio de cultura. Utilizou-se 59 µL desta última solução no primeiro poço da placa.

4.2.12.1.5 Preparo da solução reveladora.

Utilizou-se solução aquosa esterilizada de resazurina (Sigma) na concentração de 0,02%. Adicionou-se 20 µL desta solução em cada poço da placa.

4.2.12.1.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras

Em microplacas estéreis de 96 poços foram depositados um total de 100 µL da mistura do caldo, das soluções das amostras e do inóculo. As amostras foram avaliadas em uma faixa

de concentração de 0,195 a 400 µg/mL. Penicilina G foi utilizada como controle positivo em uma faixa de concentração de 0,0115 a 5,9 µg/mL. Em triplicata, foram realizadas as etapas seguintes: 1- o controle de esterilidade do caldo Schaedler suplementado com vitamina K e hemina, que não deve apresentar crescimento bacteriano; 2- o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano; 3- o controle do solvente no inóculo, que deve apresentar crescimento bacteriano; 4- o controle de esterilidade do solvente utilizado na solubilização das amostras, na concentração de 5,0%, que não deve apresentar crescimento bacteriano.

As microplacas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de solução aquosa de resazurina 0,02% em cada poço. A verificação da cor vermelha nos poços é interpretada como presença de crescimento microbiano, enquanto que a cor azul pode ser interpretada como inibição do crescimento do micro-organismo testado (micro-organismo sensível à amostra avaliada).

4.2.12.1.7 Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático

As amostras foram avaliadas novamente nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente, retirando-se uma alíquota antes da revelação com a solução de Resazurina 0,02%, inoculando-as em placas de petri contendo ágar Schaedler suplementado com vitamina K (1 mg/mL) 100µg /100 mL de meio de cultura, hemina (5 mg/mL) 100µ /100 mL de meio de cultura e sangue desfibrinado de carneiro (5,0%) , que foram em seguida incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas.

A detecção ou ausência de crescimento microbiano nas placas inoculadas indica efeito bacteriostático ou bactericida, respectivamente.

4.2.12.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para *Staphylococcus epidermidis*

Utilizou-se o método de microdiluição em microplaca segundo a metodologia preconizada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003), atualmente denominado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), com adaptações.

4.2.12.2.1 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções em DMSO (1,0 mg/125 µL) dos produtos assim identificadas:

2: Formulação EF;

3: Formulação 36.6;

4: Produto comercial colombiano;

5: Produto comercial brasileiro.

Após completa solubilização das amostras foram adicionados 875 µL de caldo Mueller Hinton (MH).

4.2.12.2.2 Micro-organismos utilizados.

Utilizou-se a linhagem proveniente da *American Type Culture Collection: Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

4.2.12.2.3 Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de inoculação estéril, culturas de 24 horas do micro-organismo indicador, desenvolvidas em ágar Muller Hinton foram transferidas para tubo contendo 5,0 mL de solução salina 0,9% esterilizada. Padronizou-se esta suspensão comparando-as com leitura de transmitância equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (0,1 mL de cloreto de bário a 1,0 % + 9,9 mL de ácido sulfúrico a 1,0 %). Em seguida, transferiu-se 1,0 mL desta solução para um novo tubo contendo 9,0 mL de solução salina 0,9%. Após, transferiu-se 2,0 mL desta para um tubo contendo 10 mL de caldo MH de modo a fornecer a cada 20 µL pipetado no poço, o inóculo de 5×10^5 UFC/mL.

4.2.12.2.4 Preparo do antibiótico padrão utilizado como controle positivo

Pesou-se 1,0 mg de penicilina G (Sigma) e diluiu-se em 10 mL de tampão fosfato de potássio 1,0%, pH 6,0 esterilizado. Transferiu-se 1,0 mL desta solução para tubo de ensaio contendo 4,0 mL de caldo MH. Utilizou-se 59 µL desta última solução no primeiro poço da placa.

4.2.12.2.5 Preparo da solução reveladora

Utilizou-se solução aquosa esterilizada de resazurina (Sigma) na concentração de 0,02%. Adicionou-se 20 µL desta solução em cada poço da placa.

4.2.12.2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana das amostras

Em microplacas estéreis de 96 orifícios foram depositados um total de 100 µL da mistura do caldo MH, das soluções das amostras e do inóculo. As amostras foram avaliadas em uma faixa de concentração de 0,195 a 400 µg/mL. Penicilina G foi utilizada como controle positivo em uma faixa de concentração de 0,0115 a 5,9 µg/mL. Em triplicata, foram realizadas as etapas seguintes: 1- o controle de esterilidade do caldo MH, que não deve

apresentar crescimento bacteriano; 2- o controle da cultura, o qual deve apresentar crescimento bacteriano devido à ausência do agente antimicrobiano; 3- o controle do solvente no inóculo, que deve apresentar crescimento bacteriano; 4- o controle de esterilidade do solvente utilizado na solubilização das amostras, na concentração de 5,0%, que não deve apresentar crescimento bacteriano.

As microplacas foram incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 μL de solução aquosa de resazurina 0,02% em cada poço. A verificação da cor rosa nos poços é interpretada como presença de crescimento microbiano, enquanto que a cor azul pode ser interpretada como inibição do crescimento do micro-organismo testado (micro-organismo sensível à amostra avaliada).

4.2.12.2.7 Avaliação de efeito bactericida ou bacteriostático

As amostras foram avaliadas novamente nas mesmas concentrações utilizadas anteriormente, retirando-se uma alíquota antes da revelação com a solução de Resazurina 0,02%, inoculando-as em placas de petri contendo ágar MH, que foram em seguida incubadas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

A detecção ou ausência de crescimento microbiano nas placas inoculadas indica efeito bacteriostático ou bactericida, respectivamente.

4.2.13 Análise estatística

Os dados coletados foram avaliados através de análise de variância ANOVA, onde os resultados foram considerados significativos quando a probabilidade foi inferior a 5% ($p < 0,05$) e pelo teste de Tukey, com nível de significância $\alpha = 0,05$. A avaliação estatística dos resultados foi realizada através do Excel.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da capacidade antioxidante dos óleos vegetais

Os óleos vegetais apresentam grande quantidade de compostos fenólicos, que devido a sua natureza servem como agentes estabilizadores de radicais livres inibindo a peroxidação lipídica, nos óleos se podem encontrar diferentes tipos de moléculas antioxidantes, tais como: tocoferóis, ácido ascórbico, e carotenóides (HALL, 2012; ZANATTA, *et al.*, 2010).

Também pode-se encontrar polifenóis, que são o grupo mais numeroso de componentes antioxidantes, e apresentam em sua estrutura química anéis aromáticos com grupos hidroxilas responsáveis pela atividade antioxidante. Dentre os compostos responsáveis pela atividade antioxidante apresentam-se:

- ✓ ácidos fenólicos: comportam-se como antioxidante muito eficiente em sistemas biológicos, e isto é atribuído à sua facilidade para doar átomos de hidrogênio de um grupo OH para um radical livre e a possibilidade de relocação de cargas no sistema de duplas ligações do anel aromático;
- ✓ flavonóides: estão presentes em quase todas as partes da planta, sua estrutura consiste de dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática de três carbonos, que são condensados formando um pirano ou um furano (HALL, 2012).

Dentre os diferentes métodos utilizados na determinação da atividade antioxidante, foram realizados o método usando o reativo Folin Ciocalteu para a quantificação de fenóis totais, já que é um método simples, preciso e sensível. Na determinação de atividade antioxidante foi usado o método ABTS, de execução rápida e simples. Devido à solubilidade do ABTS em solventes aquosos e orgânicos, é considerado um método adequado para avaliar capacidade antioxidante de amostras de natureza hidrofílica e lipofílica.

5.1.1 Quantificação de fenóis totais.

A curva de calibração da quantificação de fenóis totais para este método apresentou a equação $y=0,0527x + 0,0098$ como se mostra na figura 15:

Figura 15: Curva de calibração com ácido gálico para o método Folin Ciocalteu.

A tabela 5 apresenta o resultado da determinação (triplicata) em fenóis para os diferentes óleos das amostras dos diferentes óleos.

Tabela 5 Determinação de fenóis dos óleos pelo método de Folin Ciocalteu.

Óleo	Concentração de fenóis (mg/L)
Buriti	$192,71 \pm 2,59$
Cenoura	$116,00 \pm 2,43$
Urucum	$177,72 \pm 2,69$

Como pode- se observar na Tabela 5 os três óleos testados apresentam concentração em compostos fenólicos que podem exercer a atividade antioxidante para as formulações, sendo que para o óleo de buriti a concentração em fenóis totais é a maior..

No caso da mistura de óleos poderá ocorrer um efeito sinérgico entre os mesmos, o que foi estudado por Guzman et al.,(2009) explicando mediante o mecanismo de regeneração, onde o antioxidante mais ativo doa íons hidrogênio para o radical livre inibindo a oxidação, enquanto um antioxidante menos ativo doa o hidrogênio para outro mais ativo, assim o doador é consumido enquanto o aceptor propaga a inibição da oxidação dando o efeito sinérgico.

5.1.2 Atividade antioxidante pelo método ABTS

Os resultados foram analisados por ANOVA, e observou-se diferença estatisticamente significativa entre os diferentes óleos.

Ao realizar a curva de calibração por este método, obtém-se a equação:

$y = -0,02365x + 1,054$ como se mostra na figura 16.

Figura 16: Curva de calibração método ABTS.

A tabela 6 apresenta o resultado da determinação (triplicata) da capacidade antioxidante para os diferentes óleos.

Tabela 6 -Atividade antioxidante dos óleos equivalente a trolox

Óleo	Atividade antioxidante (µmol/L) (TEAC)*
Buriti	693 ± 0,493
Cenoura	1583 ± 0,153
Urucum	132 ± 1,25

Legenda: (*) Capacidade antioxidante equivalente a trolox.

Os resultados foram comparados com o estudo de Yu, Zhou e Parry (2005) que encontrou uma atividade antioxidante para o óleo de semente de cenoura de 8,11 µmol/L e uma quantidade total em fenóis 1,89 mg/L, e ainda, com os resultados obtidos por Speranza et al. (2016) que determinou para o óleo de buriti 97,263 mg/L total em fenóis . Pode- se constatar que os resultados obtidos nesta pesquisa indicam valores superiores determinados pelos dois métodos para a atividade antioxidante destes óleos vegetais.

Os resultados obtidos foram comparados com a capacidade antioxidante do composto sintético BHT, que é usado para o controle na avaliação da atividade antioxidante em vários estudos relatados na literatura sendo determinado por Palomino et al.(2009) atividade antioxidante de 929, 2 ± 0,01 µmol/L. Nesta pesquisa foram obtidos resultados inferiores para os óleos de buriti e urucum enquanto que para o óleo de cenoura a atividade foi superior, justificando o uso de misturas destes óleos vegetais (GUZMAN, 2009).

Os resultados apresentados neste estudo mostram que todos os óleos testados têm propriedades antioxidantes, de acordo com Briganti e Picard (2003) este tipo de moléculas pode proteger a pele do radical livre gerada nos processos de defesa quando a parede folicular é afetada pela presença de *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*.

5.2 Determinação do ponto de Kraft

Para emulsificantes iônicos a solubilidade na água aumenta lentamente com a temperatura até um certo ponto onde ocorre incremento rápido nos valores de parâmetros como a condutividade. Esse ponto é chamado ponto de kraft, no qual a solubilização é produzida na forma de micelas, aumentando a temperatura tende a aumentar o caráter hidrofílico de emulsificante, em termos de HLB este aumenta com o aumento da temperatura (SALANGER; ANTÓN, 1998).

Foi observado aumento nos valores de condutividade elétrica característico para os compostos aniônicos, embora macroscopicamente não foi observada mudança no aspecto macroscópico da solução testada (turbidez ou transparência). Para este tipo de emulsionantes a condutividade elétrica é detectada devido à maior mobilidade de cargas do tensoativo, incrementando sua afinidade pela fase aquosa (MANOJLOVIC, 2012).

Figura 17: Determinação ponto de kraft para os diferentes autoemulsionantes.

Nos tensoativos avaliados até a temperatura de 100 °C não foi possível determinar o ponto Kraft (figura 17) como é esperado para os tensoativos aniônicos. Por outro lado, o estado físico também influencia na determinação do ponto Kraft, já que para os autoemulsionantes em estado líquido é maior a facilidade em dissociarem-se, como é o caso de Hostacerin[®] SAF e Hostaphat[®] (ABBOTT, 2015).

5.3 Obtenção das emulsões

Foram desenvolvidas 36 formulações (apêndice A) pelo método de inversão de fases para cada auto emulsificante (Crodafos[®] CES, Hostacerin[®] SAF e Hostaphat[®] KL 340D) e para cada um dos óleos separadamente, a fim de determinar as porcentagens de água/ óleo /auto emulsificante que permitem a formação das emulsões de acordo com o diagrama ternário. Assim, o uso do diagrama ternário permite identificar e analisar o aspecto macroscópico e possibilita identificação de fases anisotrópicas em sistemas dispersos. (ENGEL; VON RYBINSKY, 1998)

Foi possível identificar para os três óleos usados, três áreas diferentes no diagrama: área de separação de fases (SF), onde houve separação completa de fases num período de 24 horas, uma formação de sólido (FS), e uma área de formação de emulsões (FE) representada pelas formulações 21, 27, 28, 34, 35 e 36 (figura 18). A região FE do diagrama ternário foi selecionada para avaliar os autoemulsionantes Hostacerin[®] SAF e Hostaphat[®] KL 340 D com a finalidade de determinar diferenças na formação de emulsões com os diferentes óleos e autemulsionantes.

Figura 18: Regiões características do diagrama ternário

Analisando a região SF, foi observado que a alta concentração de óleos e baixa concentração de água e autoemulsionante, desestabiliza o sistema ocasionando a separação das fases, ocorrendo o mesmo com a região FS. De acordo com Cunha (1970) e Moraes et al.

(2006), uma emulsão estável é aquela que conserva as devidas proporções entre seus constituintes e mantém o filme interfásico.

Com o Hostaphat® KL 340 D as formulações foram preparadas pelo método EPI, enquanto para o Hostacerin® SAF foram preparadas por EPI, porém à temperatura ambiente $25 \pm 5^\circ\text{C}$.

A análise macroscópica mostrou que a melhor formulação é obtida no ponto 36 com o autoemulsificante Hostacerin® SAF, com os três óleos separadamente e com a mistura dos mesmos em iguais proporções (1:1:1) (figura 19).

Figura 19: Área de formação de emulsões para os três auto emulsionantes e mistura de óleos.
Onde: A= Crodafos® CES B= Hostacerin® SAF C= Hostaphat® KL 340 D

As formulações no ponto 36 com os diferentes óleos e com a mistura deles, usando como autoemulsionante Hostacerin® SAF foram submetidas ao estudo do diagrama pseudoternário com a finalidade de se determinar emulsões mais estáveis. Para tal foram preparadas formulações derivadas, variando as concentrações em 5,0% dos componentes água/ óleo /auto emulsificante ao redor do ponto 36.0 (Figura 20), obtendo- se 6 novas formulações (36.1 até 36.6) com as porcentagens descritas na tabela 7.

Figura 20: Área considerada para realizar formulações do diagrama pseudoternário

Tabela 7- Composição das formulações do diagrama pseudoternário

Formulação	Hostacerin [®] SAF (% m/m)	Mistura de óleos (% m/m)	Água Purificada (% m/m)	Óleo de Melaleuca (% m/m)
36.1	5,0	15,0	79,0	1,0
36.2	10,0	15,0	74,0	1,0
36.3	15,0	10,0	74,0	1,0
36.4	15,0	5,0	79,0	1,0
36.5	10,0	5,0	84,0	1,0
36.6	5,0	10,0	84,0	1,0

5.4 Análise macroscópica

Depois de preparadas as formulações com a mistura dos óleos (buriti, cenoura e urucum) usando Hostacerin[®] SAF não se evidenciou alterações macroscópicas das mesmas, As amostras foram avaliadas após 24 horas pelo teste de centrifugação, obtendo-se formulações estáveis nos pontos 36.5 e ponto 36.6 cuja composição se apresentam na tabela 8

Tabela 8 -Formulações estáveis

Formulação	Hostacerin [®] SAF (% m/m)	Água Purificada (% m/m)	Mistura de óleos (% m/m)
36.5	10,0	85,0	5,0
36.6	5,0	85,0	10,0

5.5 Adição de outros compostos

Além de ter propriedades antioxidantes os óleos estudados podem também apresentar propriedades antibacteriana e cicatrizante (KOOLEN et al., 2013; BATISTA et al. 2012), e com a finalidade de estudar possível potencialização destas características foi adicionado o óleo de melaleuca (1,0%) que tem demonstrado ação sobre micro-organismos que causam acne e também em processos inflamatórios da pele (CARSON; HAMMER; RILEY, 2006). As formulações adicionadas com este óleo receberam os números de 36.1 até 36.6.

Tabela 9 -Formulações com adição de óleo de melaleuca

Formulação	Hostacerin® SAF (% m/m)	Mistura de óleos (% m/m)	Água Purificada (% m/m)	Óleo de Melaleuca (% m/m)
36.1	5,0	15,0	79,0	1,0
36.2	10,0	15,0	74,0	1,0
36.3	15,0	10,0	74,0	1,0
36.4	15,0	5,0	79,0	1,0
36.5	10,0	5,0	84,0	1,0
36.6	5,0	10,0	84,0	1,0

Depois de 24 horas as amostras foram avaliadas pelo teste de centrífuga, e com exceção da formulação 36.6, com valor de pH foi de $6,3 \pm 0,03$, as demais separaram-se.

Portanto baseado nestes resultados a emulsão 36.6 aditivada com óleo de melaleuca, foi escolhida para estudar a adição de um componente com ação esfoliante como o sulfato de zinco que em pele com acne, poderá inibir a produção de superóxido causada pelos microrganismos e assim diminuir o aparecimento de comedões (FLOREZ, 2012). Para isto foram preparadas as emulsões aditivadas com óleo melaleuca ou sulfato de zinco, empregando ainda como fase oleosa o óleo de buriti (B), cenoura (C), urucum (U) e mistura de óleos (M) (apêndice B), para avaliar a estabilidade dos sistemas.

Após 24 horas, observou-se que as amostras que não apresentam separação de fases foram aquelas que contêm óleo de melaleuca, enquanto que as formulações com ZnSO_4 apresentam separação de fases. Este fato é devido à presença dos íons de sulfato que em uma emulsão com auto emulsionante aniônico diminuem as interações eletrostáticas presentes na interface proporcionando aproximação maior das gotículas de água provocando o fenômeno de coalescência (CUNHA, 1970; DEL CARPIO, 2011)

As formulações contendo óleo de melaleuca e mistura de óleos foram aditivadas com ácido salicílico (0,5%, 1,0% e 2,0%) amplamente usado para a esfoliação da pele em tratamento antiacne (FLOREZ, 2012), sendo 2,0% a concentração máxima permitida pela ANVISA para os produtos contra a acne (ANVISA, 2000).

Tabela 10 -Formulações com óleo de melaleuca e ácido salicílico.

Formulação	Hostacerin [®] SAF (% m/m)	Óleo (% m/m)	Água purificada (% m/m)	Óleo de Melaleuca (% m/m)	Ácido salicílico (% m/m)
I B	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
I C	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
I U	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
I M	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
II B	5,0	10,0	83,0	1,0	1,0
II C	5,0	10,0	83,0	1,0	1,0
II U	5,0	10,0	83,0	1,0	1,0
II M	5,0	10,0	83,0	1,0	1,0
III B	5,0	10,0	82,0	1,0	2,0
III C	5,0	10,0	82,0	1,0	2,0
III U	5,0	10,0	82,0	1,0	2,0
III M	5,0	10,0	82,0	1,0	2,0

Onde B: óleo de buriti. C: óleo de cenoura. U: óleo de urucum. M: mistura de óleos.

Estas formulações não apresentam separação de fases ou diferenças macroscópicas entre os óleos e/ou a mistura deles e, portanto escolheu- se a formulação III M com 2,0% de ácido salicílico baseada na formulação 36.6, já que esta porcentagem demonstra eficácia no tratamento de acne (ZANDER, WEISMAN, 1992).

O valor de pH da formulação é ajustado com AMP 95 devido à diminuição do pH por adição de ácido salicílico debaixo $3,0 \pm 0,03$ para o valor de $3,90 \pm 0,03$, esta faixa é indicada para ocasionar esfoliação sem irritação agressiva da pele (KORNHAUSER; COELHO; HEARING, 2012) obtendo- se assim, a emulsão final (EF) cuja composição é descrita na tabela 11.

Tabela 11 – Composição da emulsão final (EF)

Componentes	(% m/m)
Mistura de óleos	10,0
Hostacerin® SAF	5,0
Ácido salicílico	2,0
Óleo de melaleuca	1,0
AMP 95	1,2
BHT	0,02
Phenova®	0,25
Água purificada	80,53

Comparando-se a macroscopicamente a formulação EF, em características organolépticas com a emulsão 36.6 que não contém ambos, o ácido salicílico e óleo de melaleuca, observa-se diferenças quanto à cor e fluidez das formulações, sendo a emulsão EF de uma cor amarelo mais intenso e maior fluidez em relação à formulação 36.6

5.6 Testes preliminares de estabilidade

Com as emulsões obtidas 36.6 e EF foram realizados os testes de preliminares de estabilidade após 24 horas de manipulação com a finalidade em avaliar as diferenças entre as mesmas, através de parâmetros como centrifugação, valores de pH, condutividade elétrica e estresse térmico (tabela 12). Segundo ANVISA (2004) estes estudos auxiliam na triagem das emulsões.

Tabela 12 - Testes preliminares de estabilidade das formulações EF e 36.6.

Fórmulas	Centrifugação		Condutividade	pH
	(rpm)			
	2500	3000	(μS/cm)	
EF	N	LM	6.854 ± 108	3,90 ± 0,03
36.6	N	N	1.972 ± 11	6,25 ± 0,01

O teste de centrifugação permite observar a desestabilização de uma emulsão mediante um incremento de força, e considerado como parâmetro para estimar o período de validade de um produto. Segundo Latreille e Paquin (1990), a estabilidade é diretamente proporcional à

força de gravidade, o comportamento a longo prazo das emulsões pode ser demonstrado pelo teste de centrífuga, já que este permite a mobilidade das partículas em curto tempo, que pode se observar com processos de instabilidades físico-químicas como fenômenos de cremeação e/ou coalescência. Apesar de leve modificação ao final do ciclo a 3000 rpm a formulação EF foi considerada adequada para os estudos subsequentes.

Como era esperado, a adição de ácido salicílico, modifica os valores de pH e de condutividade da emulsão, devido às propriedades ácidas do mesmo, sendo os valores acídicos para a formulação de EF devido à presença de ésteres na emulsão produzidos por hidrólise ácida (MASMOUDI et al., 2005; SCHUCHARD; SERCHELI; VARGAS, 1998). Porém, isto não é suficientemente intenso para ocasionar separação de fases da emulsão obtida.

Quanto ao teste de estresse térmico (tabela 13) as formulações permaneceram estáveis acima de 90°C, observando a 100°C leve modificação para a emulsão EF. Portanto, as emulsões submetidas a este teste podem ser consideradas estáveis já que suportam altas temperaturas sem apresentar modificações macroscópicas.

Tabela 13 -Teste de estresse térmico das formulações EF e 36.6.

Temperatura (°C)	Amostras	
	EF	36.6
40 - 45	N	N
50 - 55	N	N
60 - 65	N	N
70 - 75	N	N
80 - 85	N	N
90 - 95	N	N
100	LM	N

5.7 Ciclos gela-degela

Para determinar o comportamento das emulsões desenvolvidas frente à variação de temperatura, realiza-se o ciclo gela-degela, que pode simular diferentes condições de armazenamento ou transporte das mesmas, permitindo detectar processos de instabilidade.

Na tabela 14 tem-se o resultado de avaliação de pH e condutividade para amostras das emulsões EF e 36.6 submetidas a este teste.

Tabela 14 -Ciclo gela desgela formulações EF e 36.6.

Ciclos	pH		Condutividade elétrica ($\mu\text{S/cm}$)	
	EF	36.6	EF	36.6
0	$3,89 \pm 0,01$	$6,26 \pm 0,01$	$6,773 \pm 59$	$2,400 \pm 38$
6	$3,88 \pm 0,02$	$6,16 \pm 0,02$	$6,236 \pm 121$	$2,113 \pm 95$
12	$3,84 \pm 0,02$	$6,08 \pm 0,03$	$6,024 \pm 66$	$1,943 \pm 64$

As amostras avaliadas apresentaram diminuição nos valores de pH e condutividade elétrica (tabela 14) provavelmente devido à reação de hidrólise que ocorre em formulações contendo matérias primas vegetais com alto teor de ácidos graxos (ANDRADE, 2008).

Ressalta-se também que a formulação EF, além de ter ácidos graxos também contém ácido salicílico que poderá apresentar dissociação leve em meio aquoso e os íons gerados alteram os valores de pH e da condutividade elétrica (JARAMILLO, 2005).

5.8 Estabilidade acelerada

Para ser considerada para uso tópico adequado as formulações foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada que fornecem indicações sobre o produto, como o tempo de vida útil e armazenagem por um período de 90 dias no qual o produto é submetido a condições extrema de temperatura e mudanças de umidade (ANVISA 2004). Para as amostras 36.6 e EF foram avaliados os parâmetros de valores de condutividade elétrica e pH.

5.9 Condutividade elétrica

O teste de condutividade elétrica, além de indicar a natureza da fase externa da dispersão pode detectar modificações e prever os fenômenos de instabilidade que ocorrem durante o tempo de armazenamento, assim como a liberação de eletrólitos da fase aquosa das emulsões, que é refletida no aumento da condutividade (MASMOUDI, et al., 2005).

Figura 21: Condutividade elétrica da amostra 36.6 durante teste de estabilidade acelerada.

Os valores da condutividade elétrica para a formulação 36.6 (figura 21) aumentaram para as amostras armazenadas em $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$, mantendo-se com valores semelhantes ao inicial para amostras a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ ao término de 90 dias. Para a formulação EF (figura 22) os valores de condutividade elétrica decrescem qualquer que seja o valor de temperatura a que foi exposta.

Figura 22: Condutividade elétrica da amostra EF durante teste de estabilidade acelerada.

De acordo com a teoria dada por Koronen et al., (2001) quanto menor o valor da condutividade elétrica de um emulsão, maior a viscoelasticidade devido à menor quantidade de água livre e a estrutura do creme torna-se mais organizada, o que pode se observar devido ao incremento na tensão de cisalhamento na emulsão.

5.10 Valores de pH

Com a análise de valores de pH pode-se determinar a ocorrência de reações químicas que comprometem a qualidade do produto final (ANVISA, 2004).

Os ácidos graxos insaturados são compostos susceptíveis a processos oxidativos como a hidrólise, que podem alterar o valor de pH e características organolépticas (RAMALHO, JORGE, 2006)

Para a formulação 36.6 os valores de pH (figura 23) são mantidos na faixa de 5,2-6,5 que é considerado o valor ideal de pH fisiológico da pele (LAMBERS, et al., 2006), enquanto que para a formulação EF está na faixa de valor pH de 3,5- 4,0 (figura 24) necessário para provocar a esfoliação da pele (KORNHAUSER; COELHO; HEARING, 2012).

Figura 23: Valores de pH para amostra 36.6 durante teste de estabilidade acelerada

Figura 24: Valores de pH para amostra EF durante teste de estabilidade acelerada

Na avaliação das características organolépticas, não houve alteração de cor e odor das formulações armazenadas a 4 ± 2 °C e 25 ± 2 °C, mas para as formulações que foram colocadas a 45 ± 2 °C, a coloração amarelo característico das formulações, alterou-se a partir do 30º até os 90º dia. Resultados similares foram observados por Pereira et al., (2011) quando também foi usada uma mistura de óleos como fase oleosa da dispersão, na temperatura 45 ± 2 °C.

5.11 Determinações do comportamento reológico e viscosidade

As características reológicas são propriedades importantes, já que para uma emulsão, o estudo das mesmas, poderá determinar a estabilidade física do sistema que será considerada na fabricação, estocagem e aplicação das formulações de uso tópico. Cada categoria de produto deve apresentar, assim, um comportamento reológico adequado à aplicação, sendo conveniente conhecer as velocidades de deformação às quais estarão sujeitas. Nos estudos de reologia existem os sistemas denominados Newtonianos e os não-Newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos apresentam fluxo não Newtoniano, que normalmente é representado por três tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante. Para as formulações cosmeceúticas, o fluxo pseudoplástico é o mais comum. Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento, e, portanto, sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (CORRÊA, et al., 2004; OLIVEIRA, 2010).

Figura 25: Reogramas durante o teste de estabilidade acelerada da formulação EF em diferentes temperaturas

De acordo com os reogramas (figura 25) observa-se que a formulação apresenta um comportamento tixotrópico, isto é, ao aplicar uma força no produto, a mesma causará modificação na estrutura, já que as forças de união física são relativamente fracas. Ao incrementar a taxa e cisalhamento obtém-se a curva ascendente evidenciando a modificação estrutural, e com a diminuição, obtém-se a curva descendente, mostrando a reconstituição do sistema (MAESTRO, 2002).

No dia 1 a região de histerese das amostras são pequenas, aumentando no decorrer do tempo, sendo esta mudança maior na formulação armazenada a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, mostrando uma dificuldade maior do que as formulações armazenadas em $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para retornar à estrutura inicial.

De acordo com os resultados finais, a mudança estrutural das emulsões é evidente, durante este período de tempo, o que ocorre em menor intensidade para a emulsão armazenada a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, onde a área de histerese é menor, o que supõe que nesta temperatura, a capacidade de recuperação estrutural é maior comparada com as amostras armazenadas em $4 \pm 2^\circ\text{C}$, onde a baixa temperatura exerce uma influência sobre a formulação modificando as propriedades viscoelásticas, que poderia causar um processo estrutural de geleificação da amostra (BARNES, 2000; SATO; CUNHA, 2007). Pode-se relacionar este resultado com o de condutividade elétrica que também será menor para as amostras armazenadas em $4 \pm 2^\circ\text{C}$ e, onde a quantidade de água livre é menor (KORHONEN et al., 2001).

Além da reologia, foi estudado a viscosidade suas mudanças em função do tempo e temperatura, avaliando como será o comportamento de uso da formulação em relação à espalhabilidade e força necessária para espalhar o creme sobre a pele - tensão de cedência, e difundir sobre a superfície a ser coberta (YAO; PATEL, 2001).

Figura 26: Comportamento da viscosidade durante o teste de estabilidade acelerada da formulação EF em diferentes temperaturas.

Em relação à viscosidade também foi observada as mudanças causadas pelo tempo e temperatura de armazenamento (Figura 26). Durante a primeira semana todas as formulações apresentam aumento na viscosidade, as emulsões apresentam deformação do sistema, mas não conseguem recuperar a estrutura inicial e este fenômeno foi observado mais intensamente na formulação armazenada em $4 \pm 2^\circ\text{C}$ o que indica que está formulação tem maior resistência a fluir com respeito as amostras que estavam armazenadas a $45 \pm 2^\circ\text{C}$ e $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Amostras expostas nestas duas últimas condições de temperatura têm maior facilidade de fluir e por

consequente para espalhar. Os resultados são correlacionados com os dados observados nos reogramas e na condutividade elétrica, onde as amostras armazenadas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$, apresentam menor condutividade elétrica, maior área de histerese em reogramas e diagramas de viscosidade confirmando a geleificação de formulação e diminuição de água livre (BARNES, 2000; KORHONEN, et al., 2001).

5.12 Avaliações de espalhabilidade.

As provas de espalhabilidade têm relação com a reologia das emulsões: a área na qual a formulação é difundida sobre uma superfície específica dependerá da viscosidade e da força e velocidade de cisalhamento, evidenciando a importância destes parâmetros no desenvolvimento das formulações para gerar produtos agradáveis para o consumidor.

O usuário espera que o creme seja um produto de consistência não muito fluida, mas que quando espalhado sobre a pele haja formação de uma fina película e que seja absorvida rapidamente, o que pode ser resultado da diminuição na viscosidade e aumento da velocidade de cisalhamento sobre a pele (WITTERN; BRUMMER; & GODERSKY, 2001).

Para verificar as diferenças reológicas da formulação desenvolvida, assim como diferença na área de aplicação, foi determinada a área de espalhabilidade em superfícies de diferentes perfis (tabela 15). Também foram avaliados e comparados diferentes produtos comerciais com diferentes formas e formulações (géis, emulsão O/A e A/O) (tabela 16) (Anexo C), tendo como premissa que a superfície da pele de cada pessoa e de cada zona corporal considerada pode variar de acordo com a hidratação (COUTURAUD, 2009).

Tabela 15 - Tipos de lixa e tamanho de grânulo

calibre da lixa	Tamanho dos grânulos (μm)
1200	6,5
600	16
320	36
220	64

Fonte: Carborundum, 2003; Norton, 2014.

Tabela 16 - Formulações comerciais avaliadas no teste de espalhabilidade

Produto	Tipo de forma cosmética	Zona corporal de aplicação
A	Emulsão O/A	Mãos
B	Emulsão A/O	Mãos
C	Emulsão A/O	Rosto
D	Espuma	Rosto
E	Emulsão A/O	Corpo
F	Emulsão O/A	Corpo
G	Gel	Rosto
I	Emulsão O/A	Áreas com presença de acne
H	Emulsão O/A	Corpo

Os dados obtidos foram estudados através de análise de variação ANOVA com $p < 0,05$, verificando que as amostras são significativamente diferentes, e que o desvio padrão das medidas consideradas são pequenas.

A espalhabilidade entre 4620 e 2500 mm² de área por cada a $25,0 \pm 0,5$ mg de produto aplicado da formulação D é muito maior em relação aos demais produtos comerciais extrapolando os limites da placa de vidro e por este motivo não está apresentada nos gráficos e que produtos comerciais na forma A/O apresentam menores valores de espalhabilidade..

As emulsões desenvolvidas 36.6 e EF foram comparadas com os demais produtos comerciais.

Pela figura 27, pode- se observar que o produto F emulsão O/A para uso corporal mostra valor de espalhabilidade maior, na superfície de vidro, seguido pelo produto H. Verifica- se que a formulação EF apresenta valores semelhantes de espalhabilidade.

Figura 27: Comparação dos valores de área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de vidro

Na avaliação com as diferentes superfícies de lixa (figuras 28, 29, 30 e 31) encontra-se que, a formulação EF seguida pelas formulações H e I são as que apresentam maior área de recobrimento e espalhabilidade, evidenciando que mesmo aplicada em pequenas quantidades a formulação EF é capaz de espalhar-se por uma grande superfície.

Figura 28: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 1200

Figura 29: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 600

Figura 30: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 320

Figura 31: Valores da área de espalhabilidade das diferentes formulações em superfície de lixa calibre 220

A formulação 36.6 mostra menor área de espalhabilidade devido as características de emulsão tipo gel-creme, onde a viscosidade é controlada pela presença de agentes copolímeros presentes em Hostacerin® SAF e funciona como agente gelificante o qual é sensível a mudanças no pH; quando a formulação é aditivada de ácido salicílico, a viscosidade é reduzida por efeito da redução de pH na formulação como consequência das modificações nas interações internas da rede polimérica onde se apresenta uma degradação do polímero conhecida como clivagem, o qual é comprovado pelo incremento da espalhabilidade da formulação EF (CALLISTER, 1996; ECCLESON, 1997; LOTIONCRAFTER, 2008; PHARMASPECIAL, 2002).

Os produtos comerciais tipo O/A apresentam menor espalhabilidade comparada com a formulação EF, devido à composição qualitativa que apresentam como por exemplo, a presença de agentes modificadores de viscosidade tais como polímero e gomas (Anexo C) que modificam as propriedades reológicas da formulação permitindo-lhes menor capacidade de fluidez (LABA, 2001).

De acordo com os resultados, os valores das áreas de espalhabilidade das diferentes formulações é semelhante para as diferentes superfícies com diferentes graus de tamanho de partícula e a espalhabilidade dos cremes terá maior área sobre a superfície lisa, comparada

com as superfícies que apresentam diferentes perfis conforme o tamanho de grânulo e, ainda, também depende do tipo de forma de apresentação, sendo que as emulsões O/A, espalham-se mais facilmente e precisam de menor força de cisalhamento do que emulsões A/O (tabela 17) (TADROS, 2013).

Tabela 17 -Ordem decrescente dos valores da área de espalhabilidade para os produtos testados em diferentes superfícies

Vidro	Lixa 1200	Lixa 600	Lixa 320	Lixa 220
D	D	D	D	D
F	EF	EF	EF	EF
H	H	H	H	H
EF	I	F	I	I
A	G	I	A	A
G	A	G	G	G
I	36.6	A	F	F
E	F	36.6	36.6	36.6
36.6	E	E	E	E
B	B	C	B	B
C	C	B	C	C

Outro parâmetro estudado foi a incorporação de agentes umectantes como propilenoglicol e glicerina, associados ou não aos emolientes miristato de isopropila e palmitato de isopropila, à formulação 36.6 para avaliar como estes aditivos podem contribuir com a modificação reológica (DOS SANTOS, 2010), e determinar se os mesmos podem alterar a espalhabilidade. Da mesma forma verificou-se a influência da adição de ácido salicílico sobre a espalhabilidade da formulação. Para tal foram manipuladas 6 formulações descritas na tabela 18.

Tabela 18 -Formulações para avaliação de espalhabilidade, aditivada de emolientes e/ou umectantes.

	1	2	3	4	5	6
	(%m/m)	(%m/m)	(%m/m)	(%m/m)	(%m/m)	(%m/m)
Propilenoglicol	3,0	3,0	3,0	0	0	0
Glicerina	0	0	0	3,0	3,0	3,0
Palmitato de isopropila	0	2,0	0	0	2,0	0
Miristato de isopropila	0	0	2,0	0	0	2,0
Mistura de óleos (*)	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Hostacerin® SAF	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Phenova®	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Água Purificada	81,73	79,73	79,73	81,73	79,73	79,73

(*) Mistura de óleos 1:1:1 buriti, urucum e cenoura

Após 24 horas a espalhabilidade das formulações foram avaliadas em placa de vidro e em diferentes lixas visando determinar a influência dos aditivos nos valores de espalhabilidade (figuras 32 até 36).

Figura 32: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de vidro

Figura 33: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa calibre 1200

Figura 34: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa calibre 600

Figura 35: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa de 320

Figura 36: Valores da área de espalhabilidade das diferentes emulsões em superfície de lixa de calibre

Com relação à variabilidade da extensão de espalhabilidade ordenada de forma decrescente (tabela 19), observa-se diferenças maiores comparadas com o ensaio com produtos comerciais. Neste caso observa-se que os emolientes e umectantes adicionados à emulsão 36.6 influenciam na espalhabilidade da mesma, conferindo valores maiores de área de espalhabilidade como acontece com a formulação EF. Os emolientes conferem capacidade maior de espalhabilidade pois reduzem o coeficiente de fricção sobre as superfícies testadas modificando a área de espalhamento total (SAVARY; GRISEL; PICARD, 2013).

Tabela 19 -Ordem decrescente de área para as formulações testadas em diferentes superfícies.

	Vidro	Lixa 1200	Lixa 600	Lixa 320	Lixa 220
	EF	EF	EF	EF	EF
	5	3	1	3	1
	1	4	4	1	4
	4	1	3	4	6
	6	5	5	5	2
	3	2	2	6	3
	36.6	6	6	36.6	36.6
↓	2	36.6	36.6	2	5

Legenda: os números correspondem às formulações apresentadas na tabela 18.

Finalmente, observou-se que a adição de ácido salicílico e óleo de melaleuca modificam as propriedades de espalhabilidade da emulsão 36.6. Para formulações para tratamento da acne, o produto com maior valor de área de espalhabilidade é ideal pois uma pequena quantidade da formulação poderá atuar sobre a área cutânea afetada com uma força de cisalhamento menor, para garantir a ação localizada e rápida dos componentes antiacne, e ainda, possibilitando aplicação mais confortável do produto para o consumidor (VIJAYALAKSHMI; TRIPURA; RAVICHANDIRAN, 2011; WITTERN; BRUMMER; GODERSKY, 2001).

5.13 Avaliação de capacidade queratolítica

Para os produtos antiacne é importante a ação queratolítica das formulações, já que estas substâncias podem solubilizar e mesmo destruir a matriz celular incluindo as proteínas fibrosas como queratina e colágeno. (FLOREZ, 2012).

Para realizar um modelo que permitisse determinar o comportamento queratolítico das formulações, foi usado unidades de gelatina (biocomposto usado em bioengenharia que apresenta similitudes com as fibras proteínas do colágeno e elastina) (MAO; YIN; DE YAO, 2003; OLIVEIRA, 2013).

Tabela 20 - Comparação entre os aminoácidos de colágeno e queratina humanos com os encontradas em gelatina (*)

Aminoácidos	Colágeno	Queratina	Gelatina
Alanina	+	+	+
Arginina	+	+	+
Ácido Aspartico	+	+	+
Cisteína	-	+	+
Ácido glutâmico	+	+	+
Glicina	+	+	+
Histidina	+	+	+
Hidroxilisina	+	-	-
Hidroxiprolina	+	-	+
Isoleucina	+	+	+
Leucina	+	+	+
Lisina	+	+	+
Metionina	+	+	+
Fenilalanina	+	+	+
Prolina	+	+	+
Serina	+	+	+
Treonina	+	+	+
Tirosina	+	+	+
Valina	+	+	+

(*) OLIVEIRA, 2013; SCHUELLER; ROMANOWSKY, 1999.

Proteínas como o colágeno e a elastina são duas proteínas chaves na estrutura da matriz extracelular (ECM), encontrado-se em muitos tecidos, estas proteínas são importantes moduladores para as propriedades físicas do suporte de celular. A queratina é uma fibra que tem alto potencial em aplicações de bioengenharia, já que pode ser utilizada na construção de simuladores da matriz celular; como várias biomoléculas de origem natural, a queratina tem atividade biológica intrínseca e biocompatível, ainda que é um componente excelente para os simuladores da estrutura da matriz celular, sua capacidade de suporte é limitada pelo qual é associada com compostos como a gelatina, que é basicamente um colágeno desnaturalizado que não mostra antigenicidade, apresenta propriedades de suporte, flexível e é usada em diferentes aplicações biomédicas e farmacêuticas (BALAJI, et al., 2012).

A gelatina é composta de aminoácidos unidos por ligações peptídicas entre o grupo amino de um aminoácido com o grupo carboxílico de outro aminoácido. Contém quantidades específicas de 18 aminoácidos diferentes, dentre os quais metionina, valina, isoleucina, leucina, fenilamina, triptofano, lisina, treonina, histidina e arginina que juntam-se em sequência para formar cadeias mais longas. A composição de aminoácidos da gelatina é a mais próxima da composição do colágeno humano (Tabela 20) que é caracterizado por uma repetição de glicina; prolina e hidroxiprolina (OLIVEIRA, 2013).

Para a avaliação da capacidade queratolítica foi feita uma solução gelatina adicionada com outros componentes presentes no NMF, incluindo o PCA- Na que é o principal catabólito da filagrina, uma proteína encontrada na camada granular da epiderme, e desdobrada numa mistura de aminoácidos durante a última fase da queratinização (CLAR; FOUNTAINER, 1981). Desta forma propõe-se uma avaliação *in vitro* de agentes cicatrizantes em modelo do extrato córneo com a grande vantagem de baixo custo.

Como controle positivo de ação cicatrizante, foi usada uma solução de alantoina a 10,0% e, como controle negativo, foi usada uma solução etanólica de ácido salicílico a 10,0%. Para comprovar a presença de ácido salicílico nas formulações foi usada uma solução de sulfato de ferro a 20% que reage com ácido salicílico (figura 37) gerando uma cor púrpura escuro (GEISSMAN, 1974).

Figura 37: Reação de ácido salicílico com sais de ferro

Fonte: GEISSMAN, 1974

Mediante reações em tubo de ensaio pode-se observar diferentes reações entre a solução de gelatina com a alantoina, o ácido salicílico e a formulação EF (figura 38).

Figura 38: Reação das amostras com ácido salicílico com sais de ferro.

(Onde: A é a solução de alantoina a 10%, B é a formulação contendo 2,0% de ácido salicílico e C é a formulação EF, onde posteriormente foi adicionada a solução de sulfato de ferro III).

Em relação aos ensaios feitos sobre as células de gelatina (figura 39), as amostras foram rotuladas como:

- 1: solução de ácido salicílico 2,0%;
- 2: formulação EF;
- 3: produto comercial Brasileiro ;
- 4: alantoína solução de 10,0%;
- 5: produto comercial da Colômbia;
- 6: formulação 36.6.

Observa- se valores maiores de abertura da gelatina para as fissuras com o controle positivo (1) e com formulação EF (2). Para os demais as fissuras apresentam- se fechadas.

Figura 39: Células de gelatina depois 24 horas depois de colocar as diferentes amostras testadas.

Os dados de valores das aberturas na gelatina foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA com $p < 0,05$, determinando- se que existe uma diferença significativa entre

as amostras, sendo que a maior proporção é o controle positivo, seguido da formulação EF (figura 40).

Figura 40: Valores das aberturas da gelatina nas diferentes amostras testadas.

De acordo com o rótulo do produto comercial colombiano, este contém ácido salicílico para o tratamento de acne, mas os resultados não mostraram dissolução da queratina evidenciando a ação do ácido salicílico sobre as proteínas. A presença do ácido salicílico é comprovada na presença de solução de ferro III e é comparada com a amostra da formulação EF (figura 41), e esta reação demonstra que não identificou a presença do ácido salicílico no produto colombiano.

Figura 41: Amostra 2 (EF) e 5 (produto colombiano) em presença de sais de ferro.

Com este teste, podemos confirmar a presença de ácido salicílico, como agente queratolítico que poderá solubilizar as proteínas, tais como o colágeno e queratina, como pode-se observar tanto no teste feito em tubo de ensaio (Figura 38) como nas células de gelatina (Figura 39 e 40). A avaliação do efeito queratolítico define a eficácia dos produtos, quanto à remoção de camadas de queratina para facilitar a penetração de ativos anti acne (FLORÉZ, 2012).

5.14 Análise microbiológica

5.14.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes (*P. acnes*) é um organismo lipofílico, Gram-positivo, anaeróbio, de crescimento lento, resistente a fagocitose, flora residente normal da pele e de outros tecidos (cavidade oral, nasal, intestinal, intraocular, etc.). Desenvolve-se mais na superfície da pele em áreas ricas em glândulas sebáceas, e há diferenças na colonização em relação ao local da idade e do corpo. Os níveis aumentam na puberdade e concentram-se na face e couro cabeludo. Seu papel como agente patogênico na acne ainda não está bem esclarecida. No entanto, existe uma correlação elevada entre a produção de sebo e os níveis de *P. acnes*. O sebo aparentemente serve de substrato para o crescimento das bactérias que têm grande capacidade de adaptação ao meio no qual crescem sendo capazes de gerar resistência aos antibióticos e outros compostos (BHATIA, MAISONNEUVE, PERSING, 2004; BOJAR, HOLLAND, 2004; KAMINSKY, 2012).

Como se mostra na figura 42, todas as placas apresentam coloração vermelha própria do crescimento do microrganismo em todas as amostras avaliadas, os nomes das amostras representadas pelos números são indicados na tabela 21.

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) encontrados das amostras avaliadas estão apresentados na Tabela 21. As amostras avaliadas não apresentaram atividade. Entretanto, o controle positivo penicilina não apresenta atividade frente a este microrganismo, resultado similar foi encontrado por Rodriguez, Mora e Prenda (1989) onde foi encontrado diferentes cepas de *P. acnes* resistentes à penicilina, pelo qual o tratamento mais usado como bacteriostático ou bactericida são antibióticos como clindamicina ou eritromicina com os quais mostra menor resistência.

Figura 42: placas com *P. acnes* em presença de resazurina 0,02% para as diferentes amostras.

Tabela 21 -Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das diferentes amostras para *Propionibacterium acnes* ATCC 6919

Amostra	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
2. formulação EF	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
3. formulação 36.6	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
4. produto comercial colombiano	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
5. produto comercial brasileiro	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
6. antibiótico	$\geq 5,90$	$\geq 5,90$	$\geq 5,90$	$\geq 5,90$	$\geq 5,90$	$\geq 5,90$

5.14.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método de microdiluição em microplaca para *Staphylococcus epidermidis*

O *Staphylococcus epidermidis* é outro microrganismo importante na patologia da acne que se encontra na área mais superficial da pele comparado com o *P. acnes* que se encontra na parte inferior do folículo. Este microrganismo determina o aparecimento de pápulas e pústulas por inflamação e infecção do extremo superficial do folículo piloso (KAMINSKY, 2012), e desenvolve-se de forma predominante na patologia da acne (NISHIJIMA ET AL., 2000)

A determinação de crescimento foi evidenciada pela mudança de cor dada pela resazurina ao 0,02 % que tem coloração azul quando tem inibição do crescimento de microrganismos como se mostra na figura 43, onde os nomes das amostras representadas pelos números são os indicados na tabela 22.

Figura 43: Placas com *S. epidermidis* em presença de resazurina 0,02% para as diferentes amostras

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) das amostras avaliadas estão apresentados na Tabela 22.

As amostras 4 e 5 correspondentes aos produtos comerciais não apresentaram atividade. As amostras 2 e 3 apresentaram valores de CIM que variaram no terceiro experimento quando comparados aos valores obtidos no primeiro e no segundo experimento, mas dentro do intervalo permitido para a técnica, que é o da variação de um poço, considerando a realização de diluição seriada. Assim, nas placas 1 (experimento 1) e 2 (experimento 2), os valores de CIM obtidos foram idênticos, mas variaram na placa 3 (experimento 3).

Tabela 22 -Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das diferentes amostras para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

Amostra	Placa 1		Placa 2		Placa 3	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
2. formulação EF	50	≥ 400	50	≥ 400	25	≥ 400
3. formulação 36.6	50	≥ 400	50	≥ 400	25	≥ 400
4. produto comercial colombiano	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
5. produto comercial brasileiro	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400	≥ 400
6. antibiótico	1,475	5,90	1,475	5,90	1,475	5,90

As amostras EF e 36.6 apresentam resultados similares na CIM e CBM, o que mostra que a adição de ácido salicílico e óleo de melaleuca não foi determinante para a inibição do *Staphylococcus epidermidis*, ainda que outros estudos mostram que o óleo de melaleuca pode ter atividade sobre o mesmo (CARSON, HAMMER, RILEY; 2006) a adição não potencializa o efeito antimicrobiano. Quanto à formulação 36.6 mostra que pode inibir o crescimento do microrganismo, o que pode ser causado pela presença dos óleos vegetais que contêm compostos polifenólicos que inibem o crescimento de microrganismo, tornando os óleos vegetais uma nova alternativa para o tratamento de diferentes doenças da pele (MORENO, et al., 2006; NELSON et al, 2016; VIJAYALAKSHMI, TRIPURA, RAVICHANDIRAN; 2011).

6 CONCLUSÕES

Os óleos de cenoura, buriti e urucum têm atividade antioxidante, encontrado-se a melhor capacidade de antioxidante equivalente trolox em óleo de cenoura, mas uma quantidade maior de fenóis totais em óleo de buriti.

Através da técnica de diagrama ternário foi possível produzir emulsões estáveis, usando como fase oleosa a mistura de óleos de cenoura, buriti e urucum em proporções (1:1:1), e usando como autoemulsionante Hostacerin[®] SAF; derivada desta emulsão foi possível desenvolver uma formulação aditivada de ácido salicílico e óleo de melaleuca, que também demonstrou ser estável.

Encontra-se diferenças organolépticas, físico-químicas e reológicas entre eles emulsões aditivadas de ácido salicílico e óleo de melaleuca (EF) com as emulsões não aditivadas (36.6), dando como resultado na emulsão EF um pH e viscosidade mais baixo, maior condutividade no que se refere a emulsão 36.6 .

Quanto à avaliação da espalhabilidade a formulação EF apresenta boa cobertura da área com pouca quantidade de produto, sendo avaliados em diferentes superfícies e em comparação com produtos diferentes. A formulação 36.6 adicionada de agentes emolientes e umectantes não apresenta valores de espalhabilidade comparado ao da emulsão EF.

Na avaliação da atividade queratolítica, observa-se que há uma reação entre a queratina e ácido salicílico quantificada para determinar a potencial formulação EF comparada com produtos encontrados no mercado, demonstrando que a formulação EF apresenta a ação desejada.

.Na avaliação microbiológica realizada sobre os principais bactérias causadores da acne *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus epidermidis*, determinou-se que as formulações desenvolvidas 36.6 e EF, apresentam efeito bacteriostático sobre *S. epidermidis*, e nenhum efeito sobre o *P. acnes* sendo resistentes aos antibióticos, e isto permitir sugerir que as mesmas poderiam ser aplicadas em pacientes cuja proliferação do *S. epidermis* é predominante na patologia da acne.

REFERENCIAS

ABBOTT, S. **Surfactant Science, Principles and practice**. Leeds, Inglaterra: Creative Commons. 2015

ABIHPEC. **Associação Brasileira da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos**. disponível em <https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2015-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-11ago2015.pdf>. Acesso em 06 de julho de 2016

ABURJAI, T.; NATSHEH, F. M. Plants used in cosmetics. **Phytotherapy research**, v.17, n.9, p. 987-1000. 2003

ALI-SHTAYED, M.; AL-ASSALI, A.; JAMOUS, M. Antimicrobial activity of Palestinian medicinal plants against acne-inducing bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, v.21, n.7, p. 2560-2573. 2013

ÁLVAREZ, E.; JÍMENEZ, J.; POSADA, C.; ROJANO, B.; GIL, J.; GARCÍA, M., DURANGO, D. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos contenidos en las bayas de dos especies del género vismia (Gutiferae). **Revista de la facultad de Química Farmacéutica**, v.15 n.1, p. 165-172. 2008

ANDRADE, F. **Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éster fosfórico**. 2008. 151 f. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008

ANSEL, H.; POPOVICH, N.; ALLEN, L. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6º ed. São Paulo: Premier. 2000

ANVISA. **Resolução RDC nº 79**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79_2000.pdf . Acesso em 1 de junho de 2015.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em http://portal2.saude.gov.br/saudelegis/LEG_NORMA_PESQ_CONSULTA.CFM. Acesso em 5 junho de 2016.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosmeticos**, v. 1. São Paulo. maio 2004

ARAÚJO, P.; TESCAROLLO, I. Desenvolvimento e avaliação de formulações em gel para veiculação de ácido salicílico. **Revista Multidisciplinar de saúde**, v.3, n.5, p 26-30. 2011

AZIMI, H.; FALLAH-TAFTI, M.; ASGHAR, A.; ABDOLLAHI, M. A review of phytotherapy of acne vulgaris: Perspective of new pharmacological treatments. **Fitoterapia**, v. 83, p.1306–1317. 2012

AZZINI, R.; LICURSI, L.; ROCHA FILHO, P. Development and in vitro evaluation of emulsion containing canola oil and carboxylic acids. In: Anais, **XIV Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos** p. 157-164. Santiago de Chile. 1999

BAGATIN, E. **Sociedade Brasileira de Dermatologia**. Disponível em <http://www.sbd.org.br/doencas/acne-2/>. 2014. Acesso em junho de 22 de 2016,

BALAJI, S.; KUMAR, R.; KAKKAR, P.; RAMESH, D., REDDY, P.; SEHGAL, P. Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v.32, p.975–982. 2012.

BARNES, H. **A handbook of elementary rheology**. Wales: University of Wales. 2000.

BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B.; RODRIGUES, C. M.; PAIVA, E.; MEDEIROS, A. D. Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa*. **Ciência rural**, v. 42 n.1, p 136-141. 2012.

BAUMAN, L. Dermatologia cosmetica. In: K. WOLFF; L. GOLDSMITH; S. KATZ; B. GILCHREST; A. PALLER; D. LEFFELL, **Fitzpatrick Dermatologia en medicina general** p. 2359. Madrid: Panamericana. 2009.

BAUMANN, L. Understanding and Treating Various Skin Types: The Baumann Skin Type Indicator. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 3, p. 359–373. 2008

BECHER, P. **Emulsions: theory and practice**. 1965

BHATIA, A.; MAISONNEUVE, J. F.; PERSING, D. H. Propionibacterium acnes and chronic diseases. In **The Infectious Etiology of Chronic Diseases: Defining the**

Relationship, Enhancing the Research, and Mitigating the Effects--Workshop Summary p. 74, National Academies Press. 2004

BLAINSKI, A.; LOPES, G.; MELLO, J. 2013. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules**, p. 6852-6864. 2013

BOJAR, R. A.; HOLLAND, K. T. Acne and *Propionibacterium acnes*. **Clinics in dermatology**, v.22, n.5, p. 375-379. 2004

BOOCK, K. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de emulsões contendo cristais líquidos e ativos hidratantes à base de mantiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) ou cacau (*Theobroma cacao*)**. 2007. p 112 . Dissertação de mestrado. - (Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2007

BOODTS, J.. **Estabilidade química e física de formulações dermocosméticas contendo retinaldeído**. 2003.123 p. Dissertação de mestrado. (Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2003

BORGEZ, L.; CARVALHO, T.; SOUZA, E.; FERNANDES, E. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.12; p. 1-7. 2011

BRACONI, F.; OLIVEIRA, I.; BARONI, M.; ROCHA FILHO, P. Aplicação cosmética do óleo de canola. En: **Anais XII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos** p. 6-19. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia. 1995

BRIGANTI, S., PICARDO, M. Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. **European Academy of Dermatology and Venereology**, v.17, p.663–669. 2003.

CALLISTER, W. **Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales**. Ed. Reverte. 1996

CAMPESTRE. **Óleo de cenoura**. Disponível em <http://www.campestre.com.br/oleo-de-cenoura.shtml>. 2005. Acesso em: 08 fevereiro de 2016

CANADIAN DERMATOLOGY ASSOCIATION. **Canadian Dermatology Association**, disponível em <http://www.dermatology.ca/skin-hair-nails/skin/acne/#!/skin-hair-nails/skin/acne/stages-of-acne/>. Acesso em 2016 de junho de 2016

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

CARBORUNDUM. **Informativo técnico**, n. 5. 2003

CARSON, F.; HAMMER, A.; RILEY, T. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical microbiology reviews**, v.19, n.1, p.50–62. 2006

CLAR, E., FOUNTAINER, A.. Pyrrolidone carboxylic acid and the skin. **International Journal Cosmetics Science**, p. 101-113. 1981

CLAYTON, W. **Theory of emulsions and their technical treatment**. 1943

CORRÊA, N.; CAMARGO, F.; IGNÁCIO, R.; RICCI, G. 2004. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofilicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n.1, p. 73-78. 2004

COUTURAUD, V. Biophysical Characteristics of the skin in relation to race, sex, age and site. In: A. Barel, M. Paye, & H. Maibach, **Handbook of Cosmetics Science and Technology** . 3º ed., p. 5-9. New York: Informa Healthcare. 2009

CUNHA, B. Tecnologia das emulsões. **Revista de Farmacia Bioquímica Universidade de São Paulo**, v. 8 n.2, p.148-170. 1970

DAVIS, H. Analysis of creams and lotions. In: A. SENZEL, **Newburguer's Manual of Cosmetic Analysis**, p. 32. Washington. 1997

DEL CARPIO, E.. **Estabilidad de emulsiones agua-crudo Boscan efectos de sales polivalentes, alcoholes y glicoles**. 2011. 138 p. Disertación de maestria. (Ciencias Quimicas) -Facultad de Quimica; Universidad Simon Bolivar, Sertenejas, Venezuela. 2011

DIAS, B.; WEINGART, D.; ZARUR, M.. Technological Aspects of β -Carotene Production. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 693–701. 2011

DOSSANTOS, H. Emoliencia y Emolientes. **Cosmetics & Toiletries**, p. 28-30. 2010

DOWNING, D. T.; STEWART, M. E.; WERTZ, P. W.; STRAUSS, J. S. Essential fatty acids and acne. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.14, n.2, p.221-225. 1986

ECCLESON, G. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 123, p. 169 182. 1997

ENGELS, T.; VON RYBINSKI, W. Liquid crystalline surfactant phases in chemical applications. **Journal of Materials Chemistry**, v.8, n.6, p. 1313-1320. 1998

FAGUNDES, L. **Revista cabelereiros**. Disponível em <http://revistacabelereiros.com/materia/cosmeceuticos-ciencia-ou-marketing-inteligente/31> 2010. Acesso em 06 de 06 de 2016,

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexina e óleo de andiroba (Carapa guyanensis)**. 2002. Tese de Doutorado. (Ciências Farmacêuticas).-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2002

FERRARI, M.; MONTEIRO, L.; NETZ, D.; ROCHA FILHO, P.. Identifying cosmetic forms and crystalline phases from ternary systems. **Cosmetics & Toiletries**, v.118; n.8, p. 61-70. 2003

FERREIRA, G., SANTOS, G. Tratamiento tópico. Em: A. KAMINSKY, M. FLÓREZ, **Acné: un enfoque global**, p. 141-152. Buenos Aires: Alfa omega. 2012.

FLORÉZ, M. Procedimientos complementarios antiacne. Em: A. KAMINSKY, M. FLORÉZ, **Acné: Un enfoque global** p. 245-247. Buenos Aires: Alfaomega. 2012

FRIBERG, S. E. Micelles, microemulsions, liquid crystals, and the structure of stratum corneum lipids. **J. Soc. Cosmet. Chem**, v. 41, p. 155- 171. 1990

FRIBERG, S., GOLDSMITH, L., HILTON, M. Pharmaceutical Dosage forms: Dysperse Systems. Em: H. Lieberman, R. M., Banker, **Theory of emulsions**, p. 49-91. New York: Marcel Dekker Inc. 1988.

GARCIA, E., FERNANDEZ, I., FUENTES, A. **Determinación de polifenoles totales por el método Folin-Ciocalteu. Valencia.** Universitat Politecnica de Valencia. 2012

GEISSMAN, T. **Principios de Química Organica.** Madrid: Editorial Reverte. 1974

GERSON, J. Productos para el cuidado de la piel: Química, ingredientes y selección. In: J. Gerson, **Milady Standard.** p. 305-346. New York: Cengage learning. 2013

GÓMEZ, C. **El acné y su tratamiento.** Costa Rica: Centro de información de medicamentos. 2013

GROSSI, G. **Óleo de buriti (Mauritia Flexuosa L.) nanoemulsionado: produção por método de baixa energia, caracterização físico-químico das dispersões e incorporação em bebida isotônica.** 2015. 106. Dissertação de mestrado. (Ciências da Engenharia de alimentos) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de alimentos, Brasil, Universidade de São Paulo. Pirassununga 2015

GULLAPALLI, R.; SHETH, B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions. **European Journal Pharmacy Biopharmceuticals**, v. 48, p. 233-238. 1999

GUZMAN, R., TANG, H., SALLEY, S. Synergistic effects on antioxidants on the oxidative stability of soybean oil-and poultry fat- based biodiesel. **Journal of the american oil chemist's society.** v. 86, p. 459-467. 2009

HALL, C. Other natural antioxidants – rice bran oil, sesame oil, rosemary extract, flavonoids. In: C. Ballabio, **Lipids for Functional Foods and Nutraceuticals.** p. 73–112 Ed. Woodhead. 2012

HOLMBERG, K., JONSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAN, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution.** 2° ed. John Wiley & Sons. 2002

IUPAC. Colloid Interface. **Chem. Pure Appl. Chem**, v.31, n. 578. 1972

JARAMILLO, L. **Química orgánica general** , Disponível em: http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://objetos.univalle.edu.co/files/Archivos_carboxilicos_y_sus_derivados.pdf&gws_rd=cr&ei=Llt7V6uUA8e8wASO0ZuQCw

2005. Acesso em 01 de julho de 2016

KAMINSKY, A. **Acne: Un enfoque global**. Buenos Aires: Alfaomega.2012

KLOCKER, C. **Estudo fitoquímico de Bixa orellana L., Bixaceae e aplicação de seu óleo na indústria cosmética**. 2007. 115 f. Dissertação de mestrado. (Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007

KNORST, M.; BORGHETTI, G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtros solares. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.4, p. 531-537.2006

KOLARSICK, P.; KOLARSICK, M.; GOODWIN, C. Anatomy and physiology of the skin. **Journal of the dermatology nurse's association**, v. 3, n.4 .2011.

KOOLEN, H. H.; DA SILVA, F. M.; GOZZO, F. C.; DE SOUZA, A. Q.; SOUZA, A. D. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by UPLC–ESI-MS/MS. **Food Research International**, v.51, n.2, 467-473. 2013

KORHONEN, M.; HELLEN, L.; HIRVONEN, J.; YLIRUUSI, J. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations-effect of storage time and conditions. **International journal of pharmaceutics**, v.221 n.1, p. 187-196. 2001

KORNHAUSER, A.; COELHO, S.; HEARING, V. Effect of cosmetic formulations containing Hidroxiacids on sun exposed skin: current Applications and future Developments. **Dermatology research and practice**, p. 1-6. 2012

KUSAKARI, K.; YOSHIDA, M.; MATSUZAKI, F.; YANAKI, T.; FUKUI, H.; DATE, M. Evaluation of post-application rheological changes in cosmetics using a novel measuring device: Relationship to sensory evaluation. **Journal of cosmetics**, v. 54, n.4, p. 321-334. 2003

LABA, D. How do I thicken my cosmetic formula? **Cosmetics and toiletries**, v.116, n.11, p. 35-48. 2001

LAMBERS, H.; PIESSENS, S.; BLOEM, A.; PRONK, H.; FINKEL, P. Natural skin surface pH is on average below 5, which is beneficial for its resident flora. . **International journal of cosmetic science**, v.28, n.5, p. 359-370. 2006

LATREILLE, B.; PAQUIN, P. Evaluation of emulsion stability by centrifugation with conductivity measurements. **Journal of food science**, v. 55, n.6, p. 1666-1668. 1990

LOTIONCRAFTER. **Aristoflex**. Disponível em: <http://www.lotioncrafter.com/aristoflex-avc.html>. 2008. Acesso em: 15 de março de 2016.

LODÉN, M. Role of Topical Emollients and Moisturizers in the Treatment of Dry Skin Barrier Disorders. **American journal of clinical dermatology**, v. 4, n.11, p. 771-788. 2003

MACEDO, O. **Cosméticos e Cosmecêuticos**. Disponível em: <http://derme.com.br/tratamentos/cosmeticos-e-cosmeceuticos/>. (02 de Janeiro de 2014) Acesso em 06 de julho de 2016.

MAESTRO, A. **Reologia de espesantes celulósicos para pinturas al agua: Modelización y mecanismo del espesamiento asociativo**. 2002 Tesis Doctoral. (Química) -Facultad de Química de la Universidad de Barcelona, Barcelona, 2002

MANELA-AZULAY, M.; BAGATIN, E. Cosmeceuticals vitamins. **Clinics in Dermatology**, v. 27, p. 469–474. 2009

MANOJLOVIC, J. The krafft temperature of surfactant solutions. **Thermal Science**, v.16, n.2, p. 631-640.2012

MAO, J. S.; YIN, Y. J.; DE YAO, K. The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods. **Biomaterials**, v. 24 n. 9, p. 1621-1629. 2003

MARTINEZ, A. **Evaluacion de la actividad antioxidante y de su fraccion insaponificable de los frutos de Maurutia flexuosa (morete), Bactris gasipaes (chonta), Plukenetia volubilis (Sacha inchi) y Oneocarpus Batahua (ungurahua), utilizando los metodos DPPH**. 2011. 131 p. Tesis de graduación. (Biotecnología) -Facultad de Biotecnología, Universidad Salesiana de Quito, Quito. 2011

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. 2009. 177 p.Tese de Doutorado. (Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2009

MARUNO, M.; ROCHA FILHO, P. O/W Nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of dispersion science and technology**, v. 31, p.17-22. 2010

MASMOUDI, H.; DREAU, Y. L.; PICCERELL, P., KISTER, J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method:FTIR. **International Journal of Pharmacist**, v. 289, p. 117-131. 2005

MASSON, D.; MORAIS, G.; MORAIS, J.; ANDRADE, F.; SANTOS, O.; OLIVEIRA, W.; ROCHA FILHO, P. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence in liquid crystal formation and rheological behaviour of O/W emulsions. **Journal Dispersion Science technology**, v.26, n.4, p. 463-468. 2005

MORAIS, J.; DOS SANTOS, D.; AZZINI GONÇALVES, R.; ROCHA-FILHO, P. Physicochemical Characterization of Canola Oil/Water Nano-emulsions Obtained by Determination of Required HLB Number and Emulsion Phase Inversion Methods. **Journal of Dispersion Science and Technology** , v.27, n.1, p. 109-115. 2006

MORAIS, J. **Desenvolvimento de avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não-iônico derivado do óleo de ricino**. 2008. 216 p. Tese de doutorado. (Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008

MORAIS, J.; ROCHA FILHO, P.; BURGUESS, D. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. **Langmuir**, v. 25, n.14, p. 7954-7961. 2009.

MORENO, S.; SCHEYER, T.; ROMANO, C. S.; VOJNOV, A. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. **Free radical research**, v. 40, n.2, p. 223-231. 2006

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition**. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, K.; LYLES, J. T.; LI, T.; SAITTA, A.; ADDIE-NOYE, E.; TYLER, P.; QUAVE, C. Anti-acne activity of Italian medicinal plants used for skin infection. **Frontiers in Pharmacology**, v.7. 2016

NISHIJIMA, S.; KUROKAWA, I.; KATOH, N.; WATANABE, K. The bacteriology of acne vulgaris and antimicrobial susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from acne lesions. **The Journal of dermatology**, v. 27, n. 5, p. 318-323. 2000

NORTON. **Catalogo de produtos**. 2014

OKUMA, C. **Desenvolvimento de emulsões com fase gel lamelar á base de óleo de calêndula (*calendula officinalis*) e avaliação da atividade cicatricial em úlceras cutâneas de ratos**. 2013. 109 p. Tese de doutorado.(Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto 2013

OLIVEIRA, E. **Desenvolvimento e caracterização de creme para as mãos contendo cristais líquidos, para auxilio no tratamento de doenças ocupacionais**. 2010. 132 p. Dissertação de mestrado (Ciências Farmacêuticas).- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. 2010

OLIVEIRA, L. **Obtenção e caracterização de membranas de gelatina e membrana de gelatina com prata para uso em regeneração tecidual guiada**. 2013. 80 f. Dissertação de mestrado. (Bioengenharia) - Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2013

ORTEGA, S. **Cósmeticosbr**. Disponível em Site de Site de: <http://www.cosmeticosbr.com.br/conteudo/article/acne-um-mercado-para-atender-a-175-milhoes-de-jovens/>. 2015. Acesso em 30 de abril de 2016.

PALOMINO, L.; GARCÍA, C.; GIL, J.; ROJANO, B.; DURANGO, D. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). **Vitae, Revista de la facultad de química farmacéutica**, v.16, n.3, p. 388-395. 2009

PATHER, S.I.; NEAU S; PATHER, S. A comparison of two quality assessment methods for emulsions. **Journal Pharmacy Biomedical**, v.13, p.1283-1289. 1995

PEREIRA, T. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A a base de óleo de framboesa, maracujá e pessego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação.** 2010. 119 f. Dissertação de mestrado. (Ciências Farmacêuticas) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011

PEREZ, S.; CUEM, M.; BECERRA, R. El achiote. **Biodiversitas**, v. 4, p. 7-11. 2003

PEROLA **Como saber o tipo de tratamento ideal.** Disponível em: <http://www.dicadeperola.com.br/2015/10/como-saber-o-tipo-de-tratamento-ideal.html>. Acesso em: 06 de junho de 2016

PHARMASPECIAL. Hostacerin SAF. **Informativo tecnico.** São Paulo, Brasil. 2002

PINTO, T. J.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos.** 2º ed. São Paulo: Atheneu.2003

PIQUERO, J.; HERANE, M.; NACCHA, E.; MOLINA, T. Fisiopatología y patogenia. In: A. KAMINSKY, A; FLÓREZ, M **Ácne: un enfoque global** . p. 17-46. Buenos Aires: Alfaomega. 2012

PREETHA, J.; KARTHIKA, K. Cosmeceuticals an evolution. **International Journal of ChemTech Research**, v.1, n.4, p.1217-1223. 2009

RAMALHO, V.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29 n.4, p.755-760. 2006

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

RESZKO, A.; BERSON, D.; LUPO, M. Cosmeceuticals: Practical Applications. **Dermatologic Clinics**, v. 27, n.4, p. 401–416. 2009

RIEGER, M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmetic & Toiletries**, v.,8 n.5, p. 24-26. 1996

RIGO, L. A.; WEBER, J.; SILVA, C. B.; BECK, R. C. Evaluation of the spreadability of pharmaceutical or cosmetic semisolid formulations using scanned images. HYPERLINK "http://www.latamjpharm.org/" **Latin American Journal of Pharmacy** , v.31, p. 1387-91. 2012

RODRÍGUEZ, E.; VARGAS, P. Etiología bacteriana y susceptibilidad a antibióticos en pacientes con acné. **Revista Biomedica**, v.15, p. 101-106. 2004

RODRÍGUEZ, E.; MORA, J.; PRENDAS, O. Acne vulgaris: bacterias aisladas y su susceptibilidad a los antibióticos. **Rev. Cost. Cienc. Med.**, v. 10, p. 23-30. 1989

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

SALANGER, L.; ANTÓN, R. **Formulación: HLB, PIT Y R de Winsor**, 2º. Ed. Química, Mérida, Venezuela: Universidad de los Andes. 1998

SAMPAIO, S.; RIVITTI, E. Pele normal. Em: S. SAMPAIO, E. RIVITTI, **Dermatologia**, 2ª Ed. p. 3-35. São Paulo: Artes medicas. 2001

SANTOS, O.; MIOTO, J.; MORAIS, J.; ROCHA FILHO, P. Attainment of emulsions whit liquid crystal from marigold oil using be required HLB method. **Journal of Dispersion Science and tecnology**, v. 26, n. 2, p. 243-249. 2005

SATO, A. C.; CUNHA, R. L. Influência da temperatura no comportamento reológico da polpa de jabuticaba. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** , v. 27, n. 4, 890-896. 2007

SAVARY, G., GRISEL, M., PICARD, C. Impact of emollients on the spreading properties of cosmetic products: A combined sensory and instrumental characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 371-378. 2013.

SBCD. **Sociedade Brasileira de Cirugia Dermatologica**.Disponível em: <https://www.sbcd.org.br/pagina/1586>. 2011. Acesso em 06 de 06 de 2016

SBD. **Sociedade Brasileira de dermatologia**. Disponível em: <http://www.sbd.org.br/cuidados/tipos-de-pele/>.2014. Acesso em 06 de junho de 2016

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R. M. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.9, n.3, p. 199-210.1998

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKY, P. **Conditioning Agents for Hair and Skin**. New York: Marcel Dekker. 1999

SCIENCE. **Department of plant science.** Disponível em: <http://www.plantsciences.ucdavis.edu/plantsciences/> 2016. Acesso em: 24 de janeiro de 2016

SEBRAE. **Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.** Disponível em http://www.funcex.org.br/material/redemercosul_bibliografia/biblioteca/ESTUDOS_BRASIL/BRA_167.pdf. 2008. Acesso em 06 de 06 de 2016,

SHALITA, A. Acne: Clinical Presentations. **Clinics in Dermatology**, v. 22, p.385-386.2004

SHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Understanding emulsions. **Cosmetics & Toiletries**, v.113, n. 9, p.39-44. 1998

SILVA, E.; SOARES, I. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v.8, n.5, p. 34-46. 1996

SMITH, K.; THIBOUTOT, D. Sebaceous gland lipids: friend or foe? **Journal of Lipid Research**, v. 49. 2008

SMITHARD, A.C.; GLAZEBROOK, C.; WILLIAMS, H. Acne prevalence, knowledge about acne and psychological morbidity in mid-adolescence: a community-based study. **British Journal of Dermatology**, v. 145, p. 274-279. 2001

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81. 2002

SPERANZA, P.; DE OLIVEIRA FALCÃO, A.; ALVES MACEDO, J.; DA SILVA, L. H., RODRIGUES, A. M.; ALVES MACEDO, G. Amazonian Buriti oil: chemical characterization and antioxidant potential. **Grasas y Aceites** v. 67, n. 2, p. 135, 2016.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica**, v. 1740 n.2, p. 101-107. 2005

TADROS, T. Application of rheology for assesment and prediction of long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108-109, p. 227-258. 2004

TADROS, T. **Emulsion Formation and Stability**. Wokingham: Wiley. 2013.

TIVERON, A. **Atividade antioxidante e composição fenolica de legumes e verduras consumidas no Brasil**. 2010. 103 f. Dissertação de mestrado. (Ciencias e Tecnologia de

alimentos)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de de São Paulo Piracicaba, 2010.

TOPAN, J. **Emulsões á base de óleo de girassol (*Helianthus annus L.*) com cristal líquido: avaliação das propiedades físico-químicas e atividade cosmética.** 2012. 115 p. Dissertação de mestrado. (Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão preto. 2012.

TROPICALS, T. **Melaleuca alternifolia.** Disponível em: http://toptropicals.com/catalog/uid/melaleuca_alternifolia.htm. 2003. Acesso em 20 de maio de 2016 .

TRUJILLO, J.; TORRES, M.; SANTANA, E. La palma de Moriche (*Mauritia flexuosa L.f.*) un ecosistema estratégico. **Revista orinoquia**, v.15, n.1, p. 62-70. 2011

VIJAYALAKSHMI, A.; TRIPURA, A.; RAVICHANDIRAN, V. Development and evaluation of anti-acne products from *Terminalia arjuna* bark. **International Journal of ChemTech Research**, v.3, p. 320-327. 2011

WHITE, M. Peróxido de Benzoilo y ácido azelaicco. In: A. KAMINSKY; M. FLÓREZ, **Acné: Un enfoque global.** Buenos Aires: Alfa Omega. p. 153-162. 2012.

WIACEK, A.; CHIBOWSKI, E. Zeta potential effective diameter and multimodal size distribution in oil/water emulsion,. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 159, p. 253-261. 1999

WILLIAMS, H.; DELLAVALLE, R.; GARNER, S. Acne vulgaris. **Lancet**, v. 379, p. 361-372. 2012

WITTERN, K. P.; BRUMMER, R.; GODERSKY, S. Rheology studies to investigate sensorial aspects of emulsions. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 132, p.1031-1036. 2001

YAO, M. L.; PATEL, J. C. Rheological characterization of body lotions. **Applied Rheology**, v. 11 n.2, p. 83-88. 2001

YU, L.; ZHOU, K.; PARRY, J. Antioxidant properties of cold-pressed black caraway, carrot, cranberry, and hemp seed oils. **Food chemistry**, v. 91 n.4, p. 723-729. 2005

ZANATTA, C.; MITJANSB, M.; URGATONDO, V.; ROCHA-FILHO, P.; VINARDEL, M. Photoprotective potential of emulsions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n.1, p.70–75. 2010

ZANDER, E.; WEISMAN, S. Treatment of acne vulgaris with salicylic acid pads. **Clinical Therapeutics**, v. 14, n.2, p. 247-253. 1992

APÊNDICE A

Porcentagem dos componentes das formulações do diagrama ternário

Formulação	Óleo (% m/m)	Água (% m/m)	Auto emulsionante (% m/m)
1	80	10	10
2	70	10	20
3	70	20	10
4	60	10	30
5	60	20	20
6	60	30	10
7	50	10	40
8	50	20	30
9	50	30	20
10	50	40	10
11	40	10	50
12	40	20	40
13	40	30	30
14	40	40	20
15	40	50	10
16	30	10	60
17	30	20	50
18	30	30	40
19	30	40	30
20	30	50	20
21	30	60	10
22	20	10	70
23	20	20	60
24	20	30	50
25	20	40	40
26	20	50	30
27	20	60	20
28	20	70	10
29	10	10	80
30	10	20	70
31	10	30	60
32	10	40	50
33	10	50	40
34	10	60	30
35	10	70	20
36	10	80	10

APÊNDICE B

Percentagem dos componentes das formulações com óleo de melaleuca e sulfato de zinco

Formula	Hostacerin® SAF (% m/m)	Óleo (%m/m)	Água purificada (% m/m)	Óleo de melaleuca (% m/m)	ZnSO ₄ (% m/m)
Buriti	5,0	10,0	84	1,0	0
Cenoura	5,0	10,0	84	1,0	0
Urucum	5,0	10,0	84	1,0	0
Mistura de óleos	5,0	10,0	84	1,0	0
Buriti	5,0	10,0	84	0	1,0
Cenoura	5,0	10,0	84	0	1,0
Urucum	5,0	10,0	84	0	1,0
Mistura de óleos	5,0	10,0	84	0	1,0
Buriti	5,0	10,0	83	1,0	1,0
Cenoura	5,0	10,0	83	1,0	1,0
Urucum	5,0	10,0	83	1,0	1,0
Mistura de óleos	5,0	10,0	83	1,0	1,0
Buriti	5,0	10,0	84,5	0	0,5
Cenoura	5,0	10,0	84,5	0	0,5
Urucum	5,0	10,0	84,5	0	0,5
Mistura de óleos	5,0	10,0	84,5	0	0,5
Buriti	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
Cenoura	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
Urucum	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5
Mistura de óleos	5,0	10,0	83,5	1,0	0,5

APÊNDICE C

Composição dos produtos comerciais (nomenclatura INCI) usados no teste de espalhabilidade.

A. Avon care

Aqua, glyceryl stearate SE; cetyl alcohol; dimethicone; parafinum liquidum; ethylhexyl methoxycinnamate; phenoxyethanol; sodium lauryl sulfate; disodium edta, methylparaben; parfum.

B. Ekos castanha – creme mãos

Aqua, glycerin, sorbitol, ceteryl alcohol, cetyl lactate, dicaprylyl ether, glyceryl stearate, PEG-100 stearate, bertholletia excelsa seed oil, dimethicone panthenol, phenoxyethanol, caprylic/capric tryglyceride, ammonium acryloyldimethyltaurate/vp copolymer, trilaureth-4 phosphate, polyglycerl-2 sesquisostearate, parfum, acrylates/C10-30alkylacrylate crosspolymer, disodium edta, methylisothiazolinone, xanthan gum, BHT, sodium hidroxide, CL 19140, CL 172000, CL 42090, alpha-isomethylionone, butylphenyl methylpropional, citral, coumarin, limonene, linalool.

C. Bozzano - creme para barbear.

Aqua, Stearic Acid, Glycerin, Potassium Hydroxide, Cocos nucifera oil, sodium silicate, fragrance, boric acid, extract of Aloe Barbadensis Leaf, Sodium Hydroxide, lanolin, gum cellulose, lanolin oil, behenyl alcohol / Stearate sucrose / isocetyl alcohol / Butylene Glycol / tripeptide-3 / sucrose tristearate / Stearic acid / Arginine, Linalool, d-limonene.

D. Bic for men - Espuma de barbear

aqua, stearic acid, triethanolamine cetareth 20, propylene glycol, butane, cocamidopropyl betaine, sodium laureth sulfate, parfum, isobutane, lanolin, propane, PEG-12 dimethicone dimethicone, paraffin, hydroxyethylcellulose, methylparaben, menthol, allantoin, propylparaben, alpha-isomethyl ionone, hexyl cinnamal, hydroxyisohexyl 3-ciclohexene carboxaldehyde, d-limonene e/y linalool.

E. Hipogloss

Retinol, Cholecalciferol, Zinco oxide, oil fígado de bacalhau and butylated hydroxyanisole, lanolin anidra, talc, purified water, vanillin, essência lavender, EDTA dissódico, mineral oil, petrolatum, polyethylene, butylene glycol, Glydant plus (DMDM hydantoin and iodine-propynylbutylcarbamate).

F. Hidramais

Aqua, glycerin, cetearyl alcohol, paraffinum liquidum, glyceryl stearate, cetareth-20, stearic acid, canola oil, dimethicone (and) ciclomethicone, parfum (Benzyl benzoate, butylphenyl methylpropional, citronellol, benzyl salicylate, hexylcinnamal, d-limonene, linalool) vaccinium myrtillus fruit extract, 2-phenoxyethanol (and) methylisothiazoline, sodium hidroxide, olus oil (and) camelina sativa seed oil, petrolatum, disodium EDTA, Argania spinosa kernel oil, BHT, triclosan.

G. Nívea - Gel de limpeza controle do brilho.

Aqua, glycerin, sodium laureth sulfate, polyethylene, sodium hidroxide, carbomer, cymbopogon citratus extract, oryza sativa, extract, aluminum chlrohydrate, tocopheryl acetate, sodium methyl cocoyl taurate, decyl glucoside, PEG-7 glyceryl cocoate, xanthan gum, lactose, benzophenone-4, cellulose, hydroxypropyl methylcellulose, propylene glycol, phenoxyethanol, methylparaben, propilparaben, parfum.

H. Anasol – Bronzeador

Aqua, ethylhexyl methoxycinnamate, cyclopentasiloxane, butylene glycol, diethylamino hydroxybenzoyl hexyl benzoate, ethylhexyl salicilate, C12-15 alkyl benzoate, dicaprylyl carbonate, bixa orellana seed oil, potassium cetyl phosphate, mauritia flexuosa fruit oil, glyceryl stearate, cetearyl alcohol, cetyl palmitate, tricontanyl PVP, dimethicone, daucus carota sativa seed oil, phenoxyetanol, triethanolamine, parfum, tocopheryl acetate, acrylates/ C10-C30 alkyl acrylate crosspolymer, disodium EDTA, xanthan gum, carbomer, aloe barbaris extract, helianthus annus seed oil, pentaerythrityl tetra-di-t-butyl hydroxihydrocinnamate, methylisothiazolinone, amyl cinamal, benzyl benzoate, citronellol, geraniol, hexyl cinnamal, hydroxycitronellal, linalool.

I. Cy zone solution.

Aqua, propylene glycol, dicaprylyl carbonate, cetearyl alcohol, , acrylates/C10-C30 alkyl acrylate crosspolymer, triethanolamine, phenoxyethanol, methylparaben, xanthan gum, propylparaben, methylpropanediol, 4-terpineol, butylparaben, ethylparaben, salicylic acid, isobutylparaben, salix alba bark extract salix Alba (willow) bark extract, arctium majus root extract, citrus limon peel, extract (citrus limon (lemon) peel extract), gentiana lutea root extract, juniperus communis fruit extract, thymus vulgaris (thyme) flower/leaf extract.