



**JOYCE SILVA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
FORMULAÇÕES TÓPICAS A BASE DE ÓLEO DE ROSA MOSQUETA (*ROSA  
AFF RUBIGINOSA*)**

**BRASÍLIA, 2024**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**JOYCE SILVA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
FORMULAÇÕES TÓPICAS A BASE DE ÓLEO DE ROSA MOSQUETA (*ROSA  
AFF RUBIGINOSA*)**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Lívia Cristina Lira de Sá Barreto

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Vânia Rodrigues Leite e Silva

**BRASÍLIA, 2024**

**JOYCE SILVA DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE E DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE  
FORMULAÇÕES TÓPICAS A BASE DE ÓLEO DE ROSA MOSQUETA (*ROSA  
AFF RUBIGINOSA*)**

Tese apresentada como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 26 de agosto de 2024

**BANCA EXAMINADORA**

Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto (Presidente)  
Universidade de Brasília

Dr. Idejan Padilha Gross  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva  
Universidade de Brasília

Dra. Talita Faraj Faria  
Rede Sarah de Hospitais de Reabilitação

Dedico este trabalho ao meu esposo, companheiro e amigo, que sempre me incentiva e ser melhor do que sou agora; e a meu pequeno Nathan, que chegou no meio disso tudo, revirou meu mundo, mas cuja pequena mãozinha é capaz de aquecer meu coração.

Dedico este trabalho à minha orientadora, cuja paciência, orientação, cuidado e amizade me ajudaram a continuar quando tudo parecia perdido.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por sua mão invisível abrindo o mar diante de mim durante essa caminhada.

À minha família, pelo apoio incondicional.

À minha orientadora, por acreditar e confiar no meu potencial.

À minha coorientadora, por não ter me dispensado quando cheguei em sua sala sem aviso ou contato prévio pedindo uma parceria de pesquisa.

Ao professor Dr. Luiz Elídio, que me ensinou tanto e esteve comigo em cada teste químico, os quais foram incontáveis.

Ao professor Dr. Rodrigo Mello Gomes por ter disponibilizado seu laboratório na Universidade Federal de Goiás para diversos experimentos e ainda por sua parceria nessa pesquisa.

Aos alunos Yasmim, Maria Vitória, Murilo, Marcos e Keilah por terem disponibilizado seu tempo em vários experimentos realizados nesse trabalho e por terem compartilhado conhecimento e experiência.

Às professoras Izabel Cristina, Juliana Lott, Daniela Orsi e Eliana Gris pela orientação e contribuição em várias partes desta pesquisa.

À FAPDF, pelo apoio financeiro através do projeto FAPDF 0019300000229/202121, aprovado no Edital Demanda Espontânea 4/2021.

## RESUMO

**Introdução:** A pele é um importante órgão do corpo humano, que, ao servir de interface entre o meio interno e externo como forma de proteção, está constantemente exposta a diversos fatores estressantes. Os produtos naturais se destacam por suas propriedades compatíveis com o manto dérmico e sua composição tanto terapêutica quanto protetora da pele. O óleo de Rosa Mosqueta (*Rosa aff rubiginosa*) tem sido tradicionalmente utilizado no combate ao envelhecimento cutâneo, como agente clareador da pele, redutor de cicatrizes e como agente cicatrizante. Embora seja facilmente encontrado em farmácias no Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos comprovando a eficácia desse óleo nos cuidados da pele e de feridas. **Objetivo:** avaliar a qualidade e a segurança de formulações tópicas (emulsões e microemulsões) desenvolvidas com óleo de rosa mosqueta para uso na prática clínica.

**Metodologia:** Foram elaboradas duas emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta pelo método de inversão de fases, apenas diferindo em relação à presença ou ausência do antioxidante sintético BHT (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol). As emulsões, juntamente com uma amostra do óleo puro foram acondicionadas em frascos airless e mantidas em câmara climática a 40°C e 35% de UR e submetidas a testes de estabilidade acelerada por 90 dias durante os quais foram avaliados parâmetros organolépticos, microbiológicos, físicos e químicos. Também foram desenvolvidos diagramas de fases pseudoternário para fins de elaboração de microemulsões de óleo de Rosa Mosqueta, empregando-se método de baixa energia, usando como tensoativo o Tween 80 e testando-se dois cotensoativos diferentes: glicerina e propilenoglicol. As melhores microemulsões foram armazenadas por sete dias em estufa a 40°C e 35% de UR e avaliadas quanto ao pH, condutivimetria, granulometria e estudo microbiológico. Tanto as emulsões como as microemulsões foram submetidas a testes de segurança (irritabilidade, viabilidade celular, perfil inflamatório), teste de permeação cutânea in vitro em modelo de célula de Franz e potencial cicatrizante ex vivo. As análises de permeação foram realizadas em HPLC, utilizando como analito de interesse o ácido linoleico.

**Resultados:** Foi possível desenvolver uma emulsão com 30% de óleo de Rosa mosqueta, cujas características organolépticas mantiveram-se estáveis por 90 dias armazenadas em câmara climática. O óleo incorporado nas emulsões preparadas com antioxidante sintético teve sua atividade antioxidante preservada ao longo do

tempo de armazenamento, enquanto o óleo puro apresentou degradação significativa desse parâmetro a partir do 15º dia de armazenamento. A emulsão preparada sem antioxidante sintético apresentou perda significativa da atividade antioxidante, comparável ao óleo puro. Quanto ao desenvolvimento da microemulsão, o uso de glicerina foi mais eficiente em comparação ao propilenoglicol, permitindo a incorporação de até 5% de óleo. O óleo puro e a emulsão não apresentaram sinais de irritação no teste HET-CAM (Hen's egg test chorionallantoic membrane), toxicidade celular ou ação inflamatória, assim como a microemulsão. No estudo de permeação nenhuma das formulações testadas apresentou absorção, indicando ação local. A emulsão contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta foi mais eficiente para promover a penetração do ácido linoleico até a derme quando comparado com o óleo puro e a microemulsão. Embora sem diferenças significativas, o estudo de cicatrização ex vivo mostrou maior densidade de colágeno no grupo tratado com a microemulsão de Rosa mosqueta, juntamente com aumento significativo na liberação de TGF $\beta$ .

**Conclusão:** A emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta e as microemulsões elaboradas com glicerina contendo 1,25% e 2,5% de óleo apresentaram boa estabilidade e qualidade microbiológica, e foram consideradas seguras para uso cutâneo. A emulsão foi mais eficiente para estimular a penetração de ácido linoleico nas camadas mais profundas da pele. Embora não tenha facilitado a penetração do ácido linoleico, a microemulsão de rosa mosqueta aumentou a liberação de TGF $\beta$  e densidade de colágeno em lesões confeccionadas em pele humana.

**Palavras-chave:** emulsões, óleos vegetais, Rosa mosqueta, plantas medicinais, tecnologia farmacêutica.

## **Abstract**

**Introduction:** The skin is an important organ of the human body that, serving as an interface between the internal and external environment for protection, is constantly exposed to various stress factors. Natural products stand out for their properties that are compatible with the dermal mantle and their composition, which is both therapeutic and protective for the skin. Rose Hip Oil (*Rosa aff rubiginosa*) has traditionally been used to combat skin aging, as a skin lightening agent, a scar reducer, and a healing agent. Although it is easily found in pharmacies in Brazil, few studies have been conducted to prove the efficacy of this oil in skin and wound care.

**Objective:** To evaluate the quality and safety of topical formulations (emulsions and microemulsions) developed with rose hip oil for use in clinical practice.

**Methods:** Two emulsions containing 30% rose hip oil were prepared using the phase inversion method, differing only in the presence or absence of the synthetic antioxidant BHT (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol). The emulsions, along with a sample of pure oil, were placed in airless containers and kept in a climate chamber at 40°C and 35% relative humidity, undergoing accelerated stability tests for 90 days, during which organoleptic, microbiological, physical, and chemical parameters were evaluated. Pseudoternary phase diagrams for the preparation of rose hip oil microemulsions were also developed, employing a low-energy method, using Tween 80 as a surfactant and testing two different cosurfactants: glycerin and propylene glycol. The best microemulsions were stored for seven days in an oven at 40°C and 35% relative humidity and were evaluated for pH, conductimetry, granulometry, and microbiological study. Both emulsions and microemulsions were subjected to safety tests (irritability, cell viability, inflammatory profile), in vitro skin permeation tests on Franz cell models, and ex vivo healing potential. Permeation analyses were performed in HPLC, using linoleic acid as the analyte of interest.

**Results:** It was possible to develop an emulsion with 30% rose hip oil, whose organoleptic characteristics remained stable for 90 days when stored in the climate chamber. The oil incorporated into the emulsions prepared with the synthetic antioxidant maintained its antioxidant activity over the storage time, while the pure oil showed significant degradation of this parameter from the 15th day of storage. The emulsion prepared without synthetic antioxidant lost significant antioxidant activity, comparable to pure oil. Regarding the development of the microemulsion, the use of glycerin was more efficient compared to propylene glycol, allowing the incorporation



of up to 5% oil. The pure oil and the emulsion showed no signs of irritation in the HET-CAM (Hen's egg test chorionallantoic membrane), cellular toxicity, or inflammatory action as so the microemulsion. In the permeation study, none of the tested formulations showed absorption, indicating a local action. The emulsion containing 30% rose hip oil was more effective in promoting the penetration of linoleic acid into the dermis compared to pure oil and the microemulsion. Although without significant differences, the ex vivo healing study showed a greater collagen density in the group treated with the rose hip microemulsion, along with a significant increase in TGF $\beta$  release.

**Conclusion:** The emulsion containing 30% rose hip oil and the microemulsions containing 1.25% to 2.5% showed good stability and microbiological quality and were considered safe for cutaneous use. The emulsion was more effective in stimulating the penetration of linoleic acid into the deeper layers of the skin. Although it did not facilitate the penetration of linoleic acid, the rose hip microemulsion increased TGF $\beta$  release and collagen density in lesions created on human skin.

**Key words:** Emulsions, vegetable oils, medicinal plants, pharmaceutical technology

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema apresentando as camadas da pele e estruturas anexas. Fonte: Pixabay.....	22
Figura 2 Representação esquemática da hipoderme por onde emergem a vascularização e inervação cutâneas. Fonte: <a href="https://educacao.umcomo.com.br/">https://educacao.umcomo.com.br/</a> .....	23
Figura 3 Esquema representando a unidade pilossebácea. Fonte: <a href="https://brasilescola.uol.com.br">https://brasilescola.uol.com.br</a> . ....	26
Figura 4 Esquema apresentando as cinco camadas da epiderme. Fonte: <a href="http://extratosdaterra.com.br">extratosdaterra.com.br</a> .....	26
Figura 5 Representação da camada córnea mostrando corneócitos sobrepostos cimentados pela matriz querato hialínica. Fonte: <a href="http://eucerin.com.br">eucerin.com.br</a> . ....	29
Figura 6 Desenho esquemático da <i>Rosa aff rubiginosa</i> , mostrando semente, flor e fruto. Fonte: <a href="http://plantasmontelindo/home/rosal-silvestre">plantasmontelindo/home/rosal-silvestre</a> .....	31
Figura 7 Fluxograma de classificação dos ácidos graxos essenciais. Fonte: Imagem da própria autora.....	34
Figura 8 Estrutura trans do retinol formando o ácido trans retinóico ou tretinoína. Seu isômero <i>cis</i> corresponde à isotretinoína. Fonte: Imagem da própria autora.....	35
Figura 9 Esquema de biotransformação do betacaroteno em vitamina A nas células intestinais. Fonte: Imagem da própria autora.....	39
Figura 10 Esquema da ação biológica cutânea dos principais constituintes químicos do óleo de Rosa Mosqueta. Fonte: Imagem da própria autora.....	40
Figura 11 Tipos de formas farmacêuticas semissólidas e suas características. Fonte: Imagem da própria autora. ....	43
Figura 12 Representação esquemática dos tipos de emulsões. Observe na emulsão óleo em água (O/A) as cadeias hidrofóbicas interagem entre si, formando pequenas gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Já na emulsão água em óleo (A/O), as cadeias hidrofóbicas se voltam para fora, isolando a fase aquosa em pequenas gotículas dispersas no meio oleoso. Fonte: Imagem da própria autora.....	44
Figura 13 Desenho esquemático da estrutura de microemulsões. Fonte: Imagem da própria autora. ....	46
Figura 14 Representação do efeito dos sistemas coloidais sobre a passagem da luz. Fonte: Imagem da própria autora.....	47
Figura 15 Representação de diagrama pseudoternário indicando as áreas de transição de fases de acordo com as proporções de cada componente. SF = separação de fases; EM = emulsão; MI = Microemulsão. Fonte: Imagem da própria autora.....	49
Figura 16 Esquema ilustrativo da metodologia da pesquisa. Fonte: Imagem da própria autora. ....	53
Figura 17 Armazenamento das emulsões em frascos airless. A – airless com BHT; B - airless sem BHT. Imagem da própria autora. ....	57
Figura 18 Armazenamento das emulsões em frascos airless. A – airless com BHT; B - airless sem BHT. Fonte: Imagem da própria autora.....	57

Figura 19 Ilustração mostrando placa molde de vidro em papel milimetrado, onde é introduzida amostra no orifício central. Após retirada da placa molde, adicionam-se as placas de vidro e se procede à medição dos diâmetros vertical e horizontal. Fonte: Imagem da própria autora.....	59
Figura 20 Ilustração de viscosímetro com adaptador de pouca amostra e spindles utilizados. Fonte: Imagem da própria autora.....	60
Figura 21 A - Picnômetro de latão sendo pesado; B - Preenchimento completo do picnômetro; C - Extrusão do excesso de produto pelo orifício central do picnômetro; D - Picnômetro após 5 min. pronto para pesagem. Fonte: Imagem da própria autora. ....	61
Figura 22 Curva-padrão da porcentagem de inibição do DPPH pelo Trolox. Fonte: Laboratório de Tecnologias Farmacêuticas, FCE - UnB.....	64
Figura 23 Elaboração das emulsões pelo método de inversão de fases. Fonte: Imagem da própria autora.....	70
Figura 24 Emulsões após centrifugação no dia 90 de armazenamento. Nota-se a ausência de separação de fases ou floculação. Fonte: Imagem da própria autora.....	71
Figura 25 Avaliação microscópica das emulsões por luz polarizada. A seta mostra as gotículas de óleo, hipocrômicas no meio aquoso dispersante corado em roxo. Fonte: Imagem da própria autora. ....	72
Figura 26 Porcentagem de perda de peso ao longo dos dias de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora.....	72
Figura 27 Avaliação da A - densidade e B - viscosidade das amostras ao longo dos dias de armazenamento. *Diferenças significativas $P < 0,05$ , Anova Two Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora. ....	73
Figura 28 Função da viscosidade pela força de cisalhamento das emulsões nos dias 1, 30, 60 e 90 de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora. ....	73
Figura 29 Média de espalhabilidade das amostras armazenadas em frascos airless ao longo do tempo de armazenamento por peso adicionado. A - média total; B - amostra airless com BHT; C - amostra airless sem BHT. Fonte: Imagem da própria autora.....	74
Figura 30 Variação de pH ao longo dos dias de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora. ....	75
Figura 31 Diferenças intra amostra da atividade antioxidante pelo método DPPH ao longo dos dias de armazenamento. *,#,&Diferenças estatísticas significantes, $P < 0,01$ ; Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora. ....	76
Figura 32 Diferenças na atividade antioxidante entre as amostras pelo método DPPH ao longo dos dias de armazenamento. *,#,&Diferenças estatísticas significantes, $P < 0,01$ ; Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora. ....	76
Figura 33 Comparação de perda percentual de atividade antioxidante das amostras ao longo do tempo de armazenamento comparado ao dia inicial. Fonte: Imagem da própria autora. ....	78

Figura 34 Avaliação do potencial de irritabilidade do óleo e da emulsão de Rosa Mosqueta pelo método HET-CAM. Setas indicam áreas de hiperemia, hemorragia e coagulação respectivamente Fonte: Imagem da própria autora.....	80
Figura 35 Níveis de produção da citocina TNF alfa e interleucinas IL6 e IL10 em sobrenadantes da linhagem celular HaCat tratadas ou não com as formulações testadas (**** = $P < 0,0001$ ; ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora. ....	83
Figura 36 Níveis de produção da citocina TNF alfa em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ( $P < 0,001$ , ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora. ....	83
Figura 37 Demonstração do efeito Tyndall (difusão da luz em sistemas coloidais). A - a luz não sofre difusão através do vidro puro; B - Quando se adiciona água ao vidro, a luz sofre refração, alterando levemente seu percurso; C - em um sistema opaco, a luz sofre absorção; D e E – em sistemas coloidais, a luz sofre refração, espalhando-se em vários feixes. Imagem da própria autora.....	88
Figura 38 Diagrama de fase pseudoternário das microemulsões obtidas a partir de dois coadjuvantes diferentes em diferentes proporções. Fonte: Imagem da própria autora.....	94
Figura 39 Aspecto das microemulsões elaboradas com diferentes proporções de óleo de Rosa Mosqueta, glicerina ou propilenoglicol, Tween 80 e fase aquosa de solução de clorexidina 0,1%. *G= Glicerina, P= Propilenoglicol. Fonte: Imagem da própria autora. ....	95
Figura 40 Níveis de produção da citocina TNF alfa em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ( $P > 0,05$ , ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora. ....	101
Figura 41 Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão (PDI) das gotículas de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. *Diferenças significantes ( $p < 0,05$ ), Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora. ....	103
Figura 42 Avaliação do potencial hidrogeniônico de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. *Indica diferença significativa. Anova Two-Way com pós-teste de Sidak para múltiplas comparações, $p > 0,05$ . Fonte: Imagem da própria autora. .	103
Figura 43 Avaliação da condutividade elétrica de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. *Indica diferença significativa. Anova Two-Way com pós-teste de Sidak para múltiplas comparações, $p > 0,05$ . Fonte: Imagem da própria autora. .	104
Figura 44 Preparo e posicionamento das peles para estudo de permeação in vitro. Fonte: Imagem da própria autora.....	109
Figura 45 Procedimento de extração dos produtos aplicados da pele e da camada córnea. A: retirada do produto depositado nas células de Franz por meio de Swab; B: swab na superfície da pele; C-E: aplicação dos tapes para retirada das 10 primeiras camadas córneas; C: submersão da pele em banho maria para separação da derme e epiderme. Fonte: Imagem da própria autora. ....	110
Figura 46 Curva de quantificação do ácido linoleico para o método de leitura em HPLC. Fonte: Imagem da própria autora.....	114
Figura 47 Relação entre a concentração teórica do analito pela concentração média observada no método. Fonte: Imagem da própria autora.....	115

Figura 48 Cromatograma do pico de ácido linoleico em HPLC de acordo com o padrão. Fonte: Imagem da própria autora.....	115
Figura 49 Porcentagem de retenção e penetração do ácido linoleico nas camadas da epiderme e na derme. *TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora.....	116
Figura 50 Concentração de ácido linoleico por centímetro quadrado de pele tratada com óleo puro e emulsão 30%. *TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora. ....	117
Figura 51 Massa total de ácido linoleico encontrada nas camadas das peles tratadas com emulsão branca e emulsão contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta. ERM30% = Emulsão de Rosa Mosqueta 30%; EB = Emulsão branca; TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora. ....	119
Figura 52 Massa de ácido linoleico encontrada nas camadas das peles tratadas com a microemulsão contendo 2,5% de óleo de Rosa mosqueta, emulsão branca e óleo puro. EB = Emulsão branca; TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora. ....	120
Figura 53 Distribuição dos fragmentos de pele humana nos poços. Cada poço representa um grupo experimental. Fonte: Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Universidade de Brasília.....	125
Figura 54 Taxa de área aberta ( $P > 0,1$ ) e taxa de retração das lesões ( $P = 0,2$ ) realizadas em retalho cutâneo ex vivo segundo tratamento. *EmRM= emulsão de Rosa mosqueta 30%; EmOM= Emulsão de óleo mineral a 30%; MiRM= microemulsão de Rosa Mosqueta 2,5%; MiOM= microemulsão de óleo mineral 2,5%.; Teste Anova com pós teste de Brown-Forsythe. Fonte: Imagem da própria autora.....	131
Figura 55 Diferenças na área de fibroplasia e na densidade de colágeno nos dias 3 e 7 de cicatrização por tratamento. * $P > 0,05$ , Anova Two-way com Comparações Multivariadas de Sidak e pós-teste de Tukey. Fonte: Imagem da própria autora.....	132
Figura 56 Comparação na densidade de colágeno entre os tratamentos nos dias de avaliação. A figura à esquerda mostra a evolução na densidade de colágeno por área nos dias de avaliação, enquanto a figura à direita mostra o impacto dos tratamentos na deposição de colágeno na área da ferida. Setas indicam área de colágeno. * $P < 0,01$ ; Anova Two-Way com pós-teste de Tukey. Fonte: Imagem da própria autora. ....	133

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Graduação das alterações observadas na membrana cório-alantoide observadas no ovo de galinha.....	65
Tabela 2 - Classificação final do produto quanto ao potencial de irritabilidade segundo o teste HET-CAM .....	66
Tabela 3 - Classificação do potencial de irritação dos produtos testados segundo teste HET-CAM, 2019 .....	80
Tabela 4 - Avaliação de viabilidade celular pelo método MTT da emulsão em triplicata. ....	82
Tabela 5 - Resultados de pH, diâmetro das gotículas, índice de polidispersão e condutividade das microemulsões formadas utilizando glicerina como coadjuvante. Universidade de Brasília, 2021 .....	96
Tabela 6 - Resultados de pH, diâmetro das gotículas, índice de polidispersão e condutividade das microemulsões formadas utilizando Propilenoglicol como coadjuvante. Universidade de Brasília, 2021 .....	98
Tabela 7 - Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat. Universidade de Brasília, 2022.....	101
Tabela 8 - Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) das microemulsões com óleo de Rosa Mosqueta e do óleo puro. Universidade de Brasília, 2022 .....	105
Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) das microemulsões de óleo de Rosa Mosqueta para C. acnes. Universidade de Brasília, 2022 .....	105
Tabela 10 - Resultados de densidade óptica e área de fibroplasia por dia de cicatrização de acordo com os tratamentos aplicados. Universidade Federal de Goiás, 2023.....	132
Tabela 11 - Relação da expressão gênica de TGF $\beta$ de acordo com os tratamentos aplicados. Universidade de Brasília, 2023.....	134

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos tipos de formas farmacêuticas, suas vantagens, desvantagens e vias de administração. ....	42
Quadro 2 - Relação das características dos surfactantes segundo o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL).....	45
Quadro 3 - Diferenças entre sistemas emulsionados.....	48
Quadro 4 - Componentes das emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta segundo fórmula química, INCI, função e quantidades. ....	56
Quadro 5 - Descrição das microemulsões selecionadas para os testes de viabilidade celular e perfil inflamatório. Laboratório de Tecnologias, Universidade de Brasília, 2021 .....	100
Quadro 6 - Descrição das microemulsões selecionadas para teste de estabilidade. Universidade de Brasília, 2023.....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu$ L – microlitro  
 $\mu$ S/cm – microsiemens por centímetro  
ABTS – 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)  
Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATP – Adenosina trifosfato  
BHT - 2,6-Di-tert-butyl-p-cresol  
CAM – Membrana corioalantóide  
CG – Cromatografia Gasosa  
COX – Ciclooxygenase  
CRABP-II – Proteína celular de ligação do ácido retinóico II  
DMEM - Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium  
DMSO - Dimethyl Sulfoxide  
DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
EDTA - Ethylenediaminetetraacetic Acid Tetrasodium Salt  
EHL – Equilíbrio hidrofílico-lipofílico  
EHL – Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo  
ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  
ERO's – Espécies reativas de oxigênio  
Fig. - Figura  
g – gramas  
HET-CAM - hen's egg test chorionallantoic membrane  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance  
IC – Concentração inibitória média  
IL – Interleucina  
iNOS – Sintase de óxido nítrico induzido  
LB – Lanúria bertani  
LPS – endotoxina bacteriana ou lipopolissacarídeo bacteriano  
m – Metro  
M – Mol  
MDA – malonaldeído  
MEC – Matriz Extracelular  
Min. – Minutos  
mL - miligramas  
mL - mililitro  
mM – Milimol  
MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide  
NK – natural killers  
nm – nanômetros  
p/v – parte por volume  
Pa.s – pascal segundo  
PBS – solução tampão de fosfato salina  
PCA – Plate count agar  
PCR – Proteína C reativa  
PDI – índice de polidispersão



pg/mL – picograma por mililitro  
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada  
rpm – rotações por minuto  
SFB – Soro fetal bovino  
TBA – ácido tiobarbitúrico  
TBARS - espécies reativas do ácido Tiobarbitúrico  
TEAC - Trolox equivalent antioxidant activity  
TGF- Fator de transformação de crescimento  
TNF – Fator de necrose tumoral  
TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa  
TPS – Tape striping  
UR – Umidade relativa  
USA – Estados Unidos da América  
v/v – volume por volume

## Sumário

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>21</b>
<b>PROBLEMÁTICA DE PESQUISA E REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>21</b>
<b>1. A PELE, UM MANTO DE PROTEÇÃO</b> .....	<b>22</b>
1.1.2 As funções da pele.....	28
<b>1.2. ROSA MOSQUETA: UM PROMISSOR AGENTE RESTAURADOR</b> .....	<b>31</b>
1.2.1 Distribuição geográfica e botânica.....	31
1.2.2 O óleo de Rosa Mosqueta: constituintes e propriedades clínicas.....	32
1.2.3 Atividade Biológica dos constituintes do óleo de Rosa Mosqueta .....	33
1.2.4 Qualidade do óleo vegetal: da extração ao processamento.....	40
<b>1.3 FORMAS FARMACÊUTICAS</b> .....	<b>41</b>
1.3.1 Formas farmacêuticas semissólidas .....	43
1.3.2 Cremes, emulsões semissólidas .....	44
1.3.3 Microemulsões.....	45
<b>1.4 QUALIDADE E SEGURANÇA DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS</b> .....	<b>50</b>
<b>1.5 OBJETIVOS DA PESQUISA</b> .....	<b>51</b>
<b>1.6 MÉTODO DA PESQUISA</b> .....	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>55</b>
<b>2. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DAS EMULSÕES CONTENDO 30% DE ÓLEO DE ROSA MOSQUETA</b> .....	<b>56</b>
<b>2.1 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>56</b>
2.1.1 Insumos e elaboração das emulsões .....	56
2.1.2 Estudo de estabilidade acelerada das emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta.....	57
2.1.3 Avaliação de segurança .....	64
2.1.4 Análise estatística.....	69
<b>2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
2.2.1 Avaliação de estabilidade e qualidade das emulsões.....	70
2.2.2 Avaliação de segurança .....	79
<b>2.3 CONCLUSÃO</b> .....	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>86</b>
<b>3 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOPARTICULADO COM ÓLEO DE ROSA MOSQUETA</b> .....	<b>87</b>
<b>3.1 MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	<b>87</b>
3.1.1 Desenvolvimento das Microemulsões.....	87
3.1.2 Caracterização físico-química das microemulsões e avaliação de estabilidade .....	88
3.1.3 Avaliação de segurança e perfil inflamatório .....	89
3.1.4 Estudo microbiológico.....	91
3.1.5 Análise estatística.....	93

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	94
3.2.1 Elaboração das microemulsões e diagrama de fases .....	94
3.2.2 Avaliação de viabilidade celular e perfil inflamatório .....	100
3.2.3 Avaliação de Estabilidade de 7 dias .....	102
3.2.4 Avaliação microbiológica e potencial antimicrobiano .....	104
3.3 CONCLUSÃO .....	106
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>107</b>
<b>4. ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA PURO E INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS .....</b>	<b>108</b>
4.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	108
4.1.1 Materiais .....	108
4.1.2 Escolha do analito .....	108
4.1.3 Preparo da pele .....	108
4.1.4 Estudo de permeação .....	109
4.1.5 Estudo de retenção cutânea .....	110
4.1.6 Análise das amostras em HPLC .....	111
4.1.6 Análise Estatística .....	113
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	114
4.2.1 Validação do método em HPLC .....	114
4.2.1 Estudo de permeação e retenção cutânea .....	116
4.3 CONCLUSÃO .....	122
<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>123</b>
<b>5. ESTUDO EX VIVO DO POTENCIAL CICATRICIAL DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS .....</b>	<b>124</b>
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS .....	124
5.1.1 Materiais .....	124
5.1.2 Preparo da pele .....	124
5.1.3 Grupos experimentais .....	124
5.1.4 Preparo do experimento .....	125
5.1.5 Preparo das lâminas .....	126
5.1.5 Estudos de expressão gênica .....	126
5.1.6 Análise Estatística .....	130
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	130
5.3 CONCLUSÃO .....	137
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>138</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>139</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>142</b>
<b>APÊNDICE A - ESQUEMA DE ELABORAÇÃO DAS MICROEMULSÕES .....</b>	<b>162</b>
<b>ANEXO 1 - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA UTILIZADO NO ESTUDO .....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA .....</b>	<b>166</b>

## INTRODUÇÃO

---

A pele humana é um importante órgão do corpo humano, responsável por conferir proteção, homeostase e reconhecimento do mundo externo. Possui alta capacidade de regeneração e é reconhecida como primeira barreira imunológica contra microrganismos e agentes químicos e físicos.

Sua função de barreira depende de um pleno equilíbrio entre proliferação celular e produção de uma camada lipídica rica em ácidos graxos e queratina, o que confere uma permeabilidade seletiva à pele, sendo impermeável à maioria dos compostos polares. Por servir de interface entre o meio interno e o externo, está sempre exposta a diversos fatores estressantes, sejam físicos ou químicos. Poluição, luz ultravioleta, frio, calor, contato com produtos químicos são constantes estressores a que o tecido cutâneo necessita se adaptar e desenvolver meios de proteção. O próprio envelhecimento, que leva à perda progressiva de colágeno cutâneo provoca uma série de transformações que resultam em enfraquecimento dessa camada de proteção.

Por essa razão, diversos produtos têm sido desenvolvidos com o objetivo de oferecer auxílio ao tecido cutâneo em seus processos metabólicos, seja para restauração do manto lipídico, seja para síntese de colágeno ou proteção contra os fatores físicos como o fotoenvelhecimento. Dentre esses, os produtos naturais têm se destacado por suas propriedades compatíveis com o manto dérmico e sua composição tanto terapêutica quanto protetora. O uso de óleos naturais confere à pele uma camada de proteção que reduz a perda de água e a desidratação da derme. Por outro lado, sua constituição rica em ácidos graxos e outros componentes mostram atividade na proliferação celular e no estímulo da síntese de metabólitos importantes para a manutenção de sua estrutura física(1).

A Rosa Mosqueta é uma planta comum nas regiões montanhosas do Chile e da Argentina e seu óleo tem sido tradicionalmente utilizado no combate ao envelhecimento cutâneo, clareador da pele, redutor de cicatrizes e como agente cicatrizante. Embora seja facilmente encontrado em farmácias no Brasil, poucos estudos foram desenvolvidos comprovando a eficácia desse óleo nos cuidados da pele e de feridas. Em 2016, publicamos um trabalho com evidências pré-clínicas de que o óleo de Rosa Mosqueta atua no processo cicatricial, estimulando o influxo de

neutrófilos para o tecido e estimulando a proliferação celular para a granulação da ferida(2). Ensaios pré-clínicos com a Rosa Mosqueta, tanto no uso tópico quanto oral, tem demonstrado sua segurança e indicam eficácia enquanto agente anti-inflamatório e cicatrizante. Ainda assim, pouco se sabe sobre sua capacidade de permeação na pele e os mecanismos histoquímicos envolvidos em sua atividade biológica.

Por esse motivo, este trabalho se propõe a investigar a segurança e eficácia do uso do óleo de Rosa Mosqueta no tecido cutâneo, avaliando seu potencial irritativo e tóxico para as células da derme, sua capacidade de penetração cutânea e sua atividade histoquímica no processo cicatricial. Adicionalmente, propõe o desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir do óleo de Rosa Mosqueta, desde que óleos fixos são facilmente degradados e têm sua atividade biológica reduzida ao longo do tempo. Teoriza-se, também, que a aplicação do óleo por meio de uma forma farmacêutica semissólida ou por meio de uma microemulsão seria eficiente para melhorar a penetração cutânea dos componentes do óleo e manter sua qualidade por mais tempo.

De forma a deixar a leitura mais didática, o leitor encontrará este trabalho dividido em 6 capítulos: 1º - revisão da literatura sobre os componentes da pele e sobre as características da Rosa Mosqueta; 2º - Desenvolvimento e estabilidade de uma emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta e estudos de segurança *in vitro*; 3º - Desenvolvimento e estabilidade de microemulsões de Rosa Mosqueta e estudos de segurança *in vitro*; 4º - Estudo de permeação *in vitro* do óleo, da emulsão e da microemulsão de Rosa Mosqueta; 5º - Estudo de cicatrização *ex vivo* comparando a atividade do óleo, da emulsão e da microemulsão de Rosa Mosqueta.

Ao final, espera-se que as peças deste trabalho sejam perfeitamente encaixadas na construção de um conhecimento que não será o todo, mas uma chave a mais da ciência para o conhecimento desse óleo na aplicação cutânea.

# **CAPÍTULO 1**

## **PROBLEMÁTICA DE PESQUISA E REVISÃO DA LITERATURA**

---

## 1. A PELE, UM MANTO DE PROTEÇÃO

A pele é o maior órgão do ser humano, representando de 8% a 16% do peso total. Responsável por manter a integridade da forma corporal, mantém uma interface de continuidade com as mucosas gastrointestinal e genitourinário. Esse é um órgão imprescindível à sobrevivência humana, uma vez que sua superfície queratinizada controla tanto a entrada de microrganismos e substâncias do meio externo para o interno, quanto a perda de fluídos do meio interno para o externo, assegurando a homeostase do organismo(3).

### 1.1.1 Pele: componentes e estruturas acessórias

Para exercer suas funções, um complexo sistema de camadas e estruturas anexas (Cf. Figura 1) garantem uma diversidade estrutural e funcional da pele, desde que esse órgão está frequentemente exposto a diversos estressores ambientais, como luz solar e radiação térmica, flutuações de umidade, energia mecânica e agressões biológicas e químicas(4).

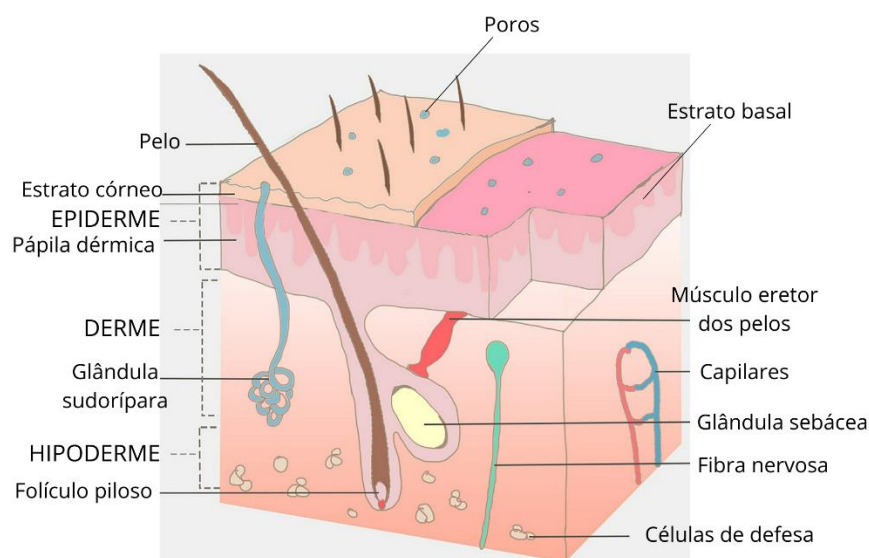


Figura 1 Esquema apresentando as camadas da pele e estruturas anexas. Fonte: Pixabay

É composta principalmente por fibras de colágeno, fibras elástica<sup>a</sup> e reticulina, permeadas por substância fundamental amorfa a fim de formar a matriz extracelular (MEC)(5,6). A substância fundamental, rica em glicosaminoglicanas e moléculas estruturais de proteoglicanas confere hidratação à pele pela alta capacidade do ácido hialurônico de se ligar à água (7). Dessa forma, a MEC fornece um esqueleto para a migração celular, mantém a forma adaptável da pele e seu grau de resiliência, devido à presença das fibras elásticas e colágeno, o que previne a descontinuidade do tecido cutâneo às trações(7).

Estruturalmente, a pele está dividida em duas camadas: a derme, a camada onde estão ancoradas as estruturas anexas da pele; e epiderme, a camada mais externa, que confere proteção contra as intempéries do meio.

Apesar de não ser considerado um componente estrutural da pele, o tecido subcutâneo, ou hipoderme está intrinsecamente relacionado a sua função e anatomia(4), visto que une a derme aos tecidos adjacentes ao mesmo tempo que garante flexibilidade (Cf. Figura 2). É composto por matriz extracelular e tecido adiposo cujo peso varia em quantidade a depender da região do corpo e do metabolismo do indivíduo, funcionando como isolante térmico e um “amortecedor” para forças traumáticas na proteção dos órgãos internos(3).

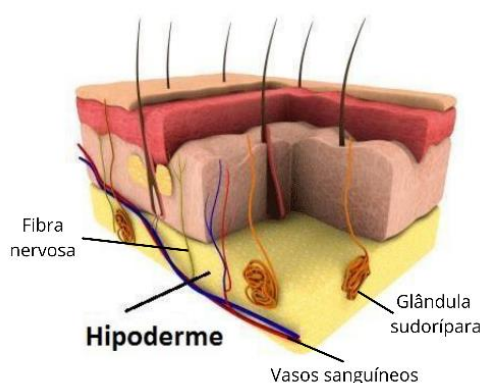


Figura 2 Representação esquemática da hipoderme por onde emergem a vascularização e inervação cutâneas. Fonte: <https://educacao.umcomo.com.br/>

---

<sup>a</sup> Fibras elásticas possuem um componente fibrilar denominado *fibrilina* e um componente amorfo denominado *elastina*, cuja combinação resulta em fibras onduladas e flexíveis que proporcionam elasticidade à pele(5).



A seguir, são apresentadas, com mais detalhes, as camadas que constituem o tecido cutâneo:

1. **Derme:** Sobre a hipoderme, encontra-se a derme, uma camada de tecido conjuntivo de origem embrionária mesodérmica, com espessura que varia dependendo da região anatômica, chegando a um máximo de 3mm na planta dos pés(3). É rica em MEC, sendo habitada por uma variedade de células imunológicas inatas, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células T e células linfocíticas(6). Além dessas, conta com uma população de fibroblastos, responsáveis pela produção e depósito de componentes da MEC, fibrócitos, miofibroblastos e adipócitos(4,8).

A derme tem a função de acomodar e reforçar a epiderme, além de ancorar os sistemas vascular, neural, linfático e as estruturas anexas, promovendo uma base capaz de absorver forças mecânicas e prevenir cisalhamento(7). É dividida em duas subcamadas: **Reticular**, que se assenta diretamente no tecido subcutâneo e é relativamente acelular e avascular quando comparada às outras camadas. É composta por fibras mais densas, especialmente de colágeno tipo 1, que confere resistência à tensão(5). Já a camada **Papilar** é mais delgada e moldada contra as cristas e sulcos da epiderme. Consiste em fibras de colágeno menores e distribuídas de modo mais frouxo do que a derme reticular e é constituída principalmente por colágeno dos tipos III e IV, sendo que a abundante presença de plexos de vasos sanguíneos e linfáticos permite a regulação da perda de calor (5). As fibras de reticulina, formadas por colágeno tipo III, formam uma rede que permite o intercâmbio de calor e materiais entre a derme e a epiderme, além de ajudar a ligar as duas camadas por meio das cristas interpilares da pele(5).

É na derme, ainda, que emergem os receptores do sistema nervoso simpático responsáveis pela motricidade vascular, controle glandular e pelas unidades pilossebáceas (piloereção). Já os receptores do sistema nervoso espinhal somático controlam os receptores sensoriais, permitindo ao organismo tornar-se consciente do mundo externo e de suas mudanças através da pele(3). Na derme encontram-se ancorados as estruturas anexas da pele:

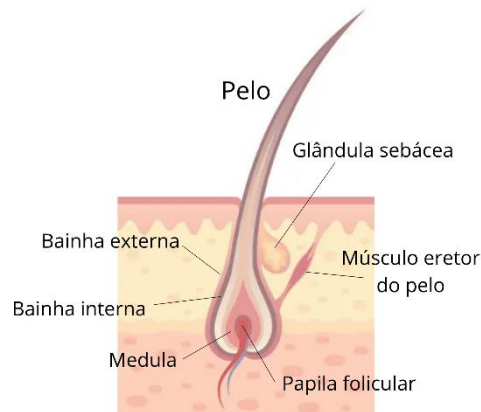
✓ *Glândulas sebáceas*: são glândulas acinosas e halócrinas<sup>b</sup>, caracterizadas por ductos revestidos de epitélio estratificado que geralmente desembocam nos folículos pilosos, conhecido como unidade pilosebácea(3). Permanecem quiescentes durante a infância e, durante a puberdade, sob a influência dos hormônios sexuais, assumem a função de secretar uma mistura complexa de lipídios contendo triglicerídios, ácidos graxos livres e colesterol (3,5).

✓ *Glândulas sudoríparas*: situam-se tanto na derme superficial quanto profunda e se distribuem amplamente em toda a sua extensão(3). São tubulosas e enoveladas, dividindo-se em dois tipos: **écrinas**, cujos ductos se abrem diretamente na pele com a finalidade de termorregulação. São estimuladas por inervação colinérgica do sistema autônomo e funcionam em resposta a estímulos térmicos e emocionais. O suor, inicialmente, é hipotônico, mas aumenta em tonicidade à medida que a sudorese se torna mais intensa, devido à excreção de íons de sódio, metabólitos e algumas proteínas como produto final de um ultrafiltrado sanguíneo(3,5,9). As glândulas **apócrinas** estão associadas aos folículos pilosos, localizadas na derme mais profunda das axilas, escroto, prepúcio, pequenos lábios, mamilos e região perianal, apresentando um componente social e emocional(3,5). Estimuladas pela inervação adrenérgica do sistema nervoso autônomo e por hormônios sexuais, sua excreção é composta por lipídios e produtos de decomposição bacteriana principalmente em situações de tensão(3,9).

✓ *Folículos Pilosos*: os pelos são constituídos por filamentos intermediários de queratina arranjados em microfibrilas embutidas em uma matriz. Crescem a partir de invaginações tubulares dinâmicas da epiderme revestidas por células epiteliais (Cf. Figura 3). Durante o ciclo de crescimento, os folículos pilosos estendem-se mais profundamente na derme(5).

---

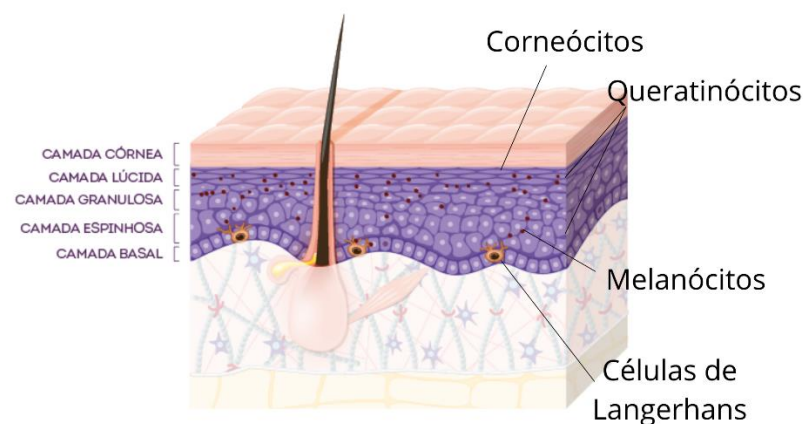
<sup>b</sup> Glândulas halócrinas são caracterizadas por excretarem como produto, o conteúdo de suas células, resultando em morte celular. As células perdem o núcleo e sofrem degradação, resultando na deposição de óleo na pele(5).



**Figura 3** Esquema representando a unidade pilossebácea. Fonte: <https://brasilescola.uol.com.br>.

Os folículos pilosos servem como local de hemostasia para o sistema imunológico, criando estruturas de memória para resposta de células T e afastando células do sistema imunológico inato capazes de desencadear processos inflamatórios. Isso garante a proteção local e a manutenção do folículo capilar(6).

2. **Epiderme:** a epiderme, assim como as estruturas anexas da pele (unhas, pelos, glândulas), possui sua origem a partir da ectoderme do epitélio embrionário(4). Embora seja a camada mais externa da pele, engana-se quem pensa exerça uma função meramente passiva. Sua composição celular estratificada migra de um epitélio cubóide para um epitélio pavimentoso à medida que se superficializa (Cf. Figura 4) ao longo de suas cinco regiões:



**Figura 4** Esquema apresentando as cinco camadas da epiderme. Fonte: [extratosdaterra.com.br](http://extratosdaterra.com.br)

- ✓ *Estrato basal ou germinativo:* consiste em um epitélio cubóide/colunar baixo diretamente ancorado sobre a derme, onde se forma a lâmina basal. A lâmina basal consiste em uma lâmina lúcida clara de 20nm de espessura, por onde passam filamentos de ancoragem com origem na própria camada basal; e uma lâmina densa, composta por filamentos de glicoproteínas e colágeno tipo IV. Os filamentos da lâmina lúcida passam por dentro da lâmina densa a fim de ancorar a epiderme à derme. As bolhas na pele ocorrem por quebra desses filamentos de aderência(5). É nessa camada onde os queratinócitos se proliferam, migrando para as camadas superiores à medida que amadurecem. Aqui, os marcadores de replicação celular são abundantes, assim como organelas de células ativas, como mitocôndrias, complexo de Golgi, retículos endoplasmático e ribossomos(8).
  
- ✓ *Estrato espinhoso:* aqui, os queratinócitos começam a obter um formato ligeiramente achatado com um núcleo central e feixes de filamentos de queratina chamados tonofilamentos como prolongações citoplasmáticas, conferindo um aspecto espinhoso(3). Os tonofilamentos são ancorados por integrinas que formam pontes intercelulares responsáveis por promover a adesão entre os queratinócitos, originando uma estrutura chamada desmossomo(10). O processo de mitose já está reduzido e começam a aparecer grânulos celulares(5).
  
- ✓ *Estrato granuloso:* nessa região, os queratinócitos adquirem um aspecto mais achatado e começam a expulsar grânulos de lipídios para o espaço intercelular, que se depositam entre as células e atuam como barreira impermeável que protege contra a perda de água e garante a absorção seletiva(8). À medida que suas células são “empurradas” para a superfície, passam a apresentar um acúmulo de queratohialina sobre a rede de filamentos no interior da célula(10).
  
- ✓ *Estrato lúcido:* nesse estrato, os queratinócitos adquirem uma forma achatada, organizados em fileira simples, perdem seu núcleo e suas organelas citoplasmáticas por ação de enzimas lipossomais. As células permanecem unidas pelos desmossomos e seu citoplasma mostra numerosos filamentos de queratina(8).
  
- ✓ *Estrato córneo:* quando chegam ao estrato córneo, os queratinócitos já são considerados células mortas e passam a ser denominados **corneócitos**. São

organizados de forma sobreposta, com citoplasma cheio de queratina. Nas camadas mais superficiais, essa queratina se aglutina aos tonofilamentos formados ainda no estrato espinhoso(5,8). Isso forma uma matriz de querato-hialina que, juntamente aos grânulos lipídicos, confere à pele a capacidade de reter 98% de seu conteúdo aquoso, uma função fundamental para a manutenção da vida(10).

Nem todas as áreas da pele apresentam todos os estratos epidérmicos, já que áreas mais finas prescindem dos estratos granuloso e lúcido(3).

O **queratinócito** é a principal célula presente na epiderme, correspondendo a 95% de todos os tipos celulares e tem a função de formar uma barreira física impermeável tanto por sua disposição sobreposta quanto por sua função de produzir e revestir o epitélio com queratina(11).

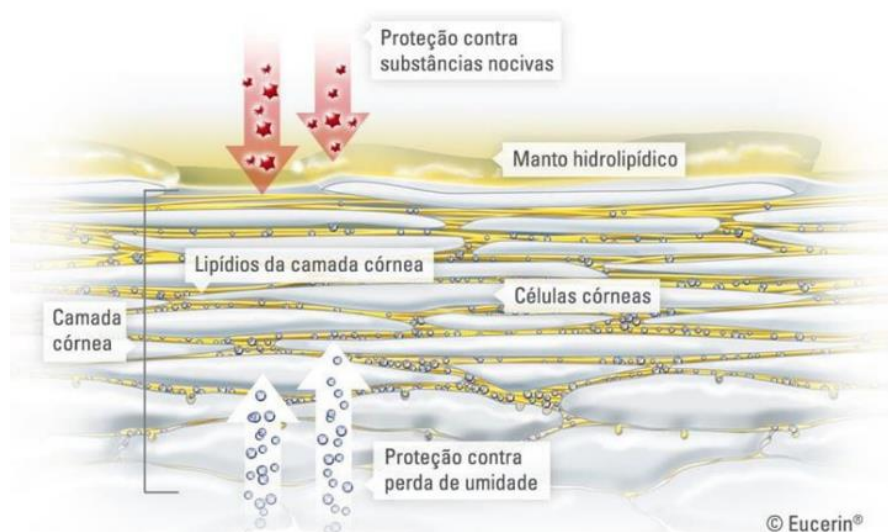
Além dos queratinócitos, outros tipos celulares estão presentes na epiderme. Os **melanócitos** são responsáveis por produzirem melanina e o distribuírem às células circunvizinhas, conferindo a cor natural da pele e proteção contra a radiação UV(8,10). As **células de Langerhans** são células gigantes, estreladas, e originam-se como monócitos no sangue. Migram para a epiderme a fim de promover a defesa imunológica local, encontrando e apresentando antígenos às células de defesa especializadas(6,10).

Além desses grupos celulares, a epiderme conta com a presença de **receptores Merkel**, localizados na junção da epiderme com a derme ligado a um neurônio sensorial(5). Os receptores Merkel têm a capacidade de se adaptar lentamente a estímulos em um pequeno campo de sensação, o que permite a localização fina do tato e pressão constante sobre a pele(5,10). Além deles, terminações nociceptivas não encapsuladas conferem à pele alta sensibilidade fina(3).

### 1.1.2 As funções da pele

Tradicionalmente, a fisiologia da pele pode ser dividida em três principais categorias: função de barreira, imunidade e termorregulação. Mais recentemente, tem-se destacado a função metabólica e endócrina do tecido cutâneo, especialmente da epiderme(4,5).

- ✓ *Função de barreira:* essa é talvez a função mais importante do tecido cutâneo, fornecendo uma interface que separa o meio interno do meio externo. A compreensão de seu funcionamento é essencial para o desenvolvimento de formulações farmacêuticas tópicas. A disposição firmemente sobreposta dos queratinócitos e corneócitos, cujos espaços são preenchidos pela matriz de querato-hialina (Cf. Figura 5), rica em ceramidas, colesterol e ácidos graxos fornecem uma barreira quase impermeável contra microrganismos (12,13).



**Figura 5** Representação da camada córnea mostrando corneócitos sobrepostos cimentados pela matriz querato hialínica. Fonte: eucerin.com.br.

A permeabilidade seletiva do manto hidrolipídico protege contra desidratação e perda de eletrólitos, pois, devido à sua característica lipofílica, é relativamente impermeável a moléculas polares como água, sódio, potássio e outros íons. Por outro lado, mostra-se relativamente permeável a álcoois anfifílicos, sendo que essa permeabilidade irá depender da área do corpo. Face e dorso das mãos são mais permeáveis, enquanto a palma das mãos e pés permitem bem menos passagem de substâncias(12). Em adição, a produção de melanina protege as células cutâneas contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta(7).

- ✓ *Imunidade:* A barreira lipídica produzida pelos queratinócitos possui mais do que apenas lipídios, mas também enzimas proteolíticas, proteínas estruturais e peptídeos antimicrobianos que influenciam diretamente a função de barreira da pele. Os corpos lamelares presentes nos queratinócitos são responsáveis por liberar, na matriz extracelular, enzimas e citocinas como catelicidina, IL-37,  $\beta$ -defensina 2 humana, entre outros, que atuam como primeira barreira imunológica e mantêm a homeostasia com o microbioma da pele(14). Em adição, a presença de células do sistema imune, como as células de Langerhans, mastócitos, células T, entre outras, confere um eficiente sistema de defesa ao tecido cutâneo, promovendo a rápida limpeza tecidual diante de lesões de continuidade e de estressores químicos ou biológicos(6).
  
- ✓ *Termorregulação:* a pele recebe um fluxo sanguíneo maior que o necessário para suas funções metabólicas pois funciona como um radiador a partir do qual o sangue aquecido (após passar por tecidos metabolicamente mais ativos), ao entrar em contato com o meio mais externo, libera calor por convecção(5,12). A vasta rede de capilares presente na derme sofre dilatação ou constrição de acordo com estímulos neuroendócrinos provocados pela condição do meio externo, estando intrinsecamente relacionado ao sistema nociceptivo presente no tecido cutâneo(12). Em adição, as glândulas sudoríparas sofrem ação dessa mesma rede sensitiva, promovendo liberação de água, calor e eletrólitos para o meio(9).
  
- ✓ *Função metabólica e endócrina:* na última década, tem-se tornado mais evidente que a pele, especialmente a epiderme, possui uma forte capacidade metabólica e endócrina(4). Ela é responsável pela síntese de vitamina D e hormônios androgênicos a partir de precursores gonadais ou adrenais(7,15,16). A pele humana atua na ativação, inativação e produção de inúmeros hormônios, fundamentais para o funcionamento cutâneo, mas também para o organismo como um todo. Alguns exemplos são os hormônios paratireóideo, melatonina, serotonina, esteroides, dentre outros(17,18). Sendo assim, alterações hormonais podem alterar, diretamente, a saúde da pele e sua função de barreira.

## 1.2. ROSA MOSQUETA: UM PROMISSOR AGENTE RESTAURADOR

### 1.2.1 Distribuição geográfica e botânica

A Rosa Mosqueta (*Rosa aff rubiginosa* ou *Rosa eglantheria*) é uma espécie de rosa selvagem originária da Europa Central e Oriental, que cresce espontaneamente na região Sul do Chile e nos andes argentinos, introduzida durante a colonização espanhola(19). É amplamente empregada na indústria alimentícia e cosmética por suas características organolépticas e sua composição(20,21) além de compor a lista de fitoterápicos oficiais da European Pharmacopeia(22).

É importante frisar a presença de três tipos de rosas selvagens no Chile: *Rosa eglantheria* ou *Rosa rubiginosa*, *Rosa moschata* e *Rosa canina*. A *Rosa rubiginosa*, popularmente conhecida como Rosa Mosqueta, de que trata este trabalho, caracteriza-se por ser arbustiva, chegando a uma altura máxima de 1,2 metro (m), de flores rosadas solitárias ou agrupadas em 2 ou 3 unidades, cujo fruto varia do vermelho ao alaranjado (Cf. Figura 6)(23).



Figura 6 Desenho de exsicata de *Rosa aff rubiginosa*, mostrando semente, flor e fruto.  
Fonte: plantasmontelindo/home/rosal-silvestre

Freqüentemente, *Rosa rubiginosa* e *Rosa canina* são apresentadas como uma mesma espécie, porém algumas diferenças devem ser destacadas: enquanto o óleo da *Rosa canina*, mais comum ao longo dos países do leste europeu, possui cerca de 71% de ácidos graxos, com maior quantidade de ácido oleico e linoleico, a *Rosa rubiginosa*, conhecida como Rosa Mosqueta, apresenta uma proporção de



78% de ácidos graxos insaturados em seu óleo, apresentando menor quantidade de ácido oleico, o que lhe confere menor caráter comedogênico(24). Entretanto, a principal diferença entre ambas as espécies, está no fato de que esta última possui quantidades substanciais de ácido *trans*-retinóico, tornando-a mais interessante para aplicações cutâneas(19,24).

### 1.2.2 O óleo de Rosa Mosqueta: constituintes e propriedades clínicas

O óleo de Rosa Mosqueta é um óleo fixo<sup>c</sup> extraído de suas sementes que varia do alaranjado ao amarelo ouro, contendo compostos fenólicos, cuja atividade antioxidante exerce algum papel terapêutico. Contudo, é devido à presença (entre 0,01 e 0,1%) de ácido-*trans*-retinóico, conhecido como tretinoína, que o óleo de Rosa Mosqueta tem sido indicado para controle dos sintomas da psoríase e dermatites, para acelerar o processo cicatricial e para melhora do aspecto da pele(25).

Ainda, o óleo de Rosa Mosqueta possui concentrações de carotenoides, especialmente licopeno(26), vitamina C(27,28), polifenóis, flavonóides(27), ácido linoleico (entre 43 e 49%), ácido linolênico (entre 32 e 38%), ácido oleico (entre 14 e 16%); ácidos graxos saturados: ácido palmítico (entre 3 e 5%), ácido palmitoleico (entre 0,1 e 5%), ácido esteárico (entre 1 e 2%), outros ácidos graxos como láurico, mirístico, araquidônico, gadoleico e behênico (entre 0 e 1%)(29,30).

Estudos pré-clínicos(2,31,32) realizados em ratos mostraram inibição da atividade inflamatória crônica ao mesmo tempo em que promoveu a limpeza da ferida e o desenvolvimento de um tecido de granulação e epitelização mais avançados e maturação tecidual mais acelerada com acentuada remodelação de colágeno. Mañán-Gonzales e colaboradores (2017) mostraram que a ingestão de óleo de *Rosa aff rubiginosa* atua na redução da secreção e expressão de citocinas inflamatórias além de atuar como antioxidante nos hepatócitos de camundongos(33).

Chrubasik e colaboradores(34) (2008) em revisão sistemática de literatura identificaram a necessidade de estudos clínicos para avaliar o potencial do uso da

---

<sup>c</sup> Óleos fixos são misturas de substâncias lipídicas obtidas normalmente por prensagem a frio ou sob extração por solventes a partir de semente; são ricos em ácidos graxos e mantêm forma líquida em temperatura ambiente(40).

Rosa Mosqueta em aplicações tópicas. Mollezi e Albedaña(35) (2002) indicam a Rosa Mosqueta no tratamento de cicatrizes hipertróficas, queloides, radiodermatites, úlceras, queimaduras e feridas. Em estudo clínico *in vivo* pacientes com cicatriz hipertrófica relataram melhora da textura, elasticidade e aparência geral da cicatriz(36). Já na pele íntegra, uma emulsão contendo 20% de óleo de *Rosa aff rubuginosa* melhorou significativamente a hidratação, as propriedades viscoelásticas e reduziu em 7% a presença de rugosidades(37).

### 1.2.3 Atividade Biológica dos constituintes do óleo de Rosa Mosqueta

Como visto anteriormente, o óleo de Rosa Mosqueta é rico em ácidos graxos, carotenoides, polifenóis, vitamina C, ácido trans retinóico e outros graxos essenciais. Compreender sua função biológica é de fundamental importância para justificar seu uso cutâneo, direcionar os estudos de eficácia e de incorporação em formulações farmacêuticas.

#### 1.2.3.1 Ácidos Graxos

Ácidos graxos formam uma classe de compostos que consistem em uma longa cadeia alifática hidro-carbonada e um grupo carboxila terminal (-COOH) (38,39).

O nome ácido graxo refere-se aos ácidos monocarboxílicos ou dicarboxílicos que podem ser liberados por hidrólise de gorduras ou óleos naturais(40). Podem ser de cadeia curta (4 a 6 carbonos), cadeia média (7 – 12 carbonos) ou cadeia longa (16 – 22 carbonos). Podem ser classificados como saturados, de consistência sólida à temperatura ambiente, ou insaturados, adquirindo forma líquida a temperatura ambiente(41).

Embora os mamíferos sejam capazes de sintetizar ácidos graxos, alguns deles só podem ser adquiridos através da dieta, como os ácidos linoleico e linolênico, devido à ausência da enzima delta9-dessaturase. Esses são chamados ácidos graxos essenciais(38,41). A Rosa mosqueta possui alta concentração desses dois ácidos graxos essenciais, além do ácido graxo monoinsaturado oleico e em menores quantidades, de ácidos graxos saturados, como o ácido palmítico, láurico e

mirístico. A Figura 7 apresenta um fluxograma de classificação desses principais ácidos graxos encontrados no óleo de Rosa Mosqueta.

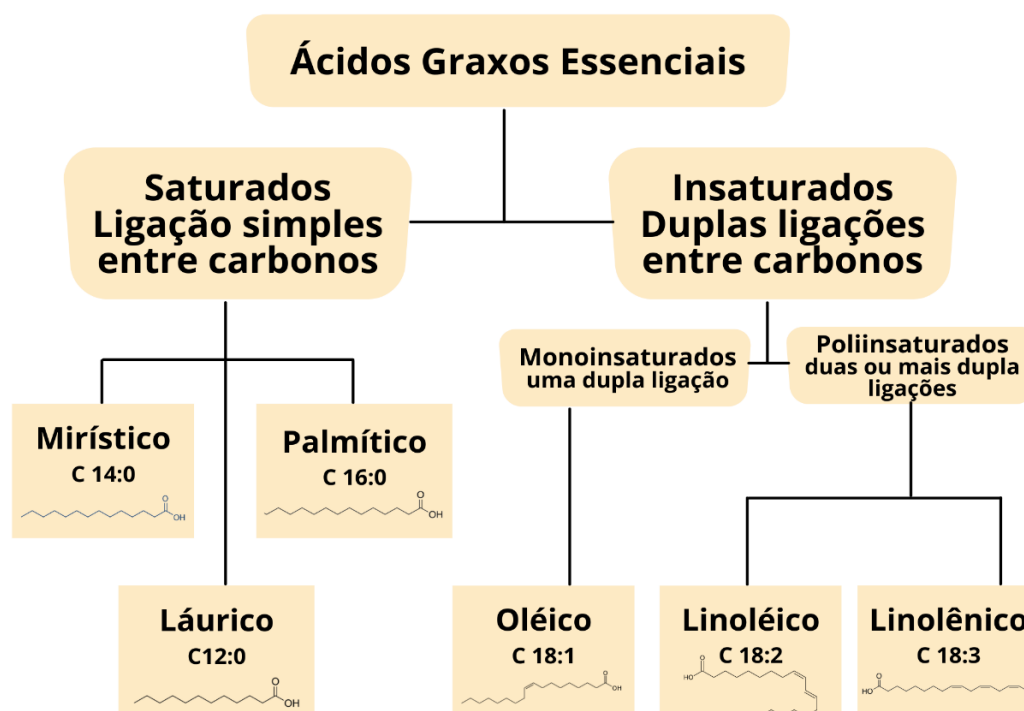


Figura 7 Fluxograma de classificação dos ácidos graxos essenciais. Fonte: Imagem da própria autora.

Os ácidos graxos essenciais possuem três funções biológicas principais: compõe estruturalmente as membranas celulares; atuam como precursores de mensageiros intracelulares; participam da geração de adenosina trifosfato (ATP) ao serem oxidados(38). Os ácidos graxos essenciais linoleico e linolênico atuam como precursores para a síntese de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o ácido araquidônico, eicosapentaenoico, docosaenoico, que atuam na integridade e fluidez das membranas celulares e síntese de eicosanoides como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano<sup>d</sup>(41).

Os ácidos graxos essenciais também têm sido relacionados ao aumento de influxo de neutrófilos, produção de óxido nítrico e ativação de fatores de transcrição nas primeiras 24h após injúrias teciduais seguido pela inibição desses mesmos fatores para resolução do processo inflamatório. Essa ação bioquímica mostra-se favorável ao processo de reparo tecidual, já que a ativação do processo inflamatório

<sup>d</sup> Esses são metabólitos do ácido araquidônico que atuam diretamente na resposta inflamatória local diante de injúrias teciduais, ativando a agregação plaquetária, vasodilatação e influxo de células de defesa para o tecido.

garante a limpeza local, favorecendo o estímulo para a proliferação de novas células(42,43).

Além disso, o ácido linoleico dentre outros ácidos graxos são fundamentais para a queratinização e manutenção da função de barreira da pele, auxiliando o estrato córneo na formação da matriz lipídica impermeável(43–45), enquanto o ácido oleico atua conferindo emoliência e lubrificância a formulações farmacêuticas de uso tópico(39).

### 1.2.3.2 Ácido trans retinóico

O ácido trans retinóico é um isômero geométrico<sup>e</sup> da família dos retinóis (Vitamina A) (Cf. Figura 8). Os retinóis atuam nas funções de crescimento, diferenciação celular e transformações epiteliais e compreendem uma série de derivados, como retinaldeído, ácido retinóico e retinil éster e seus derivados sintéticos(46–48).

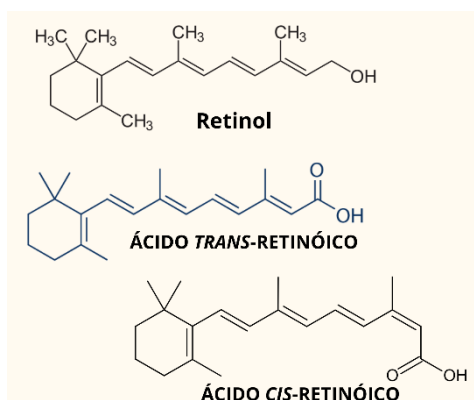


Figura 8 Estrutura trans do retinol formando o ácido trans retinóico ou tretinoína. Seu isômero *cis* corresponde à isotretinoína. Fonte: Imagem da própria autora.

Os retinóis, quando usados sistemicamente, aumentam a síntese de colágeno e reduzem a produção de collagenase, a enzima que degrada o colágeno. No epitélio, ligam-se à proteína ligante de ácido-retinóico celular CRABP-II e atuam

<sup>e</sup> A isomeria geométrica *cis-trans* é um tipo de isomeria espacial que avalia e compara a posição no espaço de ligantes de dois átomos de carbono em uma cadeia a partir de um plano imaginário entre os carbonos envolvidos. Ocorre em moléculas alifáticas com dupla ligação ou em compostos cíclicos.

aumentando a síntese de fibronectina, estimulando os fibroblastos e a migração epidérmica para a reepitelização(49).

O ácido trans retinóico ou tretinoína tem sido um dos retinóis mais investigados e está implicado na produção e deposição de fibras colágenas tipo I e III na derme papilar, contribuindo para aumentar a espessura da pele, inclusive estimulando células quiescentes para colagênese em peles envelhecidas e danificadas, além de aumentar a densidade das fibras de ancoragem na membrana basal da epiderme, melhorando o colágeno tipo IV e prevenindo a degradação de colágeno quando usado topicamente(48–50).

Seu uso na prática clínica tem sido bem estabelecido como agente antienvhecimento, conferindo melhora no aspecto cutâneo. Doses de 0,025% a 0,1% mostraram-se eficazes para melhorar a vascularização cutânea e aumentar a espessura da pele(51), especialmente da camada granular da epiderme, para reduzir a produção de melanina, o que resulta em clareamento da pele e redução de áreas de hiperpigmentação, proteção contra danos provocados pela radiação ultravioleta, redução de sulcos e melhora na organização da camada córnea da pele(52).

### 1.2.3.3 Ácido Ascórbico (Vitamina C)

O ácido ascórbico ou vitamina C é hidrossolúvel e termolábil que se encontra na natureza em duas formas: reduzida ou oxidada (ácido deidroascórbico). Ambas as formas são ativas, porém esta última é menos encontrada nos produtos de origem natural. No organismo, ocorre a transformação do ácido ascórbico para sua forma oxidada e vice-versa, funcionando como um sistema oxirredutor(53).

O ácido ascórbico também é importante na biossíntese das catecolaminas, atua no funcionamento do sistema imunológico, é fundamental na integridade das paredes dos vasos sanguíneos, atua na absorção do ferro, além de ser essencial para a formação das fibras colágenas existentes em praticamente todos os tecidos do corpo humano (derme, cartilagem e ossos). Também está associado à redução da secreção de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral (TNF), IL – 23 e proteína C reativa (PCR)(53,54).

Na pele, o ácido ascórbico funciona como um co-fator para duas enzimas essenciais na biossíntese de colágeno: lisil e proilil hidroxilases. Essas enzimas são

responsáveis por catalisar a hidroxilação dos resíduos prolil e lisil nos polipeptídeos colágenos, que permite a formação e estabilização da tripla hélice de colágeno, secretado para o espaço extracelular na forma de procolágeno. Em seguida, o procolágeno é transformado em tropocolágeno e, ainda sob influência das enzimas lisil e prolil hidroxilases, sofre um rearranjo espacial para a formação das fibras colágenas. Como co-fator, a vitamina C previne a auto-inativação dessas duas enzimas ao impedir a oxidação do ferro, contribuindo para a manutenção da atividade de síntese e estabilidade da trama colágena(55,56).

Além disso, tem sido demonstrado que a vitamina C também regula a síntese de colágenos tipo I e III pelos fibroblastos na derme humana. Estudos tem demonstrado que a presença de ácido ascórbico tópico é capaz de estimular a proliferação celular e síntese de colágeno independentemente da idade celular, provavelmente pelo estímulo à produção de RNA-m dos colágenos I e III, bem como de suas enzimas de conversão e do inibidor tissular das metaloproteinases matriciais<sup>f</sup> do tipo 1, na derme humana(57,58). Por esses mecanismos, o ácido ascórbico tem sua contribuição no processo de manutenção e restauração tecidual do tecido cutâneo.

Em adição, tem sido demonstrado que o ácido ascórbico é capaz de reduzir a produção de melanina pelos melanócitos, inibindo a ação da tirosinase, importante enzima envolvida na melanogênese(56). Por essa razão, o ácido ascórbico também tem sido utilizado para tratar quadros de hiperpigmentação e melhorar o aspecto da pele.

#### 1.2.3.4 Compostos fenólicos: Flavonoides

Os compostos fenólicos são encontrados na maioria das plantas como metabólitos secundários. Quimicamente, são compostos por anéis aromáticos ligados a uma ou mais hidroxilas, agrupados em várias formas, apresentando-se, na maioria das vezes, na forma de ésteres ou glicosídeos. Os grupos mais abundantes

---

<sup>f</sup> As proteases da matriz extracelular são responsáveis por degradar tecido conjuntivo e são estimuladas por diversos fatores. Entre eles, processo inflamatório, idade e fotoenvelhecimento. As metaloproteinases são responsáveis pela degradação do colágeno(54)

de compostos fenólicos incluem os flavonoides (quercetinas, catequinas, rutina, etc.)(59). As atividades biológicas dos compostos fenólicos ajudam a reduzir o estresse oxidativo e promover a proliferação e migração celular, estimulando a epitelização e a deposição do colágeno. Eles são capazes de agir tanto nos processos inflamatórios quanto nos processos proliferativos.

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal. No processo de cura, atuam como antioxidantes, antimicrobianos e moduladores da resposta inflamatória(60,61). Estudos mostram que os flavonoides atuam no processo inflamatório inibindo a proliferação de linfócitos T e a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, Fator de Necrose Tumoral Alfa - TNF $\alpha$  e IL-1), modulando a atividade de enzimas na via do ácido araquidônico, como Fosfolipase A2, Ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, e a enzima sintetizadora para óxido nítrico, a Sintase de óxido nítrico induzido (iNOS). A atividade imunomoduladora dos flavonoides ajuda na resolução mais rápida dos processos inflamatórios e estimula a migração e proliferação de fibroblastos(62–64).

#### 1.2.3.5 Betacarotenos

Os carotenoides formam um grupo de pigmentos naturais de aproximadamente 700 representantes, caracterizados por coloração amarela, laranja ou vermelha e são encontradas em frutas, crustáceos, peixes. Os betacarotenos possuem cor alaranjada e é um dos carotenoides que apresentam atividade pró-vitamina A, sendo convertidos em retinol (Cf. Figura 9) nas células epiteliais do intestino(65).





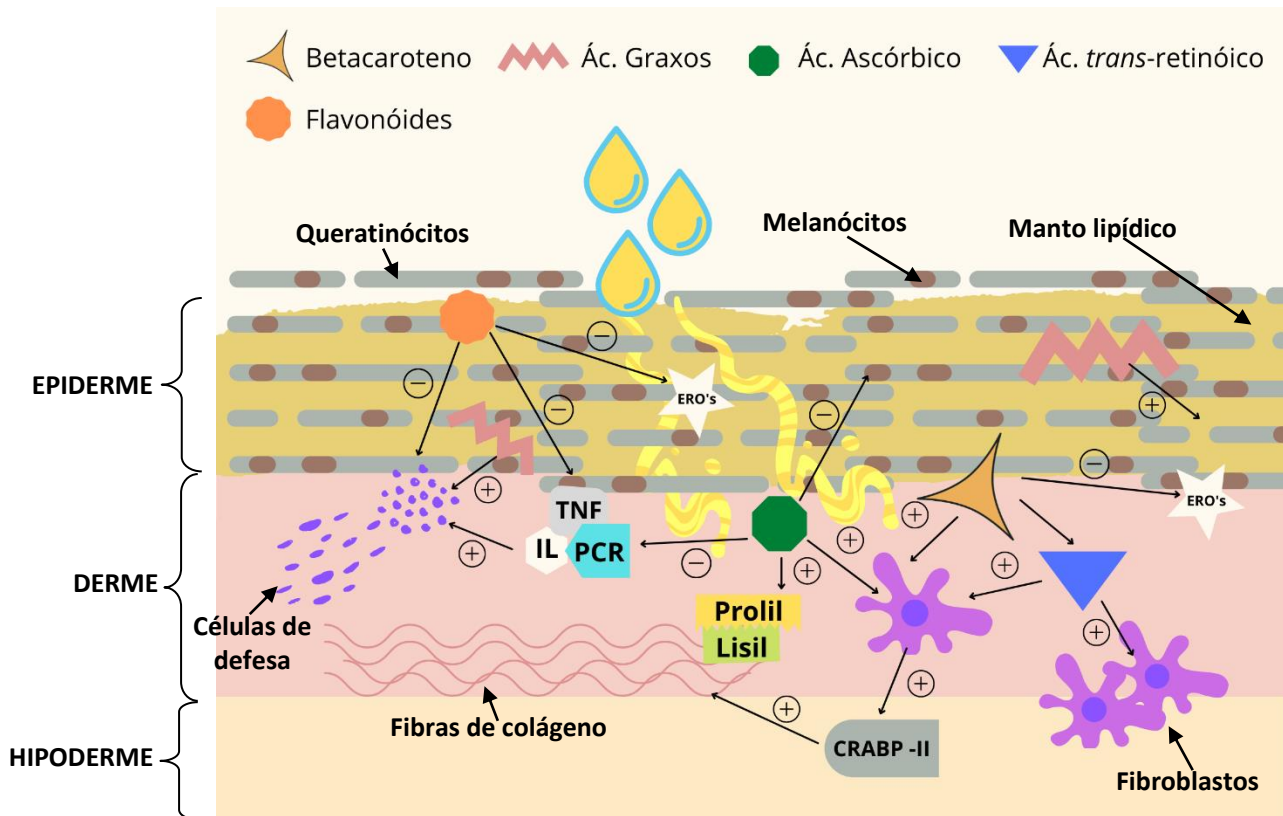


Figura 10 Esquema da ação biológica cutânea dos principais constituintes químicos do óleo de Rosa Mosqueta. Fonte: Imagem da própria autora.

#### 1.2.4 Qualidade do óleo vegetal: da extração ao processamento

A qualidade das matérias primas vegetais pode ser alterada de acordo com o tipo de solo, região, clima e período de colheita, podendo haver diferenças na presença e quantidade de princípios ativos(19). Der Walt (2016), estudando óleo de *Rosa aff rubiginosa* originadas da África do Sul relatou ausência de ácido trans retinóico em níveis identificáveis por Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)(37).

O processo de extração também pode alterar as características do óleo, degradando constituintes químicos devido ao aquecimento ou aos solventes utilizados. Como demonstrado por Concha et al. (2006) a extração do óleo de Rosa Mosqueta usando o método de pressão a frio das sementes garante um produto de melhor qualidade e com maior concentração de seus princípios ativos, especialmente preservando o ácido trans retinóico(67). Já Franco e colaboradores (2007), comparando a interferência de diferentes solventes na atividade antioxidante

do óleo de Rosa Mosqueta, demonstraram que fatores antioxidantes se mantêm mais preservados quando utilizados etanol e acetona(25).

Deve-se ter especial cuidado com as condições de armazenamento e transporte desses óleos, já que luminosidade, temperatura e umidade podem resultar em alterações das características iniciais do produto. Ainda assim, o processo de degradação desses óleos vegetais é inevitável ao longo do tempo, ocasionando aumento na acidez total devido à degradação dos lipídios via peroxidação, muitas vezes celerada pela luz e calor(68).

Portanto, embora o uso de óleos vegetais, seja na cosmética ou na prática clínica, apresente inúmeros benefícios, o desafio de preservar sua função biológica ao longo do tempo requer o desenvolvimento de tecnologias farmacotécnicas adequadas.

### 1.3 FORMAS FARMACÊUTICAS

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa (2011), o termo forma farmacêutica corresponde ao estado final de apresentação que os princípios ativos farmacêuticos possuem após operações farmacêuticas com ou sem adição de excipientes, visando facilitar sua utilização e obter o efeito terapêutico desejado, mantendo características adequadas à via de administração a que se propõe(69).

A forma farmacêutica é desenvolvida a partir de matérias primas que assumem diferentes funções dentro da formulação. O **fármaco**, **insumo farmacêutico** ou **princípio ativo** é a substância ativa da qual se espera o efeito terapêutico. Já os **excipientes** são matérias primas inertes que assumem a função de **adjuvantes**, conferindo o volume, forma e consistência adequadas à formulação. Por fim, há os **coadjuvantes**, que podem ser **farmacotécnicos**, com a finalidade de auxiliar as propriedades físicas, físico-químicas e químicas do princípio ativo; ou **terapêutico**, que tem a finalidade de melhorar a farmacodinâmica ou farmacocinética do produto(70).

A incorporação de produtos naturais em formas farmacêuticas não é um conceito recente. Desde a antiguidade, produtos naturais eram misturados a excipientes e aplicados em formas de emplastos, pastas ou óleos. A incorporação de um produto natural a uma forma farmacêutica visa à preservação da integridade química e farmacológica do produto, facilitar a aplicação e garantir a constância de

sua ação biológica e segurança na utilização, valorizando, assim, seu potencial terapêutico(71). Isso se faz premente especialmente com óleos vegetais, a exemplo do óleo de Rosa Mosqueta, cujos constituintes são facilmente oxidados pelo contato com o oxigênio ambiente e a luz, a exemplo do ácido ascórbico e do ácido *trans* retinóico. Além disso, há os componentes lipídicos, que sofrem naturalmente oxidação espontânea resultando em deterioração de sua atividade biológica ao longo do tempo(72).

As formas farmacêuticas podem ser classificadas em três tipos segundo o quadro 1 abaixo:

Quadro 1 - Relação dos tipos de formas farmacêuticas, suas vantagens, desvantagens e vias de administração.

Forma farmacêutica	Exemplos	Vantagens	Desvantagens	Vias de administração
Líquidas	Xaropes, suspensões, elixir, emulsões, injetáveis, tinturas, extratos	Fácil deglutição, rápida absorção, distribuição uniforme, menor irritação.	Instabilidade físico-química; palatabilidade; solubilidade.	Enteral, parenteral <sup>§</sup> , oftálmica, tópica, otológica, nasal.
Sólidas	Pós, comprimidos, cápsulas, supositórios	Estabilidade físico-química, palatabilidade, precisão da dose, liberação controlada do fármaco, redução de toxicidade.	Problemas na dissolução e liberação irão reduzir a dose disponível.	Enteral, parenteral, tópica, anal, pulmonar, vaginal.
Semissólidas	Crems, pastas, pomadas, géis, loções, unguentos, emplastos	Aplicação e efeitos locais, redução de efeitos colaterais e de efeitos sistêmicos.	Instabilidade físico-química, alterações locais podem reduzir a absorção.	Tópica, vaginal, anal
Gasosas	Aerossóis e sprays	Rápida absorção e rápido efeito.	Restrição de administração.	Pulmonar.

Assim, a escolha do tipo de formulação deve levar em consideração o produto tido como princípio ativo, o alvo de ação da atividade biológica e a via de administração. Formas farmacêuticas semissólidas possuem a vantagem de ter aplicação local e possibilitar o controle da absorção do princípio ativo para favorecer

<sup>§</sup> A via de administração enteral corresponde a sua passagem pelo trato gastrointestinal; já a via parenteral refere-se à administração direta no sistema circulatório.

ação local e não sistêmica, além de oferecer maior estabilidade físico-química que as formas líquidas. Além disso, as formas farmacêuticas semissólidas mostram-se mais compatíveis à incorporação de óleos vegetais para aplicação e ação cutâneas.

### 1.3.1 Formas farmacêuticas semissólidas

Formas farmacêuticas semissólidas são amplamente utilizadas como agentes terapêuticos e cosméticos para aplicações tópicas(73). Possuem consistência viscosa que permite seu espalhamento no local de aplicação. Podem ser utilizadas como recurso para administração de fármacos por via sistêmica de forma a reduzir a toxicidade pois evita o metabolismo de primeira passagem, para administração local de fármacos ou simplesmente com o objetivo de formar uma camada protetora sobre a pele. De acordo com os excipientes utilizados e suas características físicas(69,74), podem ser classificadas em cinco tipos conforme Figura 11:

<b>Pomadas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Feitas em base oleosa com dispersão de princípios ativos em baixa proporção.</li> </ul>
<b>Pastas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carregadas de sólidos insolúveis do tipo hidrofílico ou hidrofóbico (no mínimo 25%).</li> <li>• Possuem efeito absorvente.</li> </ul>
<b>Cremes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• São emulsões formadas por fase oleosa e aquosa. Podem conter princípios ativos dissolvidos ou dispersos.</li> </ul>
<b>Géis</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possuem agentes geleificantes para fornecer firmeza a uma solução ou dispersão coloidal, podendo conter partículas suspensas.</li> </ul>
<b>Emplasto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Base adesiva contendo um ou mais princípios ativos em camada uniforme em suporte feito de material sintético ou natural.</li> </ul>

Figura 11 Tipos de formas farmacêuticas semissólidas e suas características. Fonte: Imagem da própria autora.

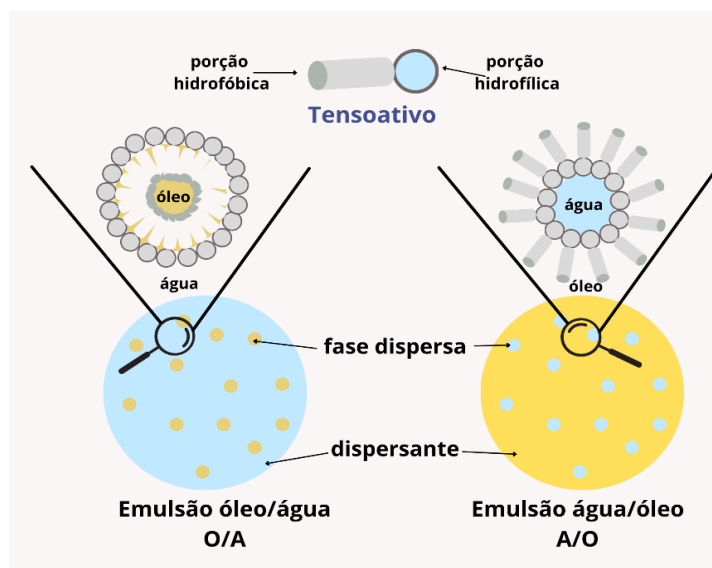
A seleção da forma farmacêutica semissólida deve ocorrer levando em consideração o objetivo da formulação e a compatibilidade física e química do princípio ativo a ser dissolvido ou disperso(75).

Fatores como condições do tecido cutâneo e propriedades físico-químicas da formulação podem influenciar diretamente na permeação através das camadas da

pele. Quanto à formulação em si, fatores como concentração do princípio ativo, propriedades organolépticas e emprego de coadjuvantes serão responsáveis por alterar o fluxo de permeação e penetração no tecido cutâneo(76).

### 1.3.2 Cremes, emulsões semissólidas

Cremes são emulsões semissólidas compostas por uma fase lipofílica e uma fase hidrofílica, de alta viscosidade, cuja consistência e propriedades variam de acordo com o tipo de emulsão utilizada: se água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A). Dessa forma, existe uma fase dispersa entremeadada por uma fase dispersante conforme esquema apresentado na Figura 12.



**Figura 12** Representação esquemática dos tipos de emulsões. Observe na emulsão óleo em água (O/A) as cadeias hidrofóbicas interagem entre si, formando pequenas gotículas de óleo dispersas na fase aquosa. Já na emulsão água em óleo (A/O), as cadeias hidrofóbicas se voltam para fora, isolando a fase aquosa em pequenas gotículas dispersas no meio oleoso. Fonte: Imagem da própria autora.

Para que a emulsão seja formada, é necessário o emprego de agentes emulsionantes a fim de alterar o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) da formulação, conferindo estabilidade ao sistema(77). O equilíbrio hidrofílico-lipofílico representa a relação entre os grupos hidrofílico e lipofílico das fases das emulsões. Os tensoativos são produtos que possuem uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica, o que causa diminuição da tensão interfacial entre as fases dispersa e dispersante,

facilitando o processo de emulsificação e estabilização(76,77). No processo de emulsificação, ele se posiciona entre as duas fases (aquosa e oleosa), originando a película interfacial que confere estabilidade ao sistema(78).

O EHL é representado por uma escala numérica dimensional de 1 a 20 usada para indicar as características prevalentes em determinado tensoativo e classificá-lo de forma a facilitar a escolha do tensoativo mais apropriado para o tipo de emulsão que se quer produzir(77). Esse sistema foi introduzido por Griffin em 1949, sendo que quanto maior o valor do EHL, maior a hidrofília do tensoativo(78). Agentes emulsivos de baixo EHL tendem a formar emulsões água em óleo, enquanto os agentes de maior EHL formam emulsões óleo em água(77,78). O Quadro 2 abaixo indica as principais características do tensoativo de acordo com o EHL.

Quadro 2 - Relação das características dos surfactantes segundo o equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL).

Característica	EHL
<b>Emulsionantes hidrófilo-lipófilo</b>	3 a 6
<b>Molhantes</b>	7 a 9
<b>Antiespumantes</b>	<8
<b>Emulsionantes lipófilo-hidrófilo</b>	8 a 18
<b>Detergentes</b>	13 a 15
<b>Solubilizantes</b>	15 a 18

Fonte: Zanin et al, 2002(78)

O melhor sistema emulsificante é escolhido a partir de seu potencial de solubilidade e emulsificação, toxicidade, valor de EHL. Os surfactantes não iônicos têm a vantagem de serem menos tóxicos e/ou irritantes comparados aos surfactantes iônicos e catiônicos(79).

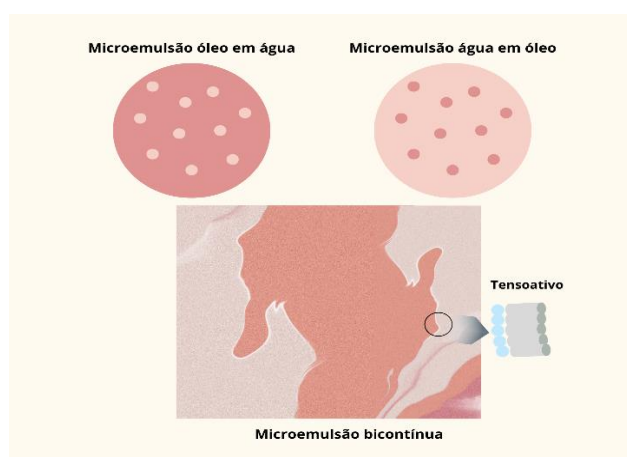
### 1.3.3 Microemulsões

Sistemas nano particulados têm sido estudados há décadas, adquirindo cada vez mais importância devido às diversas aplicações na medicina e na indústria química. Esses sistemas podem ser divididos em nano emulsões ou microemulsões, sendo muitas vezes confundidos na literatura ou até mesmo tratados como sinônimos(80).

Nano emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis, consistindo em minúsculas gotas ( $<300\text{nm}$ , porém  $>\mu\text{m}$ ), geralmente de um óleo suspensas em um meio aquoso. Embora consideradas termodinamicamente instáveis, o pequeno tamanho de suas partículas reduz o processo de coalescência e floculação, tornando a cinética de desestabilização extremamente lenta. Frequentemente, a desestabilização do sistema está relacionada a alterações de pH, temperatura ou pressão(81). A formação de uma nano emulsão pode dispensar o uso de surfactantes, embora sua adição ao sistema seja necessária para melhorar a estabilidade do mesmo(82).

O termo microemulsão foi introduzido pela primeira vez em 1959, após experimento realizado por Hoar e Schulman, em 1943, no qual observaram que a mistura de um componente orgânico, surfactante e água, adicionado de um álcool, originava um sistema líquido opticamente transparente e termodinamicamente estável(83,84).

Microemulsões são sistemas constituídos por líquidos imiscíveis cujo solvente está disperso em partículas de tamanho nanométrico na fase contínua. São caracterizados por serem termodinamicamente estáveis, isotrópicos, de baixa viscosidade(83). Estruturalmente, podem ser do tipo óleo em água (O/W), bicontínuas, ou água em óleo (W/O), conforme demonstrado na Figura 13.

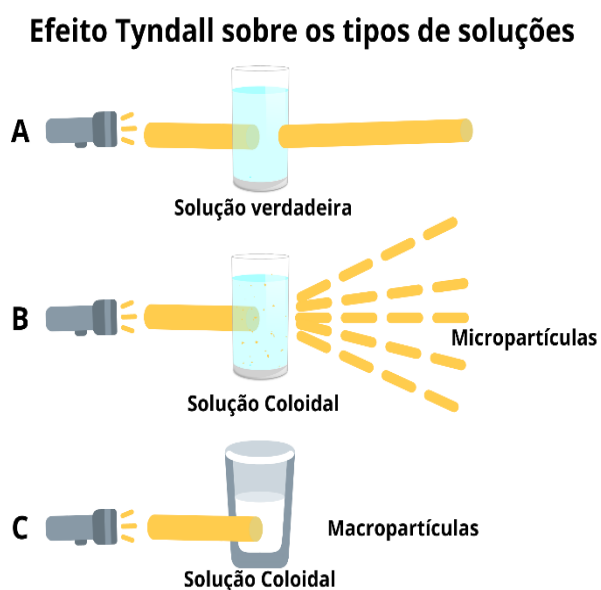


**Figura 13** Desenho esquemático da estrutura de microemulsões. Fonte: Imagem da própria autora.

Atualmente, o termo é reconhecido para designar uma mistura de óleo e água com o auxílio de um surfactante contendo ou não um Co surfactante, cuja formação depende do equilíbrio entre cada componente(81). Podem ser fabricadas

espontaneamente ou por métodos de baixa-energia, como por meio de inversão de fases catastrófica ou emulsificação espontânea. Diferentemente, nano-emulsões podem ser originadas espontaneamente ou por métodos que empregam alta-energia como homogeneização por alta-pressão e microfluidização(81,85). Embora o primeiro método demande maior uso de surfactantes, este se mostra mais simples e barato do que este último, e eficiente para a elaboração de microemulsões com características desejáveis(85).

Microemulsões (ME) são geralmente caracterizadas como agregados esféricos menores que 1400nm, frequentemente ao redor de 100nm. Por isso, são opticamente transparentes, e a literatura têm utilizado termos como sub, micro ou nanoemulsões para designar o mesmo sistema(80). Devido ao tamanho de suas partículas, formam dispersões coloidais<sup>h</sup> que permitem a passagem de luz por sua característica transparente(79), conforme observado na Figura 14.



**Figura 14** Representação do efeito dos sistemas coloidais sobre a passagem da luz. Fonte: Imagem da própria autora.

A vantagem das microemulsões óleo em água (O/A) está na maior estabilidade física e térmica dos seus componentes, assim como maior

<sup>h</sup> Dispersões coloidais são misturas onde partículas imperceptíveis a olho nu estão dispersas em um meio sendo impossível distingui-las do dispersante. Entretanto, é possível observar a passagem da luz pelo sistema coloidal devido às partículas dispersas, em um efeito chamado Efeito Tyndall.



disponibilidade principalmente de componentes lipofílicos devido ao tamanho de suas partículas(85).

As microemulsões diferem das emulsões essencialmente por sua estabilidade termodinâmica. Isso, frequentemente, porém não obrigatório, é alcançado com a adição de um cotensoativo ao tensoativo a fim de ajustar o EHL. Não existe uma mistura universal, mas geralmente o segundo tensoativo será considerado um cotensoativo que ajudará a estabilizar a emulsão(80). Esse cotensoativo é uma molécula menor que entra nos espaços que o tensoativo principal não consegue ocupar na interface das fases oleosa e aquosa(77,80). O cotensoativo pode ser escolhido com base em seu grau de etoxilação. Assim, quanto maior o grau de etoxilação do cotensoativo, maior será sua solubilidade em água e menor a viscosidade conferida à emulsão(77).

Frequentemente, o uso de surfactantes combinados com um álcool graxo<sup>i</sup>, que também possui natureza anfipática<sup>j</sup>, permite o surgimento de uma emulsão relativamente estável e mais viscosa quanto maior a quantidade do surfactante(73,79).

Na prática, as microemulsões se diferenciam opticamente das emulsões por serem transparentes, enquanto essas últimas, são opacas. Essa diferença deve-se ao tamanho das gotículas das microemulsões cuja ordem de grandeza é bem menor do que a dos comprimentos de luz visível. No entanto, a maior vantagem das microemulsões em relação às emulsões está na estabilidade e biodisponibilidade dos princípios ativos e custo de fabricação, conforme descrito no Quadro 3 abaixo:

Quadro 3 - Diferenças entre sistemas emulsionados.

(Continua, parte 1 de 2)

Parâmetro	Emulsões	Nanoemulsões	Microemulsões
<b>Turbidez</b>	Opacas	Variável	Transparentes
<b>Tipo de Dispersão</b>	Grosseira	Coloidal	Coloidal
<b>Estabilidade Termodinâmica</b>	Instável	Instável	Alta

<sup>i</sup> Os álcoois graxos são álcoois alifáticos derivados de gorduras e óleos naturais (lipídeos) originários de plantas ou sintetizados em animais e algas e tem regular número de átomos de carbono. Estão relacionados aos ácidos graxos.

<sup>j</sup> O termo anfipático, do grego *amphi* = ambos e *pathos* = paixão, é relativo a moléculas que possuem características tanto hidrofílicas quanto hidrofóbicas.

(Conclusão, parte 2 de 2)

Parâmetro	Emulsões	Nanoemulsões	Microemulsões
<b>Estabilidade Cinética</b>	Alta	Alta	Alta
<b>Tamanho das partículas</b>	1 - 100µm	20 – 600nm	<90nm
<b>Biodisponibilidade</b>	Baixa	Alta	Alta
<b>Quantidade de tensoativo</b>	Baixa	Média	Alta
<b>Formação</b>	Requer energia	Requer energia	Espontânea
<b>Custo de fabricação</b>	Alto	Alto	Baixo

Fonte: Böckel, 2009; Souza, 2017 (adaptado)

Microemulsões são desenvolvidas utilizando diagramas de fase pseudoternários, por meio dos quais é possível identificar os componentes mais adequados e suas proporções(80). Eles são apresentados na forma de um triângulo equilátero cujos vértices representam cada um dos componentes e, em cada um dos lados, as variações nas suas concentrações em proporções de 0% a 100%. Sua análise possibilita identificar as regiões de transição entre emulsões, fases separadas e microemulsões (O/A ou A/O)(80,83). A Figura 15 a seguir oferece uma representação de um diagrama de fases pseudoternário.

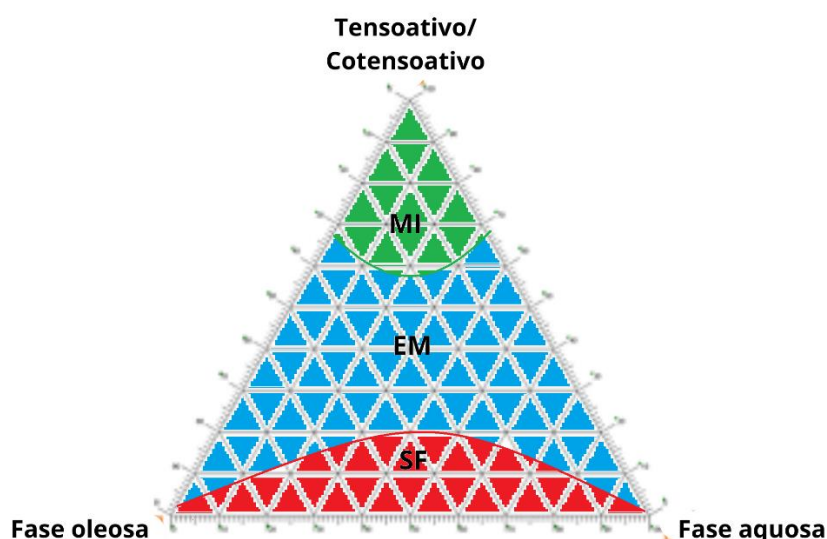


Figura 15 Representação de diagrama pseudoternário indicando as áreas de transição de fases de acordo com as proporções de cada componente. SF = separação de fases; EM = emulsão; MI = Microemulsão. Fonte: Imagem da própria autora.

## 1.4 QUALIDADE E SEGURANÇA DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS SEMISSÓLIDAS

A estabilidade de formulações farmacêuticas é essencial para a validação da qualidade e segurança de medicações, cosméticos e produtos para a saúde. O objetivo dos testes de estabilidade é oferecer evidências de como a qualidade de uma formulação ou substância farmacêutica varia ao longo do tempo sob a influência de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz e que permite recomendar condições de armazenamento e tempo de validade(86).

A avaliação de estabilidade atem-se às características físicas, químicas e microbiológicas e os limites de alterações devem levar em consideração as características dos produtos e insumos farmacêuticos utilizados e os resultados de estudos pré-clínicos e clínicos iniciais(87).

Para a avaliação da estabilidade, deve-se realizar uma série de ensaios voltados ao tipo de produto desenvolvido e sob condições compatíveis com a zona climática da região em que o produto será comercializado(88).

Uma das formas de se avaliar a estabilidade e segurança é através de estudos de estabilidade acelerado, e segundo a Organização Mundial da Saúde caracteriza-se por ser desenhado a fim de acelerar a degradação ou alterações físicas, químicas e microbiológicas de insumo farmacêutico ou medicamentos, utilizando condições exageradas de armazenamento. Os resultados irão auxiliar na determinação do prazo de validade e o efeito das condições de armazenamento e cuidados de conservação(86,87).

É estabelecido, ainda, que os testes de estabilidade acelerada devem ser realizados com pelo menos três lotes do produto a ser testado em temperatura controla de 40°C e 35% de UR (Umidade Relativa) por um período de seis meses em zonas climáticas tropicais ou três meses em zonas climáticas subtropicais(89).

O produto será considerado estável se as alterações não forem significativamente maiores do que os limites mínimos estabelecidos para cada tipo de produto ou condição. No geral, são consideradas alterações significativas: perda de mais de 5% na eficácia do produto ou dos seus constituintes iniciais, alteração de pH além dos limites estabelecidos, alteração nas características organolépticas aceitáveis, presença de produtos de degradação além dos limites permitidos (86).

Para fórmulas farmacêuticas líquidas e semissólidas, os seguintes parâmetros devem ser considerados nos estudos de estabilidade: aspecto, pH, sedimentação após agitação (para suspensões), perda de peso (para produtos com base aquosa), separação de fases (se emulsões), teor de claridade (no caso de soluções), teor, produtos de degradação e limites microbianos(88).

O uso de produtos naturais por vezes carece de informações acerca da qualidade, segurança e eficácia de uso. Embora utilizado popularmente, pouca informação sobre segurança e eficácia do uso do óleo de Rosa Mosqueta está disponível na literatura científica, especialmente quanto ao modo de ação nos sistemas orgânicos. Pouco se sabe sobre sua capacidade de permeação e atuação no tecido cutâneo, especialmente no que concerne ao processo de reparação tecidual.

Além disso, embora diversos cremes contendo óleo de Rosa Mosqueta estejam disponível no mercado, tais produtos carecem de informações adequadas quanto à origem do óleo e porcentagem do produto nessas formulações, sendo, na maioria das vezes, o óleo de Rosa Mosqueta combinado a outros produtos naturais ou sintéticos. Após pesquisa na internet, que tenhamos conhecimento, nosso produto é o primeiro a oferecer uma emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta com atividade cicatrizante. Ademais, propomos, também, o desenvolvimento de microemulsões contendo óleo de Rosa Mosqueta, a fim de avaliar se esse tipo de formulação trará resultados mais consistentes com menor quantidade de produto.

## 1.5 OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a qualidade e a segurança de formulações tópicas (emulsões e microemulsões) desenvolvidas com óleo de Rosa Mosqueta para uso na prática clínica. Dessa forma, são propostos os seguintes objetivos específicos:

- a) Desenvolver emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta e avaliar sua estabilidade acelerada por meio de características físicas e organolépticas (cor, odor, consistência, espalhabilidade, viscosidade, densidade); características químicas (pH e atividade antioxidante) e estabilidade

- microbiológica (testes de contagem total de microrganismos e desafio do sistema conservante);
- b) Avaliar a segurança da emulsão contendo óleo de Rosa Mosqueta na aplicação tópica por meio de testes de irritabilidade (HET-CAM - Hen's egg test chorionallantoic membrane) e toxicidade celular;
  - c) Realizar testes do perfil anti-inflamatório *in vitro* da emulsão contendo óleo de Rosa Mosqueta;
  - d) Desenvolver microemulsões contendo óleo de Rosa Mosqueta, utilizando Tween 80 como tensoativo e comparando dois cotensoativos diferentes: glicerina e propilenoglicol;
  - e) Avaliar as microemulsões quanto a granulometria, pH e condutivimetria e testar sua estabilidade de curta duração;
  - f) Avaliar a segurança das microemulsões contendo óleo de Rosa Mosqueta na aplicação tópica por meio de testes de toxicidade celular e de perfil inflamatório;
  - g) Observar o potencial de permeação e retenção cutânea do óleo puro ou incorporado em emulsão e microemulsão em estudo *in vitro*;
  - h) Avaliar a atividade biológica do óleo puro e incorporado em formulações no processo de cicatrização por meio de estudo histológico em modelo *ex vivo*.

## 1.6 MÉTODO DA PESQUISA

Foram elaboradas duas emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta pelo método de inversão de fases, apenas diferindo em relação à presença ou ausência do antioxidante sintético BHT (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol). As emulsões, juntamente com uma amostra do óleo puro foram acondicionadas em frascos *airless* e mantidas em câmara climática a 40°C e 35% de UR. Os lotes elaborados, juntamente com o óleo puro foram submetidos a testes de estabilidade acelerada por 90 dias durante os quais foram avaliados parâmetros organolépticos, microbiológicos, físicos e químicos.

Além da emulsão, foi desenvolvido o diagrama de fases pseudoternário para fins de elaboração de microemulsões de óleo de Rosa Mosqueta, empregando-se método de baixa energia, usando como tensoativo o Tween 80 e testando-se dois cotensoativos diferentes: glicerina e propilenoglicol. As microemulsões foram

submetidas a avaliação de pH, condutivimetria, avaliação do tamanho de partículas e polidispersão.

O óleo de Rosa mosqueta utilizado nesta pesquisa foi adquirido da Farmácia escola da Universidade Federal de Goiás e apresentava as seguintes características de acordo com a literatura: óleo refinado, extraído por prensagem a frio, com acidez máxima de 1% e umidade máxima de 0,3% (Anexo 1).

Tanto as emulsões como as microemulsões foram submetidas a testes de segurança a fim de se avaliar o grau de irritabilidade, viabilidade celular, perfil inflamatório, permeação cutânea e potencial cicatrizante. A Figura 16 esquematiza a metodologia do estudo e os respectivos testes empregados.

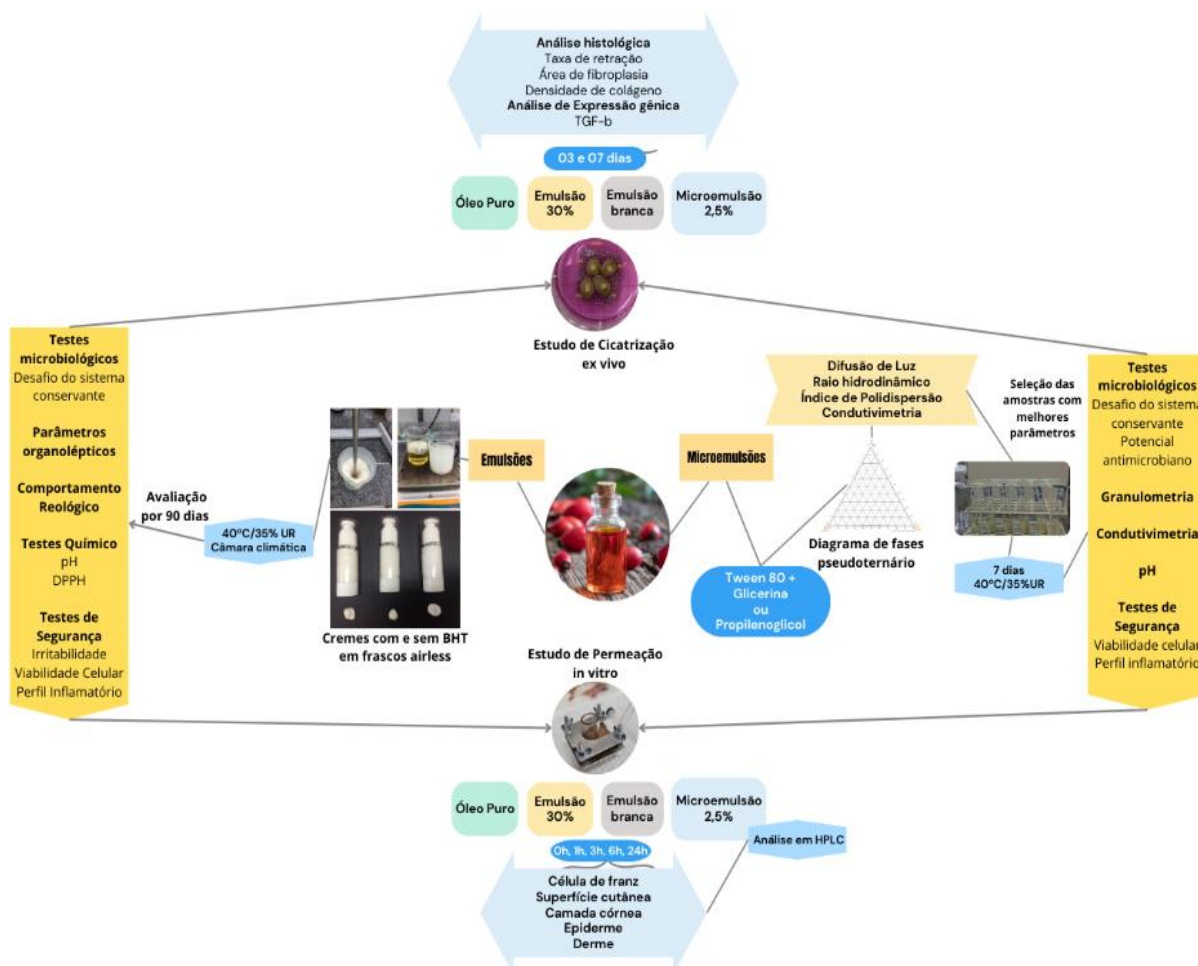


Figura 16 Esquema ilustrativo da metodologia da pesquisa. Fonte: Imagem da própria autora.

Os dados foram categorizados em planilhas de Excel® e analisados estatisticamente nos programas *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS® 2020) e GraphPad Prism 8.4. A análise de normalidade dos dados foi verificada usando o teste Shapiro-Wilk e foram realizadas análises de diferença de medianas para variáveis numéricas e diferenças de frequência para variáveis categóricas. As

figuras e gráficos apresentados foram elaborados nos programas Excel®, GraphPad Prism®, OriginPro® 2016 e Canvas.

Nos próximos capítulos serão apresentados os métodos, procedimentos e materiais empregados para os estudos de estabilidade, segurança e eficácia das formulações, estudo de permeação e retenção cutânea *in vitro* e cicatrização *ex vivo*, assim como os resultados e discussões.

## **CAPÍTULO 2**

---

**DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DE EMULSÃO CONTENDO 30% DE  
ÓLEO DE ROSA MOSQUETA**



## 2. DESENVOLVIMENTO E ESTABILIDADE DAS EMULSÕES CONTENDO 30% DE ÓLEO DE ROSA MOSQUETA

### 2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 2.1.1 Insumos e elaboração das emulsões

Os insumos utilizados para o desenvolvimento das emulsões foram: 1,2 propilenoglicol PA, sal dissódico EDTA, Solução de ácido cítrico 10%, Butil-hidroxitolueno PA adquiridos de Dinâmica LTDA (Brasil); cera não-iônica tipo polawax (Êxodo Científica); Clorexidina aquosa 20% (Neon Comercial LTDA, Brasil); óleo mineral (União Química); Óleo de Rosa Mosqueta (Leviale, Farmácia Universitária da Universidade Federal de Goiás); goma de tapioca da Engenharia das Essências.

As emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologias da Faculdade de Ceilândia (FCE-UnB), utilizando-se os insumos nas proporções descritas no Quadro 4.

Quadro 4 - Componentes das emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta segundo fórmula química, INCI, função e quantidades.

Fase	Componente Químico	INCI	Função	% (p/p)	Valor (100g)
Aquosa	D-Gluconic acid 2%	Chlorhexidine digluconate	Ativo antisséptico, conservante microbiológico	5%	5g
	1,2-Ethanediamine N,N,N',N'-tetrakis(carboxymethyl)-	EDTA	Agente quelante	0,1%	0,1g
	Propane-1,2-diol	Propylene glycol	Agente de viscosidade, umectante, solvente	5%	5g
	Goma de tapioca	Tapioca starch	Agente de viscosidade	3%	3g
	Distilled water	Water	Veículo da fase aquosa, solvente	q.s.p.	41,85g
Oleosa	Cera polawax	Cetearyl Alcohol (67762-27-0) / Polysorbate 60 (9005-67-8)	Emulgente, Agente de viscosidade	15%	15g
	Rosa Mosqueta oil	<i>Rosa rubiginosa</i> aff.	Princípio ativo, emoliente	30%	30g
	2,6-Di-tert-butyl-p-cresol	BHT	Antioxidante	0,05%	0,05g
Pós-Elaboração	2-Hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid	Citric acid 10%	Corretivo de pH	q.s	q.s

Para elaboração das emulsões, os componentes da fase aquosa e da fase oleosa foram pesados separadamente. Os componentes da fase aquosa foram mantidos sob energia ultrassônica (Altasonic Clean) por 15min. para completa

dissolução dos componentes sólidos. Após, as duas fases foram mantidas em aquecedor de placas (Logen Scientific) até atingir 70°C. A fase oleosa foi, então, lentamente vertida sobre a fase aquosa sob agitação constante com auxílio de agitador mecânico (Nova Ética M510-VERPB-3K5) até arrefecimento e formação da emulsão. O pH foi ajustado entre 4,5 e 5,5 e os produtos foram armazenados em câmara climática escura por 90 dias.

### 2.1.2 Estudo de estabilidade acelerada das emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta

Foram elaboradas duas formulações teste contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta, mas que diferiam apenas pela presença ou ausência do antioxidante sintético BHT (2,6-Di-tert-butyl-p-cresol). As emulsões foram armazenadas, juntamente com amostras do óleo puro e um creme branco sem o óleo, em frascos airless (Cf. Figura 18) por 90 dias em câmara climática à 40°C e 35% de UR em acordo com a Resolução RDC Nº 318 da Anvisa(89). Essas formulações foram avaliadas nos dias 1, 15, 30, 60 e 90 dias e foram denominadas neste trabalho como 'airless com BHT', 'airless sem BHT' e 'óleo'.



Figura 17 Armazenamento das emulsões em frascos airless. A – airless com BHT; B - airless sem BHT. Imagem da própria autora.

A estabilidade das formulações foi avaliada segundo as normas da Anvisa (2019) para produtos tópicos(90). Tanto as emulsões quanto o óleo foram avaliados segundo as características físico-químicas e organolépticas através dos testes descritos a seguir:

### 2.1.2.1 Avaliação microscópica

As emulsões foram espalhadas em lâmina de microscopia e coradas com corante violeta de genciana. Após, foram analisadas em microscópio de luz polarizada (Nikon Eclipse E 100) com ocular de 10x para observação da fase oleosa dispersa.

### 2.1.2.2 Perda de massa

Os frascos com as amostras (das emulsões e dos óleos) foram pesados no dia do envase e nos dias de avaliação (15, 30, 60 e 90 dias). A diferença dos pesos foi considerada perda de massa e a % de perda de massa foi calculada segundo Equação 1 abaixo:

**Equação 1**  $[\%] = (M_i - M_f) \cdot 100 / M_i$ ; Onde  $M_i$  = massa inicial e  $M_f$  = massa final

### 2.1.2.3 Parâmetros organolépticos

Nos dias de avaliação (01, 15, 30, 60 e 90 dias), os parâmetros de cor, odor, consistência e aspecto dos produtos foram avaliados sensorialmente e comparados com os aspectos observados no dia de elaboração. Diferenças encontradas foram caracterizadas como intenso (I), moderado (M), pouco (P) ou nenhum (N);

### 2.1.2.4 Centrifugação

A estabilidade das emulsões frente ao estresse mecânico foi avaliada através do teste de centrifugação. Três amostras de 0,5g de cada formulação foram acondicionadas em microtubos e centrifugadas em Centrífuga Hettich Mikro 200R a 3000rpm em 27°C por 30 minutos. Ao final, foi avaliado visualmente se houve separação de fases na amostra. O índice de cremação (C%) foi calculado através da relação entre a fase emulsionada (VE) e o volume total (Vt), de acordo com a Equação 2(39):

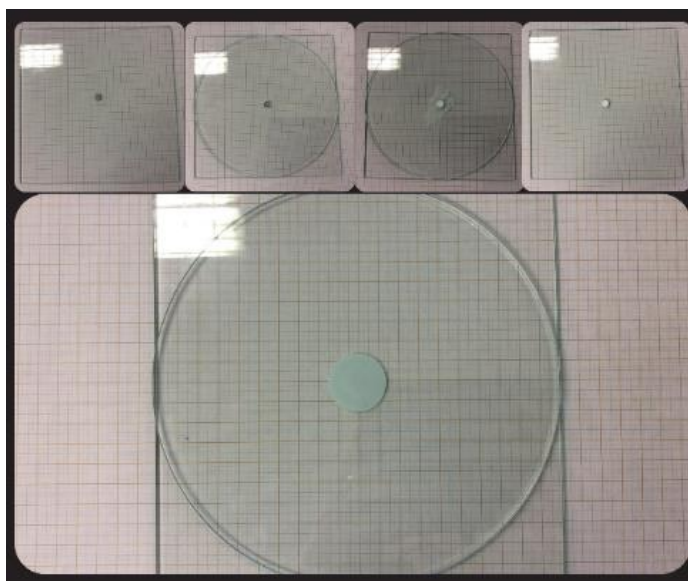
**Equação 2:**  $C(\%) = 100 \cdot (VE / Vt)$

### 2.1.2.5 Potencial Hidrogeniônico

A avaliação de pH das emulsões foi realizada com fitas de pH Kasvi®, devido à característica oleosa das amostras. A alteração de pH foi avaliada pela diferença entre o pH inicial e o pH final.

### 2.1.2.6 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade das emulsões foi avaliada com adaptação da metodologia de Knorst (1991)(91), utilizando um aparato de placas de vidro montado sobre papel milimetrado. Uma placa-molde com 20 cm de diâmetro, 0,3 cm de espessura e com orifício central de 1,2 cm de diâmetro foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre o papel milimetrado (Cf. Figura 19).



**Figura 19** Ilustração mostrando placa molde de vidro em papel milimetrado, onde é introduzida amostra no orifício central. Após retirada da placa molde, adicionam-se as placas de vidro e se procede à medição dos diâmetros vertical e horizontal. Fonte: Imagem da própria autora.

Uma quantidade de emulsão foi introduzida no orifício da placa-molde e a superfície nivelada com espátula. Após cuidadosa retirada da placa-molde foram adicionadas, sucessivamente, cinco placas de vidro de massa aproximada e conhecida (placa 1: 302,38g; placa 2: 300,65g; placa 3: 300,34g; placa 4: 302,62g; placa 5: 301,35g) em intervalos de um minuto, sendo calculada a média dos

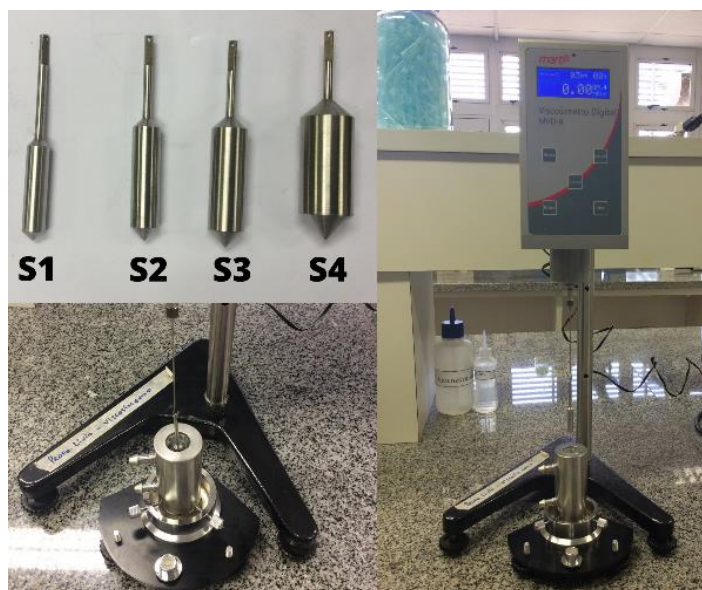
diâmetros ( $d$ ) abrangidos pela amostra em posições opostas (horizontal e vertical) e a espalhabilidade ( $Ei$ ) obtida através da Equação 3(91):

$$\text{Equação 3: } Ei = \left[ \frac{D1+D2}{4} \right]^2 * \pi$$

Onde **D1** corresponde ao diâmetro horizontal em mm, **D2** corresponde ao diâmetro vertical em mm e  $\pi=3,14$ .

#### 2.1.2.7 Viscosidade

A viscosidade do óleo e das emulsões, sob uma força de cisalhamento constante, foi verificada por meio de Viscosímetro Digital MVD-8 Marte (Cf Figura 20), adicionando-se 15 g de produto ao receptor de pouca amostra. Foi utilizado spindle 4 (S4) com rotação de 30 e 60 rpm sendo submerso na amostra até atingir a marca no nível do spindle. Os resultados de viscosidade (em Pascal segundo – Pa.s) e torque (%) foram coletados após 5 min. de funcionamento do viscosímetro.



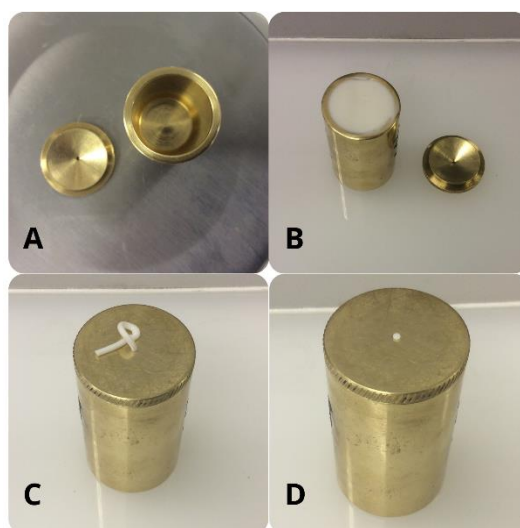
**Figura 20** Ilustração de viscosímetro com adaptador de pouca amostra e spindles utilizados. Fonte: Imagem da própria autora.

As emulsões também foram submetidas à avaliação da viscosidade sob taxa de cisalhamento variável ao longo do tempo, em reômetro (Hybrid Rehometer TA Discovery HR2, UK) com o emprego de placa plana. Uma quantidade suficiente de creme foi adicionada no centro da placa que foi aproximada até 1,5 mm, até que a

amostra saísse pelas bordas. Após limpeza do excesso de creme das bordas, a máquina iniciou o cisalhamento a uma temperatura constante de 25°C.

#### 2.1.2.8 Densidade

A densidade das emulsões e do óleo foi avaliada utilizando-se picnômetro de latão calibrado de volume interno de 0,03946516 cm<sup>3</sup>, contendo uma tampa de mesmo material de encaixe perfeito com um orifício em seu centro. O picnômetro foi pesado em balança digital calibrada e seu peso considerado peso zero. Após, o picnômetro foi preenchido com o material a ser avaliado e a tampa foi adicionada até total vedação, permitindo extrusão do excesso de material pelo orifício central (Cf. Figura 21).



**Figura 21** A - Picnômetro de latão sendo pesado; B - Preenchimento completo do picnômetro; C - Extrusão do excesso de produto pelo orifício central do picnômetro; D - Picnômetro após 5 min. pronto para pesagem. Fonte: Imagem da própria autora.

Aguardou-se 5 min. para a saída do excesso de material antes da pesagem do picnômetro cheio em balança digital calibrada. A densidade das amostras foi calculada através da Equação 4:

**Equação 4:**  $D = m/v$  onde  $m$  corresponde à massa do material dado em balança digital e  $v$  corresponde ao volume do picnômetro, estabelecido pelo fabricante em 25,2338 cm<sup>3</sup>.

### 2.1.2.9 Teste microbiológico

Os testes microbiológicos das emulsões foram realizados segundo as orientações da Farmacopeia Brasileira (2019)(92). Os ensaios descritos são relativos a produtos não estéreis visando garantir a qualidade e o controle de fabricação previstos nas boas práticas de forma a atender os parâmetros dos limites aceitáveis para microrganismos neste tipo de formulação. As formulações foram submetidas a testes de contagem total microbiana para fungos e bactérias e testes do desafio do sistema conservante.

Foram adquiridos meios de cultivo Peptona bacteriológica (Kasvi, Espanha), Plate Count Agar (Agar PCA da Himedia, Índia), Agar Base Dermasel da Oxoid (Inglaterra), Caldo Lúria Bertani (Lennox, USA) e Tween 80 (Isofar, Brasil).

Para a avaliação da contagem total microbiana, alíquotas de 5g de cada formulação foram mantidas sob agitação mecânica em 45mL de água peptonada 0,1% até dissolução da amostra. Placas contendo meios de cultura específicos para bactérias (Agar PCA) e fungos (Hagar Base Dermasel) receberam alíquotas de 0,1mL das amostras, em triplicata. As placas para bactérias foram armazenadas em estufa a 35°C por 5 dias e as placas para fungos foram armazenadas em temperatura ambiente por 7 dias. Ao final, foi realizada a contagem do número de colônias observadas.

O teste do desafio do sistema conservante foi realizado através de inóculos preparados por suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de *Mc Farland* ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre 0,08 – 0,10 de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram utilizados os seguintes microrganismos: 1) bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), 2) bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922) e 3) levedura (*Candida krusei* ATCC 6258). Os microrganismos foram escolhidos por serem comuns na microbiota da pele, área para qual o produto se destina, e pela disponibilidade no laboratório.

Para realizar o teste, 5g de cada formulação foram armazenadas em tubos Falcon e inoculadas com 100µL do caldo contendo a suspensão de microrganismos e homogeneizadas em vórtex. As amostras contaminadas foram mantidas em temperatura ambiente por até 14 dias. Após 7 e 14 dias, 1g de cada amostra foi retirada e dissolvida em vórtex em 9mL de água peptonada 0,1%. Volumes de

100µL dessa solução foi inoculada em placas de petri, em triplicata, contendo meios de cultura específicos para bactérias ou fungos. As placas contendo Agar PCA foram incubadas a 35°C por 2-3 dias e as placas contendo Agar Base Dermasel foram incubadas a 27°C por 7 dias. Os resultados foram expressos como média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama de amostra (UFC/g).

#### 2.1.2.10 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo puro e das emulsões foi avaliada pelo sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), verificando-se a redução de absorbância dos radicais em espectrofotômetro (Hitachi U-3900H), segundo método proposto por Kim et al (2002)(93). O método tem sido indicado tanto para compostos hidrofílicos quanto para compostos lipofílicos e possui a vantagem de permitir a interação do radical com os compostos das amostras por um maior tempo(94).

Os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e padrão de Trolox foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Álcool etílico PA foi adquirido da Dinâmica LTDA, enquanto acetona veio da empresa Neon Comercial LTDA.

O preparo das amostras foi realizado pesando-se 1,5g de creme ou óleo em tubos Falcon aos quais foi adicionado 1500µL de solução de acetona:etanol (80:20 p/p) e mantidos em sonificador (Altasonic Clean) por 15min. Após, as amostras foram submetidas a centrifugação por 15min. a uma rotação de 5000rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi utilizado para os testes, sendo submetidos a diluições seriadas até ser observada inibição de 50% do radical.

O radical foi preparado em etanol PA à concentração de 0,1mM. Sua densidade óptica inicial foi avaliada em espectrofotômetro à absorbância de 517nm. Em tubos de ensaio, foram adicionados 100µL de amostra a 2900µL do radical, agitado em vórtex e mantidas em repouso por 30min. protegido da luz. A leitura da absorbância foi realizada e os resultados comparados com o padrão Trolox segundo curva-padrão apresentada na Figura 22.



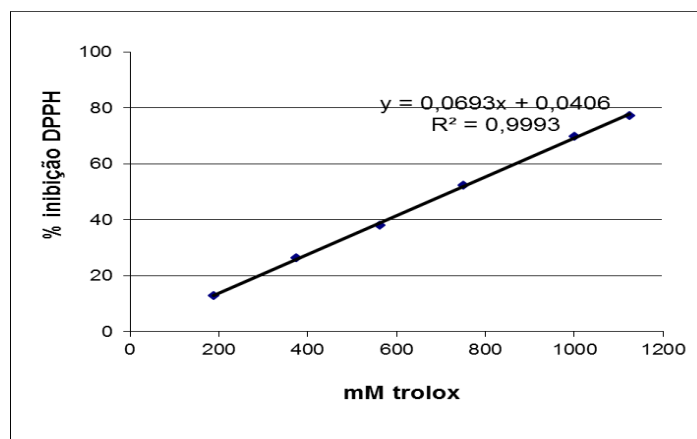


Figura 22 Curva-padrão da porcentagem de inibição do DPPH pelo Trolox. Fonte: Laboratório de Tecnologias Farmacêuticas, FCE - UnB

Os resultados foram primeiramente dados em % de inibição pela fórmula:

**Equação 5:**  $\% \text{ de Inibição} = [1 - (Af/A0)] \times 100$ , onde **Af** corresponde à **absorbância final** e **A0** corresponde à **absorbância inicial**.

A diluição das amostras foi ajustada pela fórmula:

**Equação 6 Correção** =  $X \cdot f / \text{Conc Inic}$  onde **X** corresponde à **% de inibição**, **f** corresponde ao **fator de diluição** e **Conc Inic** corresponde à **concentração inicial** das amostras em mg/mL.

### 2.1.3 Avaliação de segurança

Emulsões recém-elaboradas foram submetidas a teste de irritação pelo ensaio HET-CAM e avaliação de perfil anti-inflamatório e toxicidade celular *in vitro* conforme descrito a seguir. O óleo puro foi submetido apenas ao teste de irritação pelo ensaio HET-CAM.

#### 2.1.3.1 Teste de irritabilidade celular

A avaliação de irritabilidade utilizando membrana cório-alantoide (CAM) de galinha foi validado por Oliveira e colaboradores (2012)(95) com valor preditivo e especificidade de 80%. O teste HET-CAM (Hen's egg test chorionallantoic membrane) tem sido útil na substituição do teste de Draize a fim de reduzir a utilização animal na experimentação.

O teste foi conduzido em duplicata para cada substância teste, utilizando-se ovos fertilizados de galinhas incubados por 10 dias à 38°C ±0,5°C e UR de 70%. Foram comparados o óleo puro, a emulsão sem óleo e a emulsão teste contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta diluídas em água bidestilada na proporção 1:1, com o controle negativo de solução salina 0,9%.

Foi realizada abertura do terço superior da casca dos ovos, mantendo-se a integridade do embrião, até exposição da CAM (membrana cório-alantoide), sobre a qual foi aplicado 500µL do produto a ser testado e iniciada leitura após 20s de interação da substância com a membrana. Devido à opacidade das emulsões, o excesso de produto foi lavado para permitir a visualização da membrana e sua rede venosa, sendo examinada por 5min a fim de se observar as reações fisiológicas ao longo do tempo(96). As reações foram graduadas conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Graduação das alterações observadas na membrana cório-alantoide observadas no ovo de galinha

Reações	Tempo		
	≤ 30s	30s < t ≤ 2min	2min < t ≤ 5min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação/Opacidade	9	7	5

Fonte: Oliveira et al, 2012(95)

Para o cálculo do potencial de irritação, foi utilizada a Equação 7(97):

$$\text{Equação 7 } PI = [5 \times (301 - tH)/300] + [7 \times (301 - tV)/300] + [9 \times (301 - tC)/300]$$

onde: **PI** = potencial de irritação; **tH** = tempo de hemorragia em segundos; **tV** = tempo de vasoconstrição em segundos e **tC** = tempo de coagulação em segundos. O valor 300 corresponde ao total de segundos de leitura do teste.

Os resultados foram dados pela média das duplicatas e a classificação final dos produtos quanto ao seu potencial de irritabilidade foi dado segundo indicado na Tabela 2.

Tabela 2 - Classificação final do produto quanto ao potencial de irritabilidade segundo o teste HET-CAM

<b>Faixa (Grauação das lesões)</b>	<b>Classificação</b>
<b>0,0 – 0,9</b>	Não irritante (NI)
<b>1,0 – 4,9</b>	Irritante leve (IL)
<b>5 – 8,9</b>	Irritante Moderado (IM)
<b>9,0 a 21</b>	Irritante Severo (IS)

Fonte: Journal Officiel de la République Française, 1996(96)

### 2.1.3.2 Teste de Toxicidade Celular: ensaio de viabilidade *in vitro*

O ensaio de viabilidade celular tem por objetivo avaliar o potencial de toxicidade de um determinado produto sobre cultura de células específicas. Para esse ensaio, foi utilizado o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), que é um reagente usado para avaliar a viabilidade celular em função do potencial redox. As células que respiram ativamente convertem o MTT solúvel em água em um formazan de cor roxa insolúvel, que é então solubilizado e sua concentração determinada por densidade óptica.

Para o ensaio, foram utilizados queratinócitos humanos da linhagem HaCat, estocados em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura Celular da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongelados uma semana antes do ensaio, e acondicionados em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em um frasco para cultivo (25 cm<sup>2</sup>, TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB).

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos (cerca de 10<sup>3</sup>), elas foram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM foi descartado e as células lavadas com solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células foram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C, adicionando-se meio DMEM às células para neutralizar a ação da tripsina. Essa suspensão foi centrifugada por 3 min. a 300 g e o sobrenadante removido. O *pellet* de células foi ressuspenso em meio DMEM (1 a 3 mL) e uma alíquota dessa

suspensão foi usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

Os grupos experimentais foram divididos em: triplicata 1, 2 e 3 e o controle negativo (sem a formulação). Cada tratamento foi realizado em quintuplicata. As células foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços (3000 células/poço) e tratadas com variadas concentrações dos produtos, partindo-se de uma concentração de 1 mg/mL, e foram incubadas com os tratamentos por 24 horas.

Em seguida, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados.

Após 3 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e 200 µL de Dimethyl Sulfoxide (DMSO) foram adicionados em cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm.

Foram executadas análises da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC 50 foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal. Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0 e o GraphPad Prism versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5%.

### 2.1.3.3 Avaliação do perfil anti-inflamatório da emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta

#### 2.1.3.3.1 Múltiplas citocinas

O ensaio de múltiplas citocinas tem por objetivo verificar a atividade biológica da formulação na expressão de citocinas inflamatórias. A solução aquosa (1g/L) da emulsão recém preparada foi armazenada em tubo Falcon de 15 mL e acondicionada em geladeira a 8°C. Essa solução foi produzida conforme a necessidade do uso nos ensaios de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). A partir da solução estoque foram então realizadas diluições seriadas para obtenção

da concentração selecionada para o tratamento das células (1,0 mg/mL), escolhido conforme ensaio de viabilidade celular.

Para realização dos experimentos, alíquotas de meio de cultura de queratinócitos humanos HaCat contendo  $3 \times 10^3$  células/poço foram semeadas em placas de 96 poços (TPP) e incubadas por 24h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após os períodos de tratamento das células com as soluções, descartou-se o meio e a suspensão foi congelada a -20°C. A concentração das citocinas liberadas no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA. As citocinas avaliadas foram TNF-alfa, IL-6 e IL-10 conforme as instruções do fabricante (ThermoFisher). As doses mínimas detectáveis foram determinadas experimentalmente como 1,6 pg/mL. As medições de todas as citocinas resultaram em coeficientes médios intra ensaio de variação abaixo de 5%.

#### *2.1.3.3.2 Estudo em cultura de macrófagos RAW 264.7 e propriedades inflamatórias*

O ensaio de atividade anti-inflamatória foi proposto para verificar a atividade biológica das formulações no processo inflamatório em curso. Para o ensaio, macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura celular da Universidade de Brasília. Conforme necessário, as células foram descongeladas uma semana antes do ensaio, e acondicionadas em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em um frasco para cultivo (25 cm<sup>2</sup>, TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de SFB.

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos (cerca de  $10^3$ ), elas foram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM foi descartado e as células lavadas com uma solução tampão de PBS, e descartadas por meio de raspagem com suporte plástico (cell Scraper- corning Glass Workers, New York, USA). Essa suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 300g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o pellet de células foi ressuscitado em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células era usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

As células foram então colocadas em placas de cultura de 96 poços na

concentração de 50000 células/poço e incubadas por 12h no meio DMEM a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A solução aquosa da emulsão (1g/L) foi armazenada em tubo Falcon de 15 mL e acondicionada em geladeira (8°C). Esta solução foi produzida conforme a necessidade do uso nos ensaios de ELISA. A partir da solução estoque foram então realizadas diluições seriadas para obtenção da concentração selecionada para o tratamento das células (25 µg/mL,) escolhido conforme ensaio de viabilidade celular.

Assim, o experimento para atividade anti-inflamatória (dosagem de citocinas) iniciou com a semeadura das células (Macrófagos murinos) em placas de 96 poços (TPP) contendo  $3 \times 10^3$  células/poço cultivadas em DMEM. Adicionou-se os 25 µg/mL de solução aquosa das triplicatas 1, 2 e 3 nas diferentes placas, e o controle negativo ficou caracterizado como as células sem tratamento. Após 2 h de contato das formulações com as células, as amostras foram estimuladas com endotoxina bacteriana (LPS) de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharide B from *Escherichia coli* O111:B4- Sigma, MO, USA), na concentração de 2 µg/mL. As amostras foram incubadas por 24, 48 ou 72 h, conforme descrito anteriormente. Após os períodos de tratamento das células com as suspensões descartou-se o meio e foi congelado a -20°C. A concentração das citocinas liberadas no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA. A citocina avaliada foi TNF-alfa conforme as instruções do fabricante (ThermoFisher). As doses mínimas detectáveis foram determinadas conforme a especificação de 3,7 pg/mL. As medições de todas as citocinas resultaram em coeficientes médios intra-ensaio de variação abaixo de 5%.

Todos os experimentos foram feitos em quadruplicata em 3 dias experimentais.

#### **2.1.4 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 20.0 for Windows®. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças de medianas foram examinadas por meio de testes não paramétricos, enquanto as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. A análise da confiabilidade foi avaliada por meio dos Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI)(Koo; Li, 2016). Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0

e o GraphPad Prism versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados foram apresentados em tabelas e figuras criadas no Excel®.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.2.1 Avaliação de estabilidade e qualidade das emulsões

A elaboração das emulsões contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta resultou em um creme consistente, amarelo opaco e de odor característico oleoso (Cf. Figura 23).



Figura 23 Elaboração das emulsões pelo método de inversão de fases. Fonte: Imagem da própria autora.

Macroemulsões ou simplesmente emulsões são sistema metaestáveis, ou seja, estáveis por longos períodos, mas termodinamicamente instáveis que tendem à separação de fases(98). Os principais mecanismos de desestabilização de sistemas emulsionados podem ocorrer: 1) pela sedimentação ou flutuação da fase dispersa sobre a fase dispersante (sedimentação ou *creaming*), não sendo necessariamente acompanhada pela floculação das gotas sendo reversível após agitação(98,99); 2) pela da atuação das forças atrativas de London-van der Waals, que gera aglomerados frouxos da fase dispersa sobre a fase dispersante, evidenciadas por gotículas perceptíveis à inspeção visual (floculação)(100); ou 3) pela fusão das gotículas da fase dispersa até evoluir para a completa separação das

fases oleosa e aquosa (coalescência)(98,100). Para se avaliar a estabilidade do sistema macroemulsionado frente a esses mecanismos, são empregadas forças físicas, através do aquecimento ou do cisalhamento rotacional a fim acelerar esse processo.

Em nossas amostras, não foi identificada alteração nos parâmetros organolépticos (consistência, cor, odor) no estudo de estabilidade acelerada por 90 dias nas condições de armazenamento (40°C e 35% de Umidade Relativa). Da mesma forma, o estresse mecânico por centrifugação não provocou alterações físicas ou separação de fases (Cf. Figura 24), corroborando com a manutenção das características organolépticas ao longo do tempo de armazenamento.



Figura 24 Emulsões após centrifugação no dia 90 de armazenamento. Nota-se a ausência de separação de fases ou floculação. Fonte: Imagem da própria autora.

No geral, a emulsão elaborada mostrou estabilidade com manutenção da fase oleosa dispersa no meio aquoso sem alterações microscópicas significativas ao longo do tempo. Na Figura 25, é possível observar que tanto a emulsão elaborada com BHT quanto a emulsão elaborada sem BHT mantiveram características microscópicas inalteradas ao final do estudo quando comparado ao primeiro momento da avaliação. Observam-se as gotículas de óleo hipocrômicas (setas) dispersas de forma homogênea na fase aquosa, corada em roxo. Não é possível identificar agrupamento dessas gotículas ou aumento no seu diâmetro no dia 90 em comparação ao primeiro dia do estudo, o que indica que a fase dispersa se manteve estável em meio ao dispersante, garantindo sua estabilidade física.



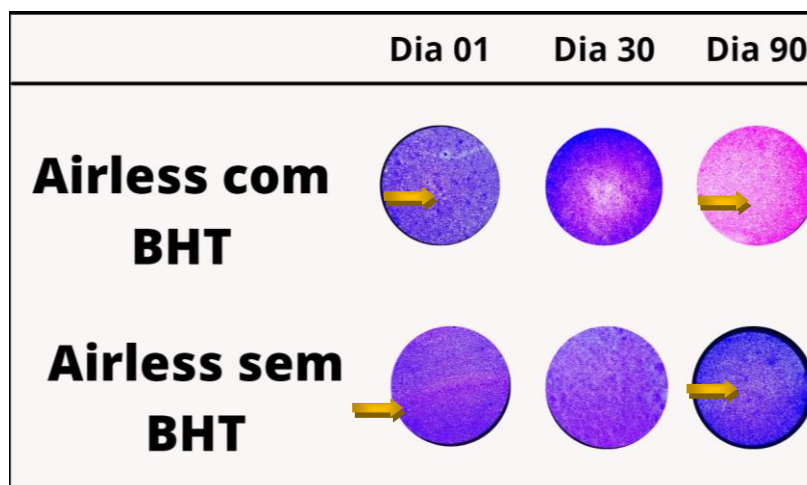


Figura 25 Avaliação microscópica das emulsões por luz polarizada. A seta mostra as gotículas de óleo, hipocrômicas no meio aquoso dispersante corado em roxo. Fonte: Imagem da própria autora.

Quanto à perda de peso, não houve diferenças significativas entre as duas emulsões e o óleo parece ter tido a menor perda total de peso (Cf. Figura 26). Ressaltamos que, em grande medida, a perda de peso se dá devido à perda de conteúdo aquoso das amostras e, observando que o óleo possui um máximo de 10% de conteúdo aquoso, sua perda total termina por ser menor, especialmente ao final do período de armazenamento. Por outro lado, a perda de peso total para todas as amostras foi em torno de 2,5% ao longo de todo o período de armazenamento, atingindo o critério de qualidade estabelecido na Resolução nº318 da Anvisa(89), de perda máxima total de 5%.

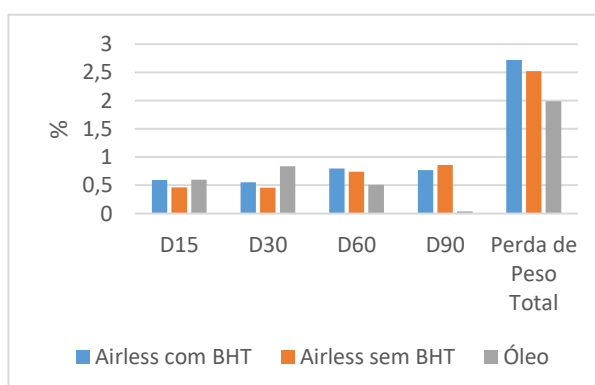
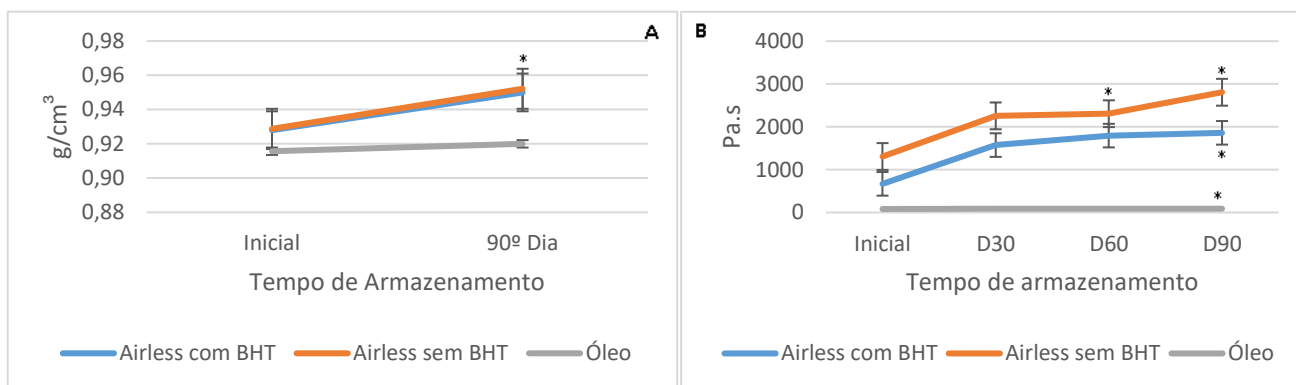


Figura 26 Porcentagem de perda de peso ao longo dos dias de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora.

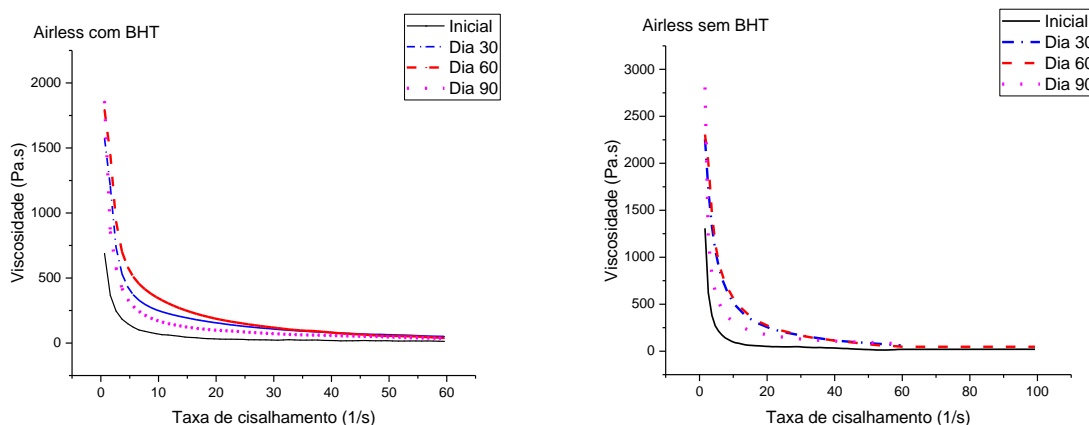
Corroborando com a perda de peso devido à perda de conteúdo aquoso, a densidade de ambos os cremes apresentou variação ao longo do tempo ( $P < 0,001$ ),

mostrando aumento estatisticamente significativo do 1º para o 90º dia. Quanto à viscosidade, observa-se que a emulsão elaborada sem antioxidante sintético apresentou viscosidade significativamente maior ( $p < 0,001$ ) a partir do dia 30 e alteração significativa em relação aos valores iniciais a partir do dia 60. Já o óleo apresentou aumento significativo no último dia de avaliação comparado ao dia inicial (Cf. Figura 27).



**Figura 27 Avaliação da A - densidade e B - viscosidade das amostras ao longo dos dias de armazenamento. \*Diferenças significativas  $P < 0,05$ , Anova Two Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora.**

Da mesma forma, a Figura 28 mostra um aumento da viscosidade pela força de cisalhamento ao longo do tempo, com queda no dia 90, chegando próximo aos níveis iniciais.



**Figura 28 Função da viscosidade pela força de cisalhamento das emulsões nos dias 1, 30, 60 e 90 de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora.**

Corroborando com esses resultados, a espalhabilidade média das emulsões apresentou redução nos dias 60 e 90 comparado ao nível inicial (Cf. Figura 29). A

comparação dos gráficos B e C da Figura 29 mostra que a emulsão com BHT manteve taxas de espalhabilidade maiores em relação à emulsão sem BHT.

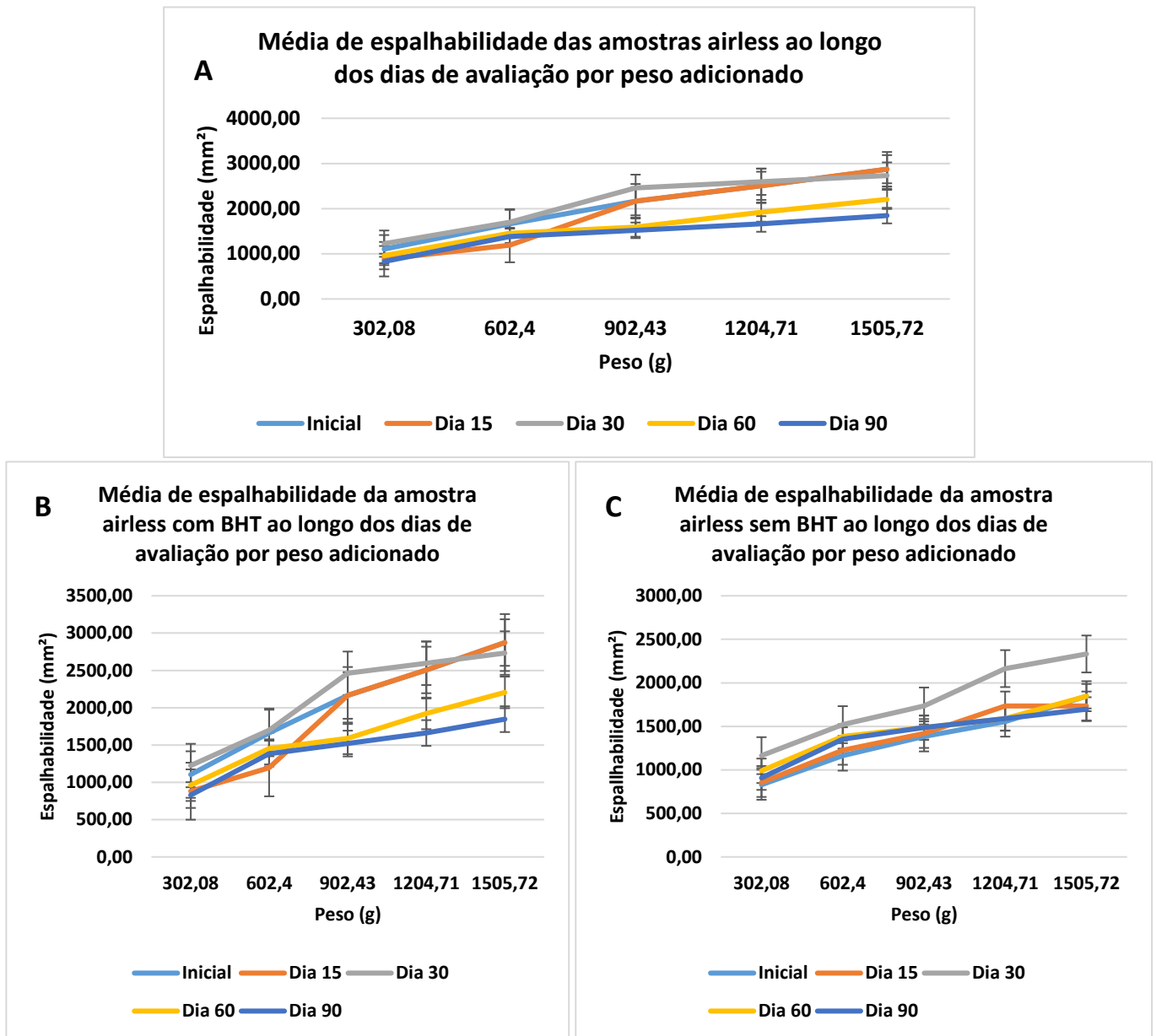


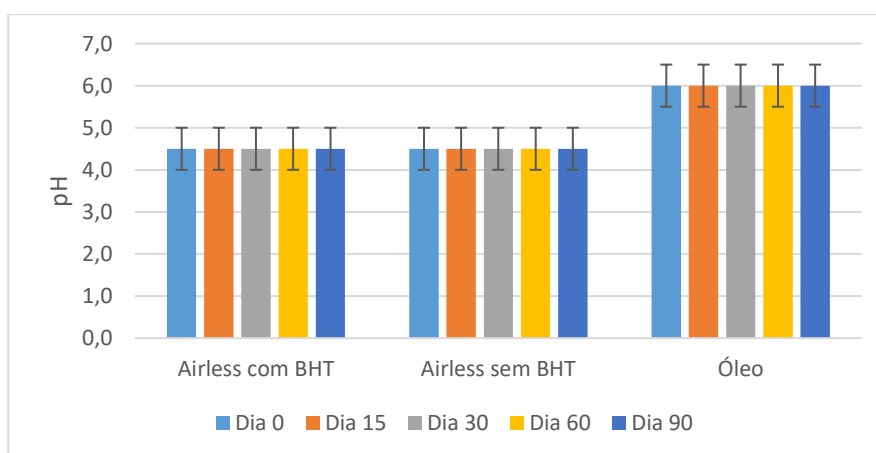
Figura 29 Média de espalhabilidade das amostras armazenadas em frascos airless ao longo do tempo de armazenamento por peso adicionado. A - média total; B - amostra airless com BHT; C - amostra airless sem BHT. Fonte: Imagem da própria autora.

A viscosidade refere-se à razão entre uma tensão de cisalhamento e o gradiente de velocidade em um fluido. Em termos simples, trata-se da resistência de um fluido ao fluxo ou movimento de objetos imersos através dele. Os resultados reológicos do teste de cisalhamento juntamente com os testes de espalhabilidade mostraram o comportamento tixotrópico da formulação, em que a viscosidade

diminui à medida que a taxa de cisalhamento aumenta. Essa redução se dá devido à forma elipsoidal que o dispersante adquire sob a influência da força externa, o que oferece menor resistência ao fluxo. Essa propriedade é importante, pois aumenta o tempo em que a formulação é retida na pele além de indicar a facilidade de aplicação do produto(101).

Viscosidade e espalhabilidade são parâmetros reológicos que dão pistas sobre a estabilidade de uma emulsão e a facilidade com que a formulação pode ser aplicada topicamente(101). A umidade pode interferir diretamente com a variação do conteúdo aquoso nas amostras e, conseqüentemente, com a densidade, espalhabilidade e viscosidade. A baixa umidade a que as amostras foram mantidas facilita a perda de água, incrementando sua densidade e, conseqüentemente, a viscosidade. Ainda assim, a amostra contendo antioxidante sintético não apresentou alteração significativa em sua espalhabilidade ao longo do tempo, indicando que, talvez, as variações observadas tenham mais relação com os aspectos químicos do que com os aspectos físicos da formulação.

O pH inicial das amostras foi estabilizado em torno de 4,5 com o objetivo de mantê-lo dentro da faixa de pH da pele, que varia de 4,5 a 5,8(3). As emulsões mantiveram-se dentro dos parâmetros estabelecidos ao longo do tempo de armazenamento conforme observado na Figura 30.



**Figura 30** Variação de pH ao longo dos dias de armazenamento. Fonte: Imagem da própria autora.

Procedemos, então, à investigação do comportamento antioxidante das amostras ao longo do tempo. A Figura 31 e a Figura 32 mostram que tanto o óleo

quanto a emulsão elaborada sem antioxidante sintético apresentaram forte queda em sua atividade antioxidante ao longo do tempo.

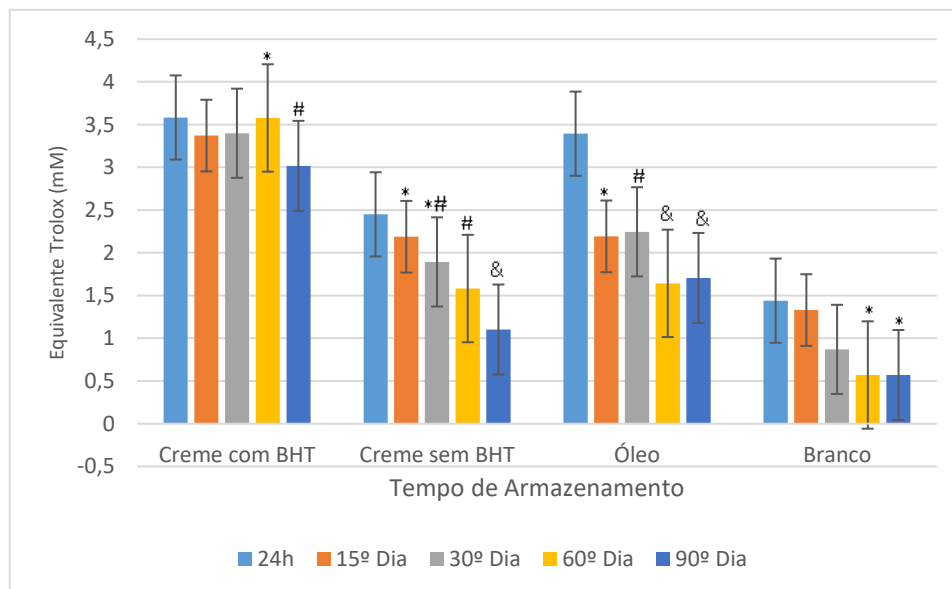


Figura 31 Diferenças intra amostra da atividade antioxidante pelo método DPPH ao longo dos dias de armazenamento. \*,#,&Diferenças estatísticas significantes,  $P < 0,01$ ; Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora.

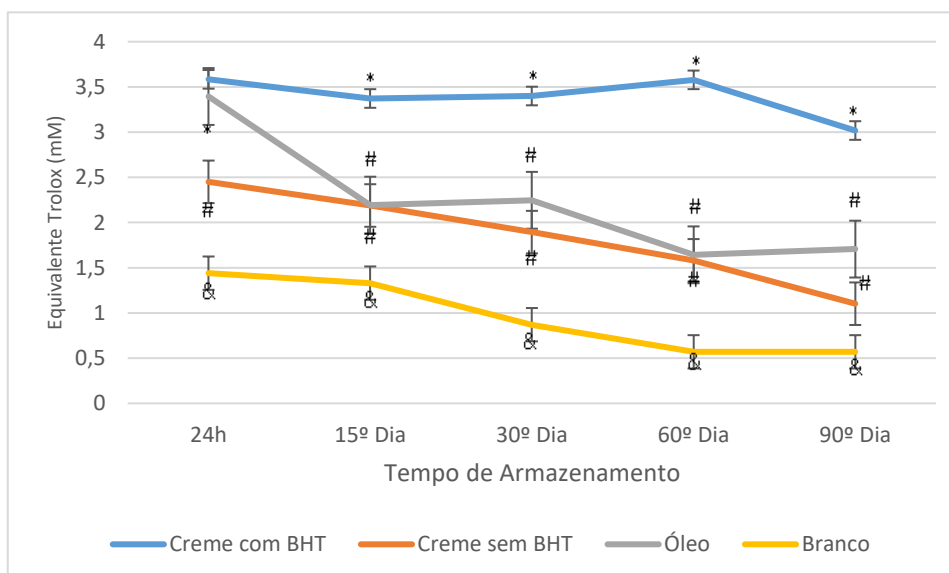


Figura 32 Diferenças na atividade antioxidante entre as amostras pelo método DPPH ao longo dos dias de armazenamento. \*,#,&Diferenças estatísticas significantes,  $P < 0,01$ ; Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora.

Estudo de Nogala-Kalucka et al (2010) mostrou que o óleo de Rosa mosqueta apresenta um total de 15mg/100g de tocoferóis, especialmente do tipo gama e um

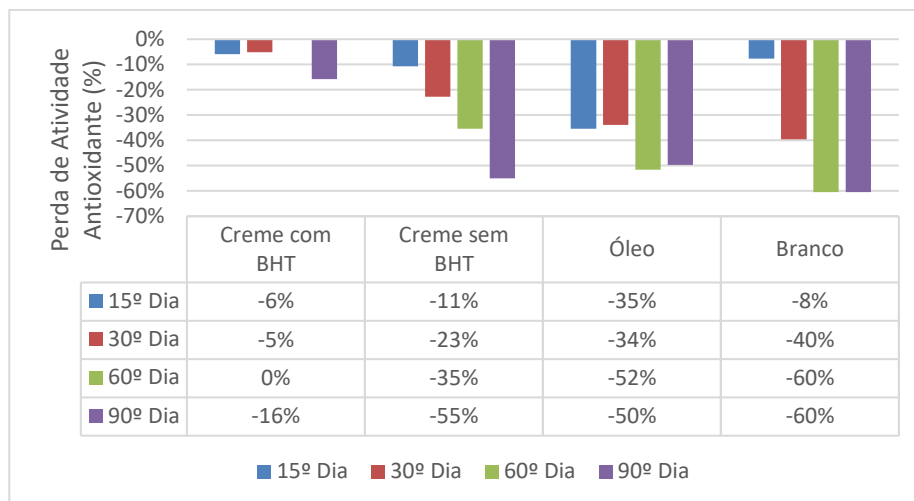
total de 140mg/g de compostos fenólicos com uma atividade antioxidante de cerca de 67% no sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH): (102). Algumas espécies de rosa, como a prímula, chega a ter cerca de 760mg/g de tocoferóis e uma atividade antioxidante de cerca de 90% no teste DPPH(102). Há que se destacar, contudo, que a atividade antioxidante está mais relacionada com a composição dos compostos fenólicos do que propriamente com sua quantidade(103).

Embora a emulsão contendo BHT tenha apresentado uma queda bem menor da atividade antioxidante ao longo do tempo, esse fato pode indicar um processo de oxidação dos compostos graxos aos 90 dias, o que pode estar diretamente ligado ao aumento da viscosidade nesse período(104).

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo provocado pela luz, oxigênio ambiente e temperatura que leva à deterioração dos corpos graxos com implicação direta no valor comercial e funcional de alimentos, cosméticos ou medicamentos(72). A incorporação de óleos vegetais em emulsões tem por vantagem a proteção de seus compostos contra os processos da peroxidação lipídica, mas deve-se ressaltar que a capacidade antioxidante da emulsão foi influenciada, principalmente pelo uso do BHT, cujo potencial antioxidante é eficaz no combate à peroxidação de lipídios(105) e pode ter sido fundamental para a preservação do óleo nas emulsões.

Esses resultados corroboram com outros estudos que mostram que a incorporação de óleos fixos ou óleos essenciais a formulações farmacêuticas, seja por meio de encapsulamento, nano emulsificação ou emulsificação, contribui para proteção dos compostos bioativos do óleo e manutenção de suas propriedades terapêuticas(106–108).

A maior perda de atividade antioxidante foi observada tanto no óleo puro quanto nas emulsões sem BHT e branca (*Cf.* Figura 33). Embora o antioxidante sintético tenha ação sinérgica à do óleo, este não parece ser o elemento principal da atividade antioxidante da emulsão, embora essencial para preservá-la ao longo do tempo.



**Figura 33** Comparação de perda percentual de atividade antioxidante das amostras ao longo do tempo de armazenamento comparado ao dia inicial. Fonte: Imagem da própria autora.

Se observar atentamente a Figura 32, verifica-se que a emulsão sem BHT possui uma atividade antioxidante inicial menor que o óleo. Teorizamos que o aquecimento do óleo bem como a adição da fase aquosa e a incorporação de oxigênio devido à agitação durante o processo de elaboração das emulsões provoque perda de sua atividade antioxidante(104). Por esses motivos, a adição de um agente antioxidante sintético mostra-se imprescindível para a preservação do óleo durante esse processo(109).

O óleo de Rosa Mosqueta contém cerca de 140,5mg/100g de tocoferóis(102) e cerca de 1,22µg/mL de betacarotenos(110), ambos conhecidos por seu papel antioxidante, especialmente na proteção dos componentes graxos do próprio óleo contra a oxidação(111,112). No entanto, tais componentes possuem alta sensibilidade ao calor, à luz e ao contato com o oxigênio do ambiente, levando a sua rápida degradação(112). Embora frascos airless tenham a propriedade de reduzir o contato do ambiente interno com o ambiente externo, aumentando, assim, a proteção do produto, verificamos que esse fator não é suficiente para garantir a atividade antioxidante tanto quanto a incorporação do óleo em emulsão e a adição de agentes antioxidantes à formulação.

Em relação ao controle microbiano, não houve crescimento de bactérias ou fungos em placa após a elaboração das emulsões ou ao longo do tempo de armazenamento. O teste de desafio do sistema conservante mostrou eficiência contra *S aureus* e *E coli* nos primeiros 7 dias, levando mais tempo (14 dias) para zerar a contaminação por *C krusei*. Mesmo após os 90 dias de armazenamento, as

emulsões foram capazes de zerar a contaminação por *E. coli* nos primeiros 7 dias, por *S aureus* em 14 dias e *C krusei* em 21 dias.

Uma das alternativas para aumentar a vida útil de uma formulação é lançar mão de substâncias que inibem o crescimento antimicrobiano, combatendo, juntamente, a geração de espécies reativas de oxigênio que levam à degradação mais rápida de seus componentes, especialmente ácidos graxos(113). Os microorganismos testados neste trabalho são os principais responsáveis por contaminação externa de produtos devido à manipulação(114), indicando eficiência do conservante na formulação, fator importante para a sua estabilidade.

Há que se destacar que os sistemas conservantes têm levantado grande discussão nas últimas décadas devido às controvérsias em torno dos parabenos, principal agente utilizado para conservação de cosméticos(113). Mesmo sem comprovação de seus efeitos deletérios para a saúde humana(115), produtos alternativos têm sido introduzidos no mercado, como fenoxietanol, benzoato de sódio, ou mesmo óleos vegetais, como alho, canela e timol.

Digluconato de clorexidina é uma biguanida catiônica amplamente utilizada como antisséptico de amplo espectro, impregnada em coberturas para cateteres como forma de prevenir infecções(116). A clorexidina atua rompendo a parede bacteriana de forma a afetar o equilíbrio osmótico, sendo mais efetiva contra bactérias gram-positivas, embora também demonstre ação contra algumas gram-negativas, fungos e vírus a uma concentração de 0,5% a 4%(117). Uma nanoemulsão com 0,25% de clorexidina mostrou eficácia no controle microbiano in vitro e in vivo tanto contra gram-positivas quanto contra gram-negativas(118). Neste estudo, a formulação desenvolvida contém 0,1% de clorexidina como agente preservativo, concentração que foi capaz de manter o sistema estéril ou mesmo zerar a contaminação por bactérias e fungo.

## **2.2.2 Avaliação de segurança**

### **2.2.2.1 Teste de Irritabilidade HET-CAM**

A Figura 34 abaixo mostra a reação das membranas cório-alantoides a cada um dos produtos testados e compara com os controles negativo e positivo. É



possível observar, que, diferentemente do controle positivo, não foram identificadas reações ou alterações fisiológicas nos tecidos onde os produtos foram aplicados.

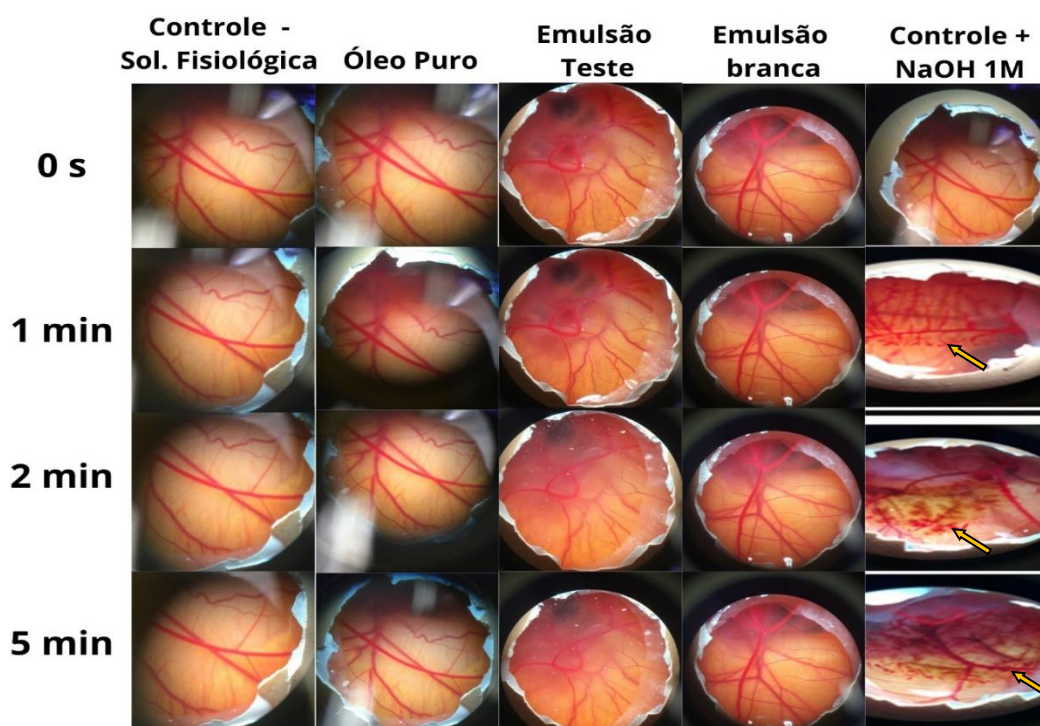


Figura 34 Avaliação do potencial de irritabilidade do óleo e da emulsão de Rosa Mosqueta pelo método HET-CAM. Setas indicam áreas de hiperemia, hemorragia e coagulação respectivamente Fonte: Imagem da própria autora.

A Tabela 3 abaixo mostra a pontuação de cada formulação e sua classificação segundo o potencial de irritabilidade.

Tabela 3 - Classificação do potencial de irritação dos produtos testados segundo teste HET-CAM, 2019

Grupos	Controle - (Soro fisiológico)	Controle + (NaOH)	Óleo Puro	Emulsão 30%	Emulsão branca
Hemorragia	0,0166	4,0166	0,0166	0,0166	0,0166
Hiperemia	0,0233	4,2233	0,0233	0,0233	0,0233
Coagulação/Opacidade	0,003	3,63	0,003	0,003	0,003
Índice de Irritabilidade	0,07	11,87	0,07	0,07	0,07
Classificação*	NI	IS	NI	NI	NI

\*Conforme tabela 1; NI = não irritante; IS = irritante severo

Esses resultados colocam tanto as emulsões quanto o óleo puro na classificação de não irritante. Da mesma forma, Sousa e colaboradores (2018)(119), avaliando emulsões contendo 10% (w/w) de óleos vegetais de *Syagrus coronata* (Licuri) e *Syagrus cearenses* (Catolé), palmeiras típicas brasileiras, não observaram

atividade irritante dos produtos testados na membrana cório-alantoide de aves. Destaca-se que, assim como o óleo de Rosa Mosqueta, esses óleos também possuem em sua constituição majoritariamente ácidos graxos insaturados (incluindo ácidos oleico, linoleico, láurico e palmítico). Outro produto contendo 1% (w/v) de extrato de *Achyrocline satureioides*, extraído das inflorescências, rico em flavonoides também não mostrou potencial irritativo mesmo incorporado em sistema nanoemulsionado para aplicação cutânea com foco em cicatrização de feridas(97).

Em nosso teste, utilizamos também o óleo puro sem diluição, que não desencadeou reações de irritação na membrana, indicando que este é inofensivo para o uso cutâneo. Diferentemente, Weimer e colaboradores (2021)(120), avaliando potencial irritativo do óleo essencial de *Citrus aurantiifolia* (lima comum) extraído tanto da pele dos frutos quanto das folhas resultou em severo potencial irritativo dose-dependente, tornando-se inócuo apenas quando diluído a uma concentração de 10mg/mL. Esses resultados talvez estejam relacionados com a maior quantidade de compostos fenólicos encontrados em óleos essenciais, ao contrário de óleos fixos, que são mais ricos em ácidos graxos essenciais.

É importante frisar que Oliveira e colaboradores (2012)(95), em estudo de validação do HET-CAM encontrou uma especificidade de 80%, verificando que o teste está mais propenso a resultados falso-positivos. Assim, é possível afirmar neste estudo que os produtos testados não possuem potencial irritativo, já que se mostra muito mais raro a ocorrência de resultados falso-negativos com o teste em questão(121).

Além disso, o teste da membrana cório-alantoide foi pensado para avaliar produtos de aplicação ocular, uma região mais permeável e sensível comparada ao epitélio cutâneo. Assim, tem-se que ausência de reação irritativa no teste, traduz-se em uma maior segurança para o uso tópico desses produtos(121).

#### 2.2.2.2 Avaliação da viabilidade celular

Quanto ao ensaio de viabilidade celular pela técnica de redução do MTT, verificou-se que as formulações obtidas não apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem de queratinócitos HaCat, com resultado que não diferiu estatisticamente do controle negativo. Os dados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Avaliação de viabilidade celular pelo método MTT da emulsão em triplicata.

MTT	Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3	Controle negativo
*IC <sub>50</sub> (µg/ml)	5086,2	5503,6	6191,2	5879
Confidence interval	3250-7235	4532-8222	4745-8589	3734-8432

\*IC<sub>50</sub> = concentração do composto necessária para 50% de viabilidade.

A concentração de emulsão necessária para provocar a morte de 50% de queratinócitos foi semelhante ao controle negativo, indicando ausência de citotoxicidade contra queratinócitos humanos. Os critérios de citotoxicidade para novos compostos, conforme estabelecido pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) (122), são de IC<sub>50</sub>>1000µg/mL no ensaio preliminar para serem consideradas seguras ao ser humano (123). Em ensaio semelhante, Brandão et al (2021)(124) e Balestrini et al(97) encontraram um IC<sub>50</sub> de 50 µg/mL e 10 µg/mL para os extratos de *Arrabidaea chica* (Crajiuru) e *Achyrocline satureioides* (macela-do-campo) no teste com queratinócitos humanos, respectivamente. Nossa amostra obteve uma concentração 100 a 600 vezes maior para o IC<sub>50</sub>. Outro estudo utilizando óleo vegetal indicou concentração máxima segura para viabilidade de queratinócitos na ordem de 2500µg/mL(125). Assim, a formulação aqui testada foi enquadrada nos critérios do NCI, sendo consideradas não tóxicas para células humanas.

### 2.2.2.3 Atividade antiinflamatória

Quanto ao perfil inflamatório com múltiplas citocinas, a Figura 35 mostra os níveis da citocina TNF-α e Interleucinas 6 e 10 em queratinócitos tratados com solução da emulsão de óleo de Rosa mosqueta a 30% (triplicatas 1, 2 e 3) e com o controle negativo (células cultivadas no meio sem o tratamento (Controle -)). Pelos resultados obtidos, foi possível verificar a manutenção dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL6), acompanhado de um pequeno aumento da citocina anti-inflamatória IL10 nos grupos tratados com solução da formulação.

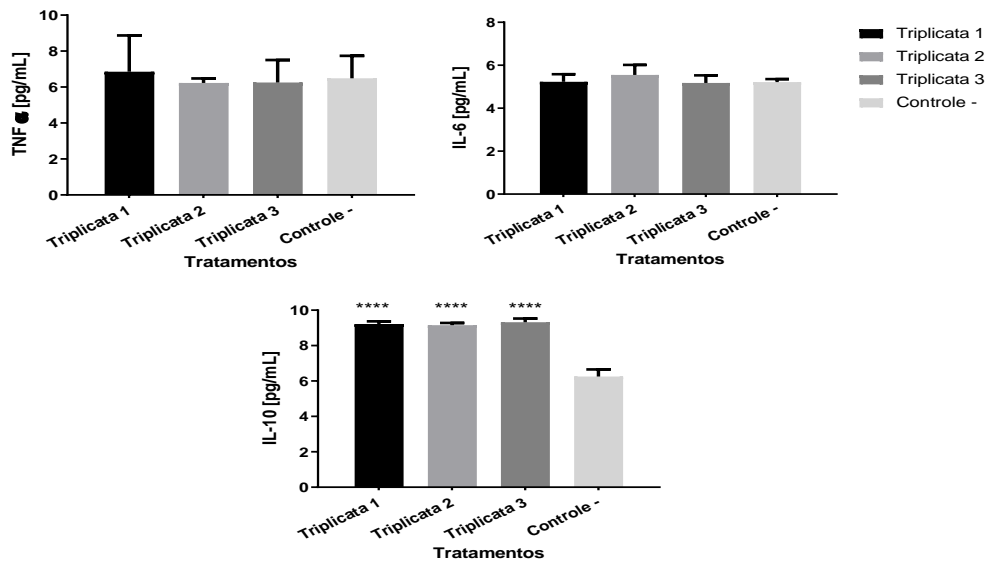


Figura 35 Níveis de produção da citocina TNF alfa e interleucinas IL6 e IL10 em sobrenadantes da linhagem celular HaCat tratadas ou não com as formulações testadas (\*\*\*\* =  $P < 0,0001$ ; ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora.

Já a avaliação da propriedade inflamatória em macrófagos de murinos pela avaliação dos níveis da citocina TNF alfa *in vitro* mostra que não houve alteração do perfil inflamatório quando comparado os resultados das triplicatas com o controle negativo (células cultivadas no meio sem o tratamento = Controle -) nos tempos de 24, 48 e 72h (Cf. Figura 36)

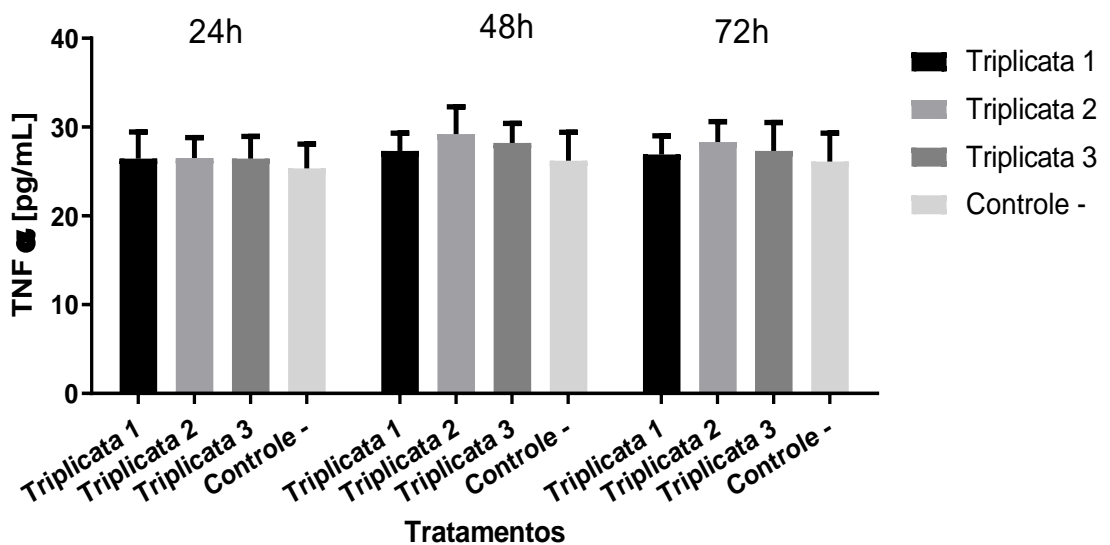


Figura 36 Níveis de produção da citocina TNF alfa em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ( $P < 0,001$ , ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora.

A avaliação do perfil inflamatório da emulsão elaborada com 30% de óleo de Rosa Mosqueta permite inferir que esta não possui efeito pró-inflamatório. Ao contrário, observando-se os dados da Figura 35, observou-se que a emulsão provocou um aumento, ainda que moderado, na excreção de IL10. Essa interleucina é reconhecida por ser superabundante no tecido cutâneo fetal, permitindo uma cicatrização mais rápida e livre de cicatriz por sua capacidade de inibir a produção de fatores inflamatórios e ativar a função proliferativa de macrófagos e monócitos (126). Portanto, a emulsão contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta mostra um potencial anti-inflamatório interessante para o tratamento de feridas e para a preservação da saúde cutânea.

Estudos tem demonstrado o potencial anti-inflamatório da Rosa Mosqueta, tanto em relação aos frutos quanto ao óleo. Gonzáles-Mañán et al (2017) e Tapia et al (2018) encontraram resultados semelhantes ao nosso ao avaliar o impacto do óleo de Rosa Mosqueta como suplemento dietético no parâmetro inflamatório de camundongos, encontrando níveis de citocinas inflamatórias (TNF $\alpha$  e IL1) estáveis entre os grupos de animais suplementados e não suplementados. Por outro lado, quando os animais foram submetidos a dieta pró-inflamatória, a Rosa Mosqueta foi capaz de impedir a elevação dessas citocinas quando comparado aos animais não suplementados(33,127).

O óleo de Rosa Mosqueta possui uma série de constituintes com atividade anti-inflamatória, sendo a presença de tocoferóis, especialmente de  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol na proporção de 1:5, um dos fatores responsáveis pela atividade anti-inflamatória do óleo. Tapia e colaboradores (2018) demonstraram que a depleção dos níveis de tocoferóis no óleo reduz sensivelmente a proteção contra o potencial oxidativo em camundongos submetidos a dieta pró-inflamatória e suplementados com óleo de Rosa Mosqueta(127).

Além disso, o óleo de Rosa mosqueta é rico em ácido linoleico, cuja ação anti-inflamatória já foi observada em estudo in vitro. O ácido linoleico adicionado a cultura de macrófagos foi capaz de modular a ativação do fator nuclear kappa B (NF-KappaB), reduzindo a resposta inflamatória e a liberação de óxido nítrico(128,129).

## 2.3 CONCLUSÃO

Os resultados mostram a formação de uma emulsão cremosa consistente, que manteve suas características organolépticas estáveis ao longo do tempo de armazenamento mesmo sob estresse de temperatura. Características físicas como espalhabilidade e viscosidade inicial sofreram alguma variação, porém não o suficiente para alterar a qualidade e características da emulsão. Também se mostrou biologicamente estável, com um sistema conservante eficiente para eliminar as bactérias e fungo testados nesse trabalho, capaz de proteger a formulação contra contaminação externa durante a manipulação.

O tipo de envase em frasco airless conferiu alguma vantagem adicional na proteção dos componentes químicos do óleo, mas não interferiu em grande medida na estabilidade física das amostras. Como observado nos ensaios de atividade antioxidante, o processo de emulsificação com a adição de um antioxidante sintético foi eficaz para conferir proteção aos compostos orgânicos presentes no óleo, mantendo sua atividade biológica no período de armazenamento. Isso confere vantagem em relação ao uso do óleo puro, pois o meio dispersante atua como um envoltório de proteção contra a oxidação lipídica dos seus compostos químicos provocada pela luz, oxigênio ambiente e temperatura. Assim, o uso do óleo em emulsão permite que os componentes químicos sejam preservados, garantindo maior vida útil e ação local.

A emulsão desenvolvida nesse estudo não demonstrou potencial irritativo ou citotóxico para queratinócitos humanos, e ainda mostrou um potencial anti-inflamatório por estímulo à liberação de IL10.

Assim, a emulsão elaborada mostrou segurança para uso tópico e potencial para uso em afecções da pele ligadas a alterações inflamatórias e, desde que o processo inflamatório é parte inerente do processo de cicatrização, teorizamos que a emulsão seria mais eficaz para uso no tratamento de lesões cutâneas do que o óleo puro.

## **CAPÍTULO 3**

---

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOPARTICULADO COM ÓLEO DE ROSA  
MOSQUETA**

## 3 DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA NANOPARTICULADO COM ÓLEO DE ROSA MOSQUETA

---

### 3.1 MATERIAIS E MÉTODO

#### 3.1.1 Desenvolvimento das Microemulsões

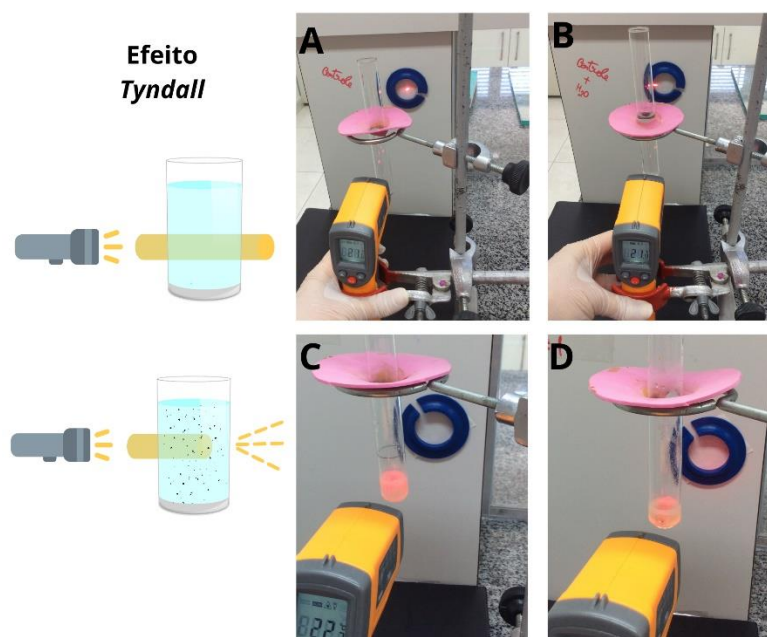
As microemulsões com óleo de Rosa Mosqueta foram elaboradas por método de baixa energia com inversão de fase catastrófica(85). Os insumos adquiridos foram: Polissorbato 80 (Neon Comercial, SP-Brasil); Glicerina vegetal bidestilada farmacêutica (glicerol) (USP); Propilenoglicol PA (Dinâmica LTDA, Brasil); Clorexidina aquosa 20% (Neon Comercial, Brasil); Óleo de Rosa Mosqueta (Farmácia Universitária, Universidade Federal de Goiás). A elaboração das microemulsões foi realizada em agitador magnético (Logen Scientific), as leituras de tamanho das gotículas e potencial Zeta foi realizada no equipamento ZetaSizer Nano Series (Z590 – Malvern), a condutivimetria avaliada em Condutivímetro Gehaka (CG 1800) e o pH avaliado com fitas M-Quant® (Supelco).

Para o desenvolvimento de microemulsões foi utilizado monooleato de polioxietilenossorbitan - polissorbato 80 (EHL=15,0)(78) como surfactante e testados dois coadjuvantes: glicerina vegetal e monoesterato de propilenoglicol. O meio oleoso foi constituído por óleo de Rosa Mosqueta (EHL=7,0) e o meio aquoso, constituído por solução aquosa de clorexidina a 0,1%.

O óleo e o cotensoativo (glicerina ou propilenoglicol) foram previamente misturados nas proporções 1:2 e 1:1 (óleo:cotensoativo) e mantidos em agitação mecânica por 30min para homogeneização. Para identificação dos pontos de microemulsão, nove béqueres numerados de 1 a 9 receberam um volume de surfactante (Tween 80), de 100µL até 900µL. Sob agitação mecânica constante, foi titulada a mistura de óleo e coatensoativo, em volume decrescente, de 900µL até 100µL em cada béquer, de forma que o volume final de cada béquer deveria somar 1mL. Após, cada béquer recebeu, em sequência, um volume de fase aquosa de 1mL a 9mL, titulados a cada 2min. em volumes de 1mL, ainda sob agitação mecânica constante de 1200rpm. Ao final, os béqueres numerados de 1 a 9 possuíam um total de 2 a 10 mL e pôde-se observar quais os volumes de tensoativos, fase oleosa e fase aquosa permitiam a formação das microemulsões (Apêndice A).



As características das misturas foram avaliadas visualmente quanto à homogeneidade, separação de fases, floculação, cremação, coloração e turbidez, sendo anotados em tabela de Excel. A confirmação da formação de microemulsão foi realizada por meio da avaliação da difusão da luz em sistemas coloidais (Efeito *Tyndall*) (Cf. Figura 37) e as microemulsões identificadas foram submetidas a teste de pH, condutivimetria e granulometria.



**Figura 37** Demonstração do efeito Tyndall (difusão da luz em sistemas coloidais). A - a luz não sofre difusão através do vidro vazio; B – refração da luz através do tubo de ensaio de vidro contendo água destilada; C – absorção da luz no tubo de ensaio de vidro contendo macroemulsão (sistema opaco); D – refração da luz no tubo de ensaio de vidro contendo microemulsão (translúcido). Imagem da própria autora.

Os pontos de microemulsão obtidos foram inseridos no programa OriginPro® 2016 e os dados normalizados para criação dos diagramas de fase pseudoternários.

### 3.1.2 Caracterização físico-química das microemulsões e avaliação de estabilidade

As microemulsões formadas foram analisadas em relação ao diâmetro hidrodinâmico de gotículas, índice de polidispersão de gotículas, pH e condutivimetria. Após, foram selecionadas 3 amostras com os melhores parâmetros

e diferentes porcentagens de óleo de Rosa Mosqueta, surfactantes e fase aquosa para avaliação de estabilidade física. As formulações foram mantidas em câmara climática por 7 dias ao abrigo da luz à 40°C e 35% de UR.

### 3.1.3 Avaliação de segurança e perfil inflamatório

Diferentes microemulsões contendo diferentes concentrações de fase aquosa e fase oleosa foram selecionadas para avaliação de segurança e do perfil inflamatório.

#### 3.1.3.1 Toxicidade Celular: ensaio de viabilidade in vitro

Foi utilizada a linhagem de queratinócitos HaCat de origem humana. As células foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura celular da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm<sup>2</sup>, TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

As células foram semeadas em placas de cultura após atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos (cerca de 10<sup>3</sup>). Inicialmente, o meio de cultura DMEM foi descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS). Logo após, as células foram incubadas com solução de tripsina EDTA (Gibco, USA) por 4 minutos a 37 °C. Adicionalmente, colocou-se meio DMEM às células para neutralizar a ação da tripsina e a suspensão foi centrifugada por 3 minutos a 300g. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* de células foi ressuscitado em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células foi usada para a contagem das células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

Os grupos experimentais foram divididos nos grupos teste, que recebiam as microemulsões com diferentes concentrações de óleo de Rosa Mosqueta e grupo

controle negativo (sem formulação). Os tratamentos foram realizados em quintuplicata.

As células foram transferidas para uma placa de cultura de 96 poços (3000 células/poço) e tratadas com variadas concentrações dos produtos, partindo-se de uma concentração de 1mg/mL e foram incubadas com os tratamentos por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura das placas foi removido e 150 µL de solução de uso de MTT (15 µL de MTT 5mg/mL diluídos em 135 µL de DMEM completo) foram adicionados.

Após 3 horas de incubação em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, o meio de cultura foi removido e uma alíquota de 200µL de DMSO foi adicionado em cada poço para dissolver o produto formado. A quantificação da viabilidade celular foi determinada após a leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm.

Foram executadas análises da repetibilidade dos dados pelo cálculo do Intervalo de Correlação Intraclasse a 95% e cálculos de IC<sub>50</sub> foram executados pela metodologia do ajuste à curva de dose resposta-sigmoidal.

### 3.1.3.2 Avaliação do perfil anti-inflamatório por múltiplas citocinas

Foi utilizada a linhagem de macrófagos murinos RAW 264.7. As células foram estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Cultura celular da Universidade de Brasília e, conforme necessário, descongeladas uma semana antes do ensaio, e aclimadas em um frasco para cultivo (25 cm<sup>2</sup>, TPP, EUA) contendo meio de cultura DMEM (Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium) suplementado com 1% de solução antibiótica (penicilina e estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (SFB), e mantido em incubadora úmida a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Após as células atingirem confluência ideal (cerca de 1000.000) para os experimentos (cerca de 10<sup>3</sup>), elas eram removidas dos frascos e semeadas em placas de cultura. Inicialmente, o meio de cultura DMEM era descartado e as células lavadas com uma solução tampão de fosfato-salina (PBS), e descartadas por meio de raspagem com suporte plástico (cell Scraper- corning Glass Workers, New York, USA. Esta suspensão era centrifugada por 3 minutos a 300 g. Após a centrifugação, o sobrenadante era removido e o *pellet* de células era ressuspensionado em meio DMEM (1 a 3 mL). Em seguida, uma alíquota da suspensão de células era usada para contagem de células em câmara de Neubauer utilizando-se o método de

exclusão por azul de Tripán (Sigma) para distinção de células viáveis e não viáveis.

Assim, as células foram então colocadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de 50000 células/poço e incubadas por 12h no meio DMEM a 37°C, na atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

A soluções aquosa das microemulsões avaliadas, na concentração de 1g/L foram armazenadas em tubos Falcon de 15 mL e acondicionadas na geladeira (8°C). Essa solução foi produzida conforme a necessidade do uso nos ensaios de ELISA. A partir da solução estoque foram então realizadas diluições seriadas para obtenção da concentração selecionada para o tratamento das células (25 µg/mL, escolhido conforme ensaio de viabilidade celular).

Assim, o experimento para atividade anti-inflamatória (dosagem de citocinas) iniciou com a semeadura das células em placas de 96 poços (TPP) contendo 3x10<sup>3</sup> células/poço cultivadas em DMEM. Adicionou-se os 25 µg/mL de solução aquosa com Naringenina(NA) ou Naringenina complexada com Hidroxipropil-beta-ciclodextrina (NAHP) ou micropartículas de Naringenina (NAMP) nas diferentes placas, e o controle negativo ficou caracterizado como as células sem tratamento. Após 2h de contato dos produtos com as células, as amostras foram estimuladas com endotoxina bactéria (LPS) de *Escherichia coli* (Lipopolysaccharide B from *Escherichia coli* O111:B4- Sigma, MO, USA) , na concentração de 2 µg/mL. As amostras foram incubadas por 24h, conforme descrito anteriormente. Após os períodos de tratamento das células com as suspensões descartou-se o meio e foi congelado a -20°C. A concentração da citocina TNF-alfa (ThermoFisher) liberada no sobrenadante das culturas foi avaliada por ELISA. As doses mínimas detectáveis foram determinadas conforme a especificação do fabricante de 3,7 pg/mL. As medições de todas as citocinas resultaram em coeficientes médios intra-ensaio de variação abaixo de 5%.

### 3.1.4 Estudo microbiológico

As microemulsões com a maior porcentagem de óleo e que apresentaram os melhores resultados no teste do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão (PDI) de gotículas foram submetidas a teste microbiológico para avaliar a qualidade do processo de formulação e do sistema conservante, além do potencial antimicrobiano das microemulsões contra *Staphylococcus aureus* e *Candida crusei*.

### 3.1.4.1 Teste microbiológico

Os testes microbiológicos das microemulsões foram realizados segundo as orientações da Farmacopeia Brasileira (2019)(92) para produtos não estéreis com o objetivo de avaliar a qualidade e o controle de fabricação previstos nas boas práticas de forma a atender os parâmetros dos limites aceitáveis para microrganismos neste tipo de formulação. As microemulsões selecionadas, juntamente com amostras do óleo puro, foram submetidas a testes de contagem total microbiana para fungos e bactérias e testes do desafio do sistema conservante.

Foram adquiridos meios de cultivo Peptona bacteriológica (Kasvi, Espanha), Plate Count Agar (Agar PCA da Himedia, Índia), Agar Base Dermasel da Oxoid (Inglaterra), Caldo Lúria Bertani (Lennox, USA) e Tween 80 (Isofar, Brasil).

Para a avaliação da contagem total microbiana, alíquotas de 5g de cada formulação foram mantidas sob agitação mecânica em 45mL de água peptonada 0,1% até dissolução da amostra. Placas contendo meios de cultura específicos para bactérias (Agar PCA) e fungos (Hagar Base Dermasel) receberam alíquotas de 0,1mL das amostras, em triplicata. As placas para bactérias foram armazenadas em estufa a 35°C por 5 dias e as placas para fungos foram armazenadas em temperatura ambiente por 7 dias. Ao final, foi realizada a contagem do número de colônias observadas.

### 3.1.4.2 Avaliação do potencial antimicrobiano

#### 3.1.4.2.1 Preparo dos inóculos microbianos

Os inóculos foram preparados através de suspensão direta do crescimento microbiano em caldo Luria Bertani (caldo LB) com turvação equivalente a 0,5 da escala de Mc Farland ( $1,0 \times 10^8$  UFC/mL) sendo ajustada entre  $0,08 \pm 0,01$  de densidade óptica a 625 nm em espectrofotômetro. Foram utilizados os seguintes microrganismos: 1) bactéria Gram-positiva (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Cutibacterium acnes*), 2) bactéria Gram-negativa (*Escherichia coli* ATCC 25922), e 3) levedura (*Candida krusei* ATCC 6258).

#### *3.1.4.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) pelo método de diluição em caldo*

O método de diluição em caldo foi realizado utilizando protocolo recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (130). De acordo com a CLSI (1999)(131) a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%. Foram realizadas diluições em caldo LB dos inóculos microbianos na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland na ordem de 1:150 (100  $\mu$ L ou 0,1 mL do inóculo em 15 mL de caldo LB), resultando em uma concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/mL.

Os produtos a serem testados foram diluídos em caldo LB em diferentes concentrações. Então, adicionou-se em microtubos 0,1 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/mL e 0,1 mL das diferentes concentrações dos produtos a serem testados, resultando em uma concentração final de bactérias de  $5,0 \cdot 10^5$  UFC/mL. Como controle positivo (com crescimento das bactérias) foi utilizado 0,1 mL do inóculo na concentração de  $1,0 \cdot 10^6$  UFC/mL e 0,1 mL de caldo LB. Como controle negativo (inibição do crescimento das bactérias) foi utilizado 0,1 mL de caldo LB e 0,1 mL do produto a ser testado. Os testes foram realizados em triplicata. Os microtubos foram incubados a 37°C por 18 horas e então as diluições foram plaqueadas em ágar Padrão para Contagem (ágar PCA) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A CBM foi determinada na menor concentração dos produtos a serem testados onde não foram observadas colônias nas placas.

#### **3.1.5 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 20.0 for Windows®. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças de medianas foram examinadas por meio de testes não paramétricos, enquanto as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. A análise da confiabilidade foi avaliada por meio dos Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI)(Koo; Li, 2016). Os programas estatísticos utilizados foram o SPSS versão 22.0

e o GraphPad Prism versão 6.0. O nível de significância adotado foi de 5%. Os resultados foram apresentados em tabelas e figuras criadas no Excel®.

## 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.2.1 Elaboração das microemulsões e diagrama de fases

Os pontos de microemulsão conforme a proporção de fase aquosa, fase oleosa e tensoativos estão demonstrados na Figura 38 abaixo.

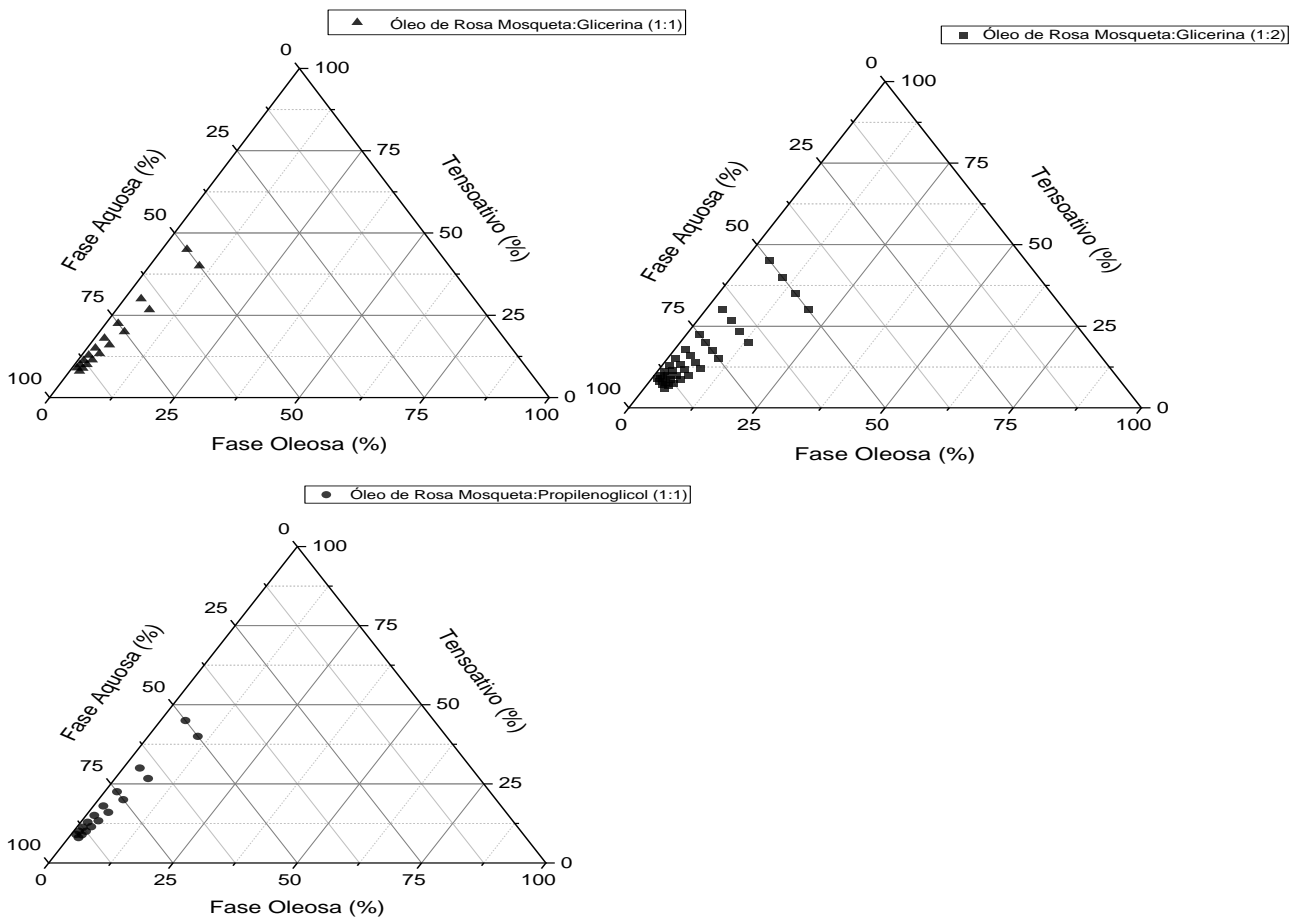
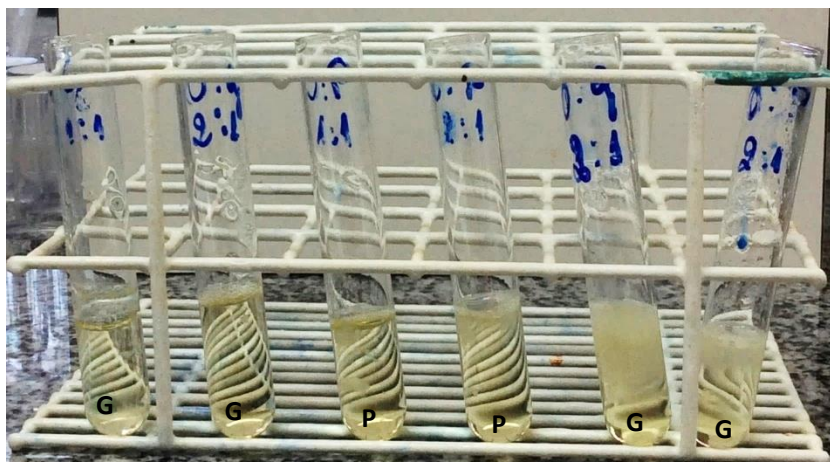


Figura 38 Diagrama de fase pseudoternário das microemulsões obtidas a partir de dois coadjuvantes diferentes em diferentes proporções. Fonte: Imagem da própria autora.

As microemulsões elaboradas, seja com glicerina ou propilenoglicol, apresentaram aspecto viscoso, transparente e homogêneo, de cor amarelada (Cf. Figura 39).



**Figura 39** Aspecto das microemulsões elaboradas com diferentes proporções de óleo de Rosa Mosqueta, glicerina ou propilenoglicol, Tween 80 e fase aquosa de solução de clorexidina 0,1%. \*G= Glicerina, P= Propilenoglicol. Fonte: Imagem da própria autora.

A escolha do Tween 80 como tensoativo levou em consideração sua característica não iônica, conferindo-lhe baixa toxicidade(79), seu alto EHL, cuja maior hidrofília facilita a formação de microemulsões óleo em água(78), em acordo com o objetivo inicial deste estudo, e a facilidade de obtenção e baixo custo.

O uso de um cotensoativo de baixo EHL, como a glicerina e o propilenoglicol, por outro lado, facilitam a formação e estabilização das micelas de óleo no sistema e, ao equilibrar o alto EHL do tensoativo, permitem a formação de um sistema tensoativo mais equivalente ao EHL do próprio óleo que se quer incorporar em microemulsão(77,78,80)

A glicerina, enquanto cotensoativo, foi mais eficaz que o propilenoglicol para a formação de microemulsões com melhor parâmetro de estabilidade, indicado pelo menor tamanho das partículas, menor polidispersão com a incorporação da maior quantidade de óleo possível. A glicerina e o propilenoglicol são compostos orgânicos da classe dos álcoois com estrutura química muito semelhante. O que diferencia esses dois compostos, é a presença de dois grupos hidroxila na molécula do propilenoglicol, enquanto a glicerina apresenta três grupos hidroxila(132). Por esse motivo, a glicerina mostrou-se mais eficiente em solubilizar o óleo de Rosa mosqueta no meio aquoso(77), formando microemulsões com melhores parâmetros físicos.

A vantagem da glicerina sobre o propilenoglicol é sua menor toxicidade, sua ação antibacteriana e sua função umectante e emoliente, auxiliando na retenção de



água no meio(132–135), promovendo a hidratação cutânea, manutenção da função de barreira da pele e auxiliando na cicatrização(132,134).

As microemulsões foram formadas principalmente com uma maior porcentagem de surfactante em comparação à fase oleosa(82), na qual a incorporação de água ao sistema não parece ter ocasionado grande instabilidade. O uso da glicerina, principalmente em maior proporção, garantiu a formação de microemulsões em maior frequência conforme observado no diagrama de fase pseudoternário e a incorporação de uma maior porcentagem de óleo (até 5%), conforme observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de pH, diâmetro das gotículas, índice de polidispersão e condutividade das microemulsões formadas utilizando glicerina como coadjuvante. Universidade de Brasília, 2021

Proporção após titulação (%)					pH	Diâmetro das gotículas (nm)	PDI (nm)	Condutividade (μS/cm)
O	T	A	ORM	Gli				
5,00	45,00	50,00	1,25*	3,75	4,5	18,89*	0,337	90,8
3,33	30,00	66,67	0,83	2,50	4,5	1039	0,61	75,8
2,50	22,50	75,00	0,63	1,88	4,5	27,97	0,67	87,6
2,00	18,00	80,00	0,50	1,50	4,5	116,1	1	81,5
1,67	15,00	83,33	0,42	1,25	4,5	248,2	0,833	84,8
1,43	12,86	85,71	0,36	1,07	4,5	137,6	1	82,7
1,25	11,25	87,50	0,31	0,94	4,5	102,7	1	78,5
1,11	10,00	88,89	0,28	0,83	4,5	246,5	0,919	77,6
1,00	9,00	90,00	0,25	0,75	4,5	282,9	1	69,7
10,00	40,00	50,00	2,50*	7,50	4,5	12,22*	0,178*	39,4
6,67	26,67	66,67	1,67	5,00	4,5	26,51	0,633	72,9
5,00	20,00	75,00	1,25*	3,75	4,5	12,13*	0,179*	93,1
4,00	16,00	80,00	1,00	3,00	4,5	232,5	0,455	77,2
3,33	13,33	83,33	0,83*	2,50	4,5	11,18*	0,209*	84,8
2,86	11,43	85,71	0,71*	2,14	4,5	28,21*	0,334*	77,5
2,50	10,00	87,50	0,63	1,88	4	20,16	0,476	93,9
2,22	8,89	88,89	0,56	1,67	4	343,6	0,577	79,5
2,00	8,00	90,00	0,50	1,50	5	75,01	0,289	79,5
15	35	50	3,75	11,25	5	222,7	0,491	51,5
10	23,33	66,66	2,5	7,5	5	21,64	0,502	67
7,5	17,5	75	1,875	5,625	4,5	31,02	0,913	81,2
6	14	80	1,5	4,5	4,5	97,16	1	82,4
5	11,66	83,33	1,25	3,75	4,5	429,7	0,767	72,2
4,28	10	85,71	1,07	3,21	4,5	26,3	0,811	82,8
3,75	8,75	87,5	0,9375	2,8125	4,5	19,03	0,56	70,7
3,33	7,77	88,88	0,833	2,5	4,5	414,2	0,715	72,5
3	7	90	0,75	2,25	4,5	87,81	0,429	63,7

(conclusão, parte 2 de 2)

Proporção após titulação (%)			Proporção ORM:Gli (%)		pH	Diâmetro das gotículas (nm)	PDI (nm)	Condutividade (µS/cm)
O	T	A	ORM	Gli				
20	30	50	5	15	5	30,74	0,43	54,8
13,33	20	66,66	3,33	10	5	21,02	0,417	66,7
10	15	75	2,5	7,5	4,5	416,7	0,677	68
8	12	80	2	6	4,5	410,2	0,628	66,6
6,66	10	83,33	1,66	5	4,5	133,6	0,389	64
5,00	45,00	50,00	2,50	2,50	4,5	212	0,19	72,9
3,33	30,00	66,67	1,67	1,67	4,5	1092	1	63,4
2,50	22,50	75,00	1,25	1,25	4,5	431,2	0,834	59,8
2,00	18,00	80,00	1,00	1,00	4,5	359,3	0,714	60,1
1,67	15,00	83,33	0,83	0,83	4,5	38,61	0,856	49,2
1,43	12,86	85,71	0,71	0,71	5	136,7	0,707	77
1,25	11,25	87,50	0,63	0,63	4,5	616,3	0,521	81,7
1,11	10,00	88,89	0,56	0,56	4,5	551,3	0,392	80
1,00	9,00	90,00	0,50	0,50	4,5	334,8	0,87	89,7
10,00	40,00	50,00	5,00	5,00	4,5	34,95	0,784	76,8
6,67	26,67	66,67	3,33	3,33	4,5	123,7	0,801	73,5
5,00	20,00	75,00	2,50	2,50	4,5	313	0,81	77,5
4,00	16,00	80,00	2,00	2,00	4,5	335,8	0,821	70,5
3,33	13,33	83,33	1,67	1,67	4,5	321,2	0,63	39,4
2,86	11,43	85,71	1,43	1,43	5	18190	0,364	78,2
2,50	10,00	87,50	1,25	1,25	4,5	13,91*	0,201*	83,2
2,22	8,89	88,89	1,11	1,11	4,5	413	0,436	91,8
2,00	8,00	90,00	1,00	1,00	4,5	669	0,938	83,6
5,00	45,00	50,00	2,50	2,50	4,5	338	0,647	83,9
3,33	30,00	66,67	1,67	1,67	4,5	124,4	0,433	82,2
2,50	22,50	75,00	1,25	1,25	4,5	111,8	0,839	82,4
2,00	18,00	80,00	1,00	1,00	4,5	29,51	0,579	82,3

O = fase oleosa; T = tensoativo; A = fase aquosa; PDI = índice de polidispersão de gotículas; nm = nanômetro; µS/cm = microsiemens por centímetro. \*indica microemulsões com partículas menores que 90nm e PDI<0,4.

Já as microemulsões elaboradas com propilenoglicol incluem uma menor faixa de concentrações possíveis e permitiu a incorporação de um máximo de 2,5% de óleo de Rosa Mosqueta. Ademais, os resultados da Tabela 6 mostram que poucos pontos de microemulsão atendem aos critérios de qualidade com base no tamanho das partículas e índice de polidispersão.

Tabela 6 - Resultados de pH, diâmetro das gotículas, índice de polidispersão e condutividade das microemulsões formadas utilizando Propilenoglicol como coadjuvante. Universidade de Brasília, 2021

Proporção após titulação (%)			Proporção ORM:Propil (%)		pH	Diâmetro das gotículas (nm)	PDI (nm)	Condutividade (µS/cm)
O	T	A	ORM	Propil				
5,00	45,00	50,00	2,5*	3,75	4,5	11,1*	0,234*	54,7
3,33	30,00	66,67	0,83	2,50	4,5	39,23	0,738	67,1
2,50	22,50	75,00	0,63	1,88	4,5	43,95	0,936	79,1
2,00	18,00	80,00	0,50	1,50	5	40,1	1	86,6
1,67	15,00	83,33	0,42	1,25	4,5	228,2	0,59	80,6
1,43	12,86	85,71	0,36	1,07	4,5	167,8	0,601	95
1,25	11,25	87,50	0,31	0,94	4,5	147,6	1	75,6
1,11	10,00	88,89	0,28	0,83	4,5	55,75	1	73,6
1,00	9,00	90,00	0,25	0,75	4,5	171,6	1	67,5
10,00	40,00	50,00	2,50	7,50	5	547,4	0,557	
6,67	26,67	66,67	1,67	5,00	5	246,4	0,681	72,1
5,00	20,00	75,00	1,25	3,75	4,5	633,2	0,569	78,5
4,00	16,00	80,00	1,00	3,00	4,5	231,3	0,499	83,7
3,33	13,33	83,33	0,83	2,50	4,5	17,38	0,495	92,9
2,86	11,43	85,71	0,71	2,14	4,5	246,2	0,549	83,6
2,50	10,00	87,50	0,63	1,88	4,5	425,9	0,797	83,1
2,22	8,89	88,89	0,56	1,67	4,5	80,39	0,303	68,5
2,00	8,00	90,00	0,50	1,50	6	222,4	0,416	118,7

O = fase oleosa; T = tensoativo; A = fase aquosa; PDI = índice de polidispersão de gotículas; nm = nanômetro; µS/cm = microsiemens por centímetro. \*indica microemulsões com partículas menores que 90nm e PDI<0,4.

A avaliação da qualidade de microemulsões deve levar em consideração o tamanho das partículas e sua dispersão no meio, o pH e a condutividade.

O tamanho das partículas de uma microemulsão prevê seu grau de estabilidade e pode ser avaliada por diversos métodos, podendo ser utilizado o raio, média Z, peso médio, superfície média, ou volume médio(82).

A questão é que, uma microemulsão será mais estável quanto menor o tamanho das partículas, pois menor será a energia livre contida no sistema. A literatura não é clara sobre o ponto de corte relativo ao tamanho das partículas dispersas em uma microemulsão, mas McClements e colaboradores (2012) mostraram que a estabilidade do sistema coloidal em relação à separação gravitacional (cremeação ou sedimentação) aumenta consideravelmente quando o raio das partículas atinge valores abaixo de 90nm (82).

Neste estudo, escolhemos como método para avaliar o tamanho das partículas, o diâmetro hidrodinâmico através da técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS). A técnica de DLS, que consiste na análise das flutuações de intensidade da luz espalhada em um determinado ângulo, fornece informações sobre o movimento Browniano das partículas, levando a flutuações na intensidade da luz. Levando-se em consideração o movimento Browniano, quanto mais rápido o movimento das partículas, menor o seu diâmetro e vice-versa(136,137). Esse tipo de técnica fornece uma análise da média do raio das partículas. Assim, outro parâmetro que pode auxiliar na avaliação da qualidade e estabilidade de uma microemulsão corresponde ao Índice de Polidispersão (PDI), o qual indica o quanto as partículas diferem de tamanho umas das outras. Quanto menor o índice, menor e heterogeneidade das partículas e, portanto, mais fidedigno é o raio médio das partículas no sistema(136).

Já a condutividade elétrica é um parâmetro importante para identificar a fase dispersante no sistema. Geralmente, esperam-se baixos valores de condutividade para microemulsões em que a fase dispersante é oleosa e valores maiores quando a fase dispersante é aquosa, visto que óleos são pobres condutores de elétrons(138).

Guimarães e Nóbrega (2020) observaram condutividade em microemulsões água em óleo na faixa de  $7\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $250\mu\text{S}/\text{cm}$ , a depender do tipo de tensoativo e fase oleosa utilizados, cujos valores foram inversamente proporcionais à massa de água adicionada ao sistema(138).

As microemulsões desenvolvidas neste trabalho apresentaram condutividade elétrica variando de  $39,9\mu\text{S}/\text{cm}$  a  $118,1\mu\text{S}/\text{cm}$ , sendo o menor valor encontrado em microemulsões com maior porcentagem de óleo. Ainda assim, as microemulsões desenvolvidas foram do tipo O/W ou bifásicas, com um conteúdo aquoso mínimo de 50%.

Outro parâmetro analisado, o potencial Zeta, indica o potencial eletrostático da dupla camada que recobre a micropartícula em uma microemulsão. Partículas com potencial Zeta entre  $+10\text{mV}$  e  $-10\text{mV}$  são consideradas neutras, enquanto valores maiores que  $+30\text{mV}$  e menores que  $-30\text{mV}$  são consideradas fortemente catiônicas ou aniônicas respectivamente. No geral, quanto maior ou menor esses valores, maior a força de manutenção das partículas e mais estável a emulsão. Contudo, esses valores são dependentes do pH e da condutividade do meio dispersante(139). Neste estudo, todas as microemulsões mantiveram um potencial

Zeta próximo a zero, devido ao uso de surfactantes não iônicos, mais compatíveis com o uso na pele por apresentar menor reatividade e irritabilidade. Há ainda que observar que as partículas das microemulsões continham apenas óleo, cuja carga eletrostática é semelhante ao do próprio tensoativo.

Microemulsões O/W geralmente exigem uma fração maior de tensoativos, já que, ao empregar energia térmica ou cinética, o óleo adicionado será completamente incorporado em micelas. Concomitantemente, a biodisponibilidade do componente hidrofílico aumenta devido à maior área de contato e solubilidade das partículas no componente aquoso(82). Essa característica torna-se interessante para elaboração de produtos de aplicação cutânea, já que o óleo vegetal terá a função de restauração da barreira de proteção da pele enquanto o conteúdo aquoso terá ação de aumentar a hidratação cutânea a partir da função umectante da glicerina(135,140,141).

Com os resultados obtidos, selecionamos cinco microemulsões com diferentes concentrações de fase aquosa e fase oleosa para serem submetidas a teste de viabilidade celular e perfil inflamatório. As microemulsões selecionadas são descritas no quadro 5 abaixo:

Quadro 5 - Descrição das microemulsões selecionadas para os testes de viabilidade celular e perfil inflamatório. Laboratório de Tecnologias, Universidade de Brasília, 2021

	Proporção Óleo/ cotensoativo	Fase Oleosa (mL)	Tween 80 (mL)	Fase Aquosa (mL)	% Óleo de Rosa Mosqueta	Diâmetro hidrodinâ mico	PDI*	Condut ( $\mu$ S/cm)	Formul ação
<b>Glicerina</b>	1:2	2	8	10	2,5	12,22	0,178	39,4	A
	1:2	2	8	30	1,25	12,13	0,179	93,1	B
	1:2	4	6	10	5	30,74	0,43	54,8	C
	1:1	2	8	30	2,5	13,91	0,201	82,9	D
<b>Propil</b>	1:2	2	8	10	2,5	11,1	0,234	55,8	E

\*PDI = Índice de polidispersão

### 3.2.2 Avaliação de viabilidade celular e perfil inflamatório

A partir do ensaio de viabilidade celular pela técnica de redução do MTT, verificou-se que as microemulsões testadas não apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem HaCat com resultado que não difere estatisticamente do controle negativo, conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados da viabilidade celular na linhagem de queratinócitos HaCat. Universidade de Brasília, 2022

	A	B	C	D	E	Controle Negativo
*IC50 (µg/ml)	5793	6396	5732	6743	6234	5879
IC	3858-7635	4672-8534	3745-7324	4245-8634	4235-8453	3734-8432

\*IC50= concentração do composto necessária para 50% de viabilidade; IC = Intervalo de Confiança

Da mesma forma que a emulsão, as microemulsões atenderam aos critérios estabelecidos pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) para novos produtos, de  $IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$  no ensaio preliminar para serem consideradas inócuas ao ser humano (Abdel-Hameed *et al.*, 2012).

Quanto à avaliação do perfil inflamatório, a Figura 40 mostra as diferenças dos níveis da citocina TNF alfa em células tratadas com solução aquosa das microemulsões e controle negativo – células cultivadas no meio sem o tratamento (Controle -), mostrando que as microemulsões não causaram aumento da referida citocina quando comparado ao controle negativo.

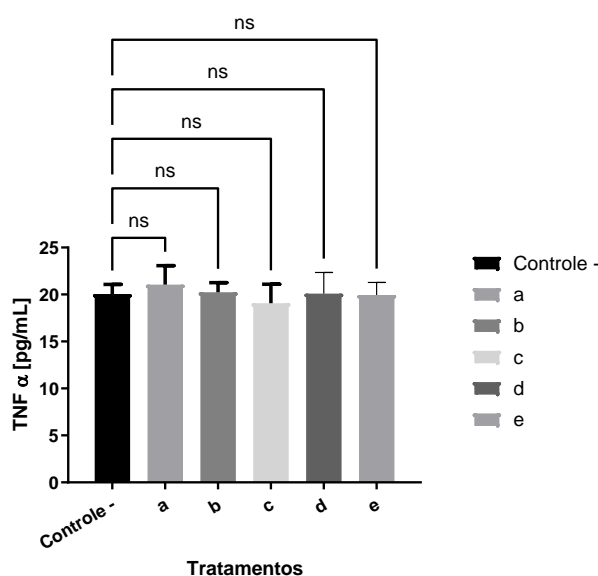


Figura 40 Níveis de produção da citocina TNF alfa em sobrenadantes da linhagem celular RAW 264.7 tratadas ou não com as formulações ( $P > 0.05$ , ANOVA). Fonte: Imagem da própria autora.

A citocina Fator de Necrose Tumoral (TNF) alfa é produzida pelos queratinócitos do estrato córneo e é essencial para a imunidade da pele, ativando e recrutando células imunes(6). Em situações específicas, a super expressão dessa

citocina gera uma condição pró inflamatória que leva à descamação, prurido e descontinuidade do estrato córneo. Os resultados mostram que as microemulsões testadas não provocaram aumento da citocina TNF alfa, e, portanto, não causam estímulo inflamatório, reduzindo seu potencial alérgico.

### 3.2.3 Avaliação de Estabilidade de 7 dias

Em tese, microemulsões são sistemas termodinamicamente estáveis a menos que algumas condições sofram alterações, como pH, temperatura ou adição de novos componentes químicos(82). Assim, foi realizada avaliação de estabilidade de curta duração para verificar se a composição do sistema seria suficiente para manter sua estrutura, conservadas as condições químicas iniciais, porém sob estresse térmico e em baixa umidade.

Para avaliação de estabilidade foram escolhidas apenas as microemulsões formuladas com glicerina, já que forneceram amostras com menor raio hidrodinâmico e polidispersão e com maior proporção de óleo de Rosa Mosqueta. As três amostras com diferentes proporções de óleo, glicerina e fase aquosa foram recém-elaboradas e apresentaram as seguintes características conforme descrito no Quadro 6:

Quadro 6 - Descrição das microemulsões selecionadas para teste de estabilidade. Universidade de Brasília, 2023

Óleo de Rosa Mosqueta: Glicerina	Amostra	Fase Oleosa (mL)	Tensoativo (mL)	Fase Aquosa (mL)	% Óleo de Rosa Mosqueta	Diâmetro hidrodinâmico	PDI*	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
<b>1:2</b>	A	2	8	10	2,5	12,66	0,053	390
	B	2	8	30	1,25	13,37	0,203	389
<b>1:1</b>	C	2	8	30	2,5	185,2	0,356	304

\*PDI = Índice de polidispersão

A Figura 41 mostra a evolução do diâmetro hidrodinâmico das gotículas e do PDI das amostras ao longo dos sete dias de armazenamento. Embora seja possível verificar um aumento estatisticamente significativo no PDI da amostra A, o mesmo não ocorreu em relação ao tamanho hidrodinâmico das gotículas. A amostra C mostrou um tamanho hidrodinâmico das gotículas e PDI significativamente maior que as outras duas amostras.

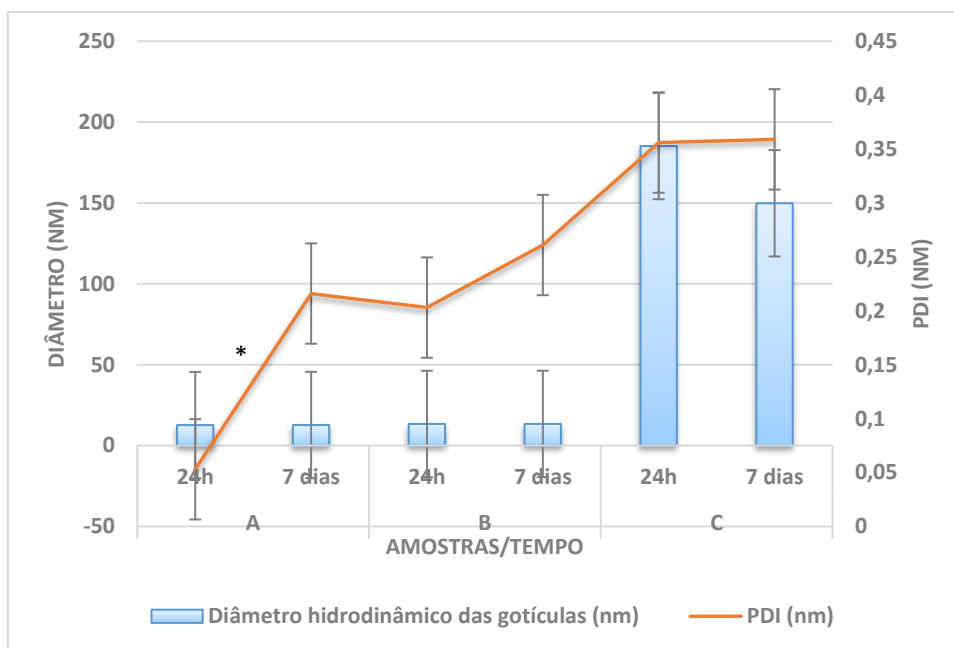


Figura 41 Avaliação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersão (PDI) das gotículas de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. \*Diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), Anova Two-Way com pós-teste de Benjamini, Krieger e Yekutieli. Fonte: Imagem da própria autora.

Todas as amostras analisadas mantiveram um pH dentro da faixa adequada para pele (4,5-5,5) conforme observado na Figura 42. Nas amostras A e B foi observado aumento do pH ao longo dos dias de armazenamento, porém sem significância estatística.

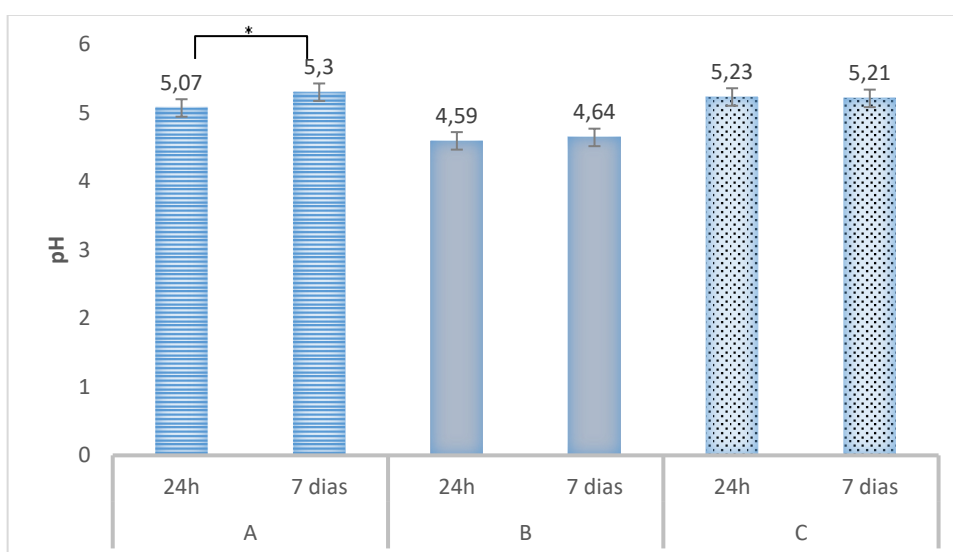


Figura 42 Avaliação do potencial hidrogeniônico de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. \*Indica diferença significativa. Anova Two-Way com pós-teste de Sidak para múltiplas comparações,  $p > 0,05$ . Fonte: Imagem da própria autora.



Em relação à condutividade, foi observada redução em todas as amostras, também sem significância estatística conforme observado na Figura 43 abaixo.

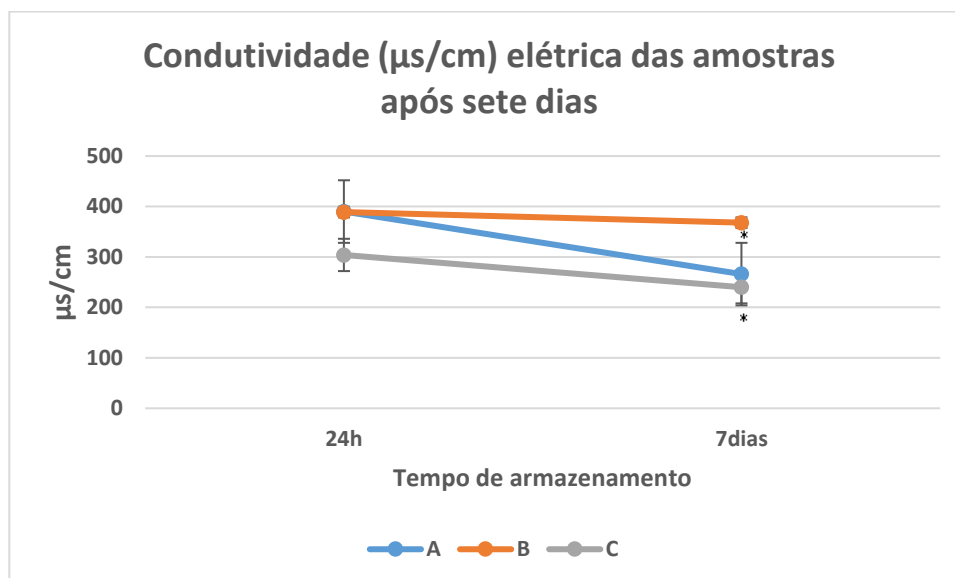


Figura 43 Avaliação da condutividade elétrica de cada amostra ao longo do tempo de armazenamento. \*Indica diferença significativa. Anova Two-Way com pós-teste de Sidak para múltiplas comparações,  $p > 0,05$ . Fonte: Imagem da própria autora.

Deve-se levar em conta a relação da condutividade com a permissividade do meio e o tamanho das partículas dispersas. A condutividade é inversamente proporcional ao raio das partículas e aumenta à medida que a proporção de água no meio aumenta (84). Portanto, a variação da condutividade ao longo do tempo oferece pistas sobre a estabilidade do sistema, visto que mudanças drásticas podem indicar coalescência ou degradação das partículas.

A elevação do pH e redução da condutividade elétrica podem estar relacionadas à perda de água ao longo do tempo, reduzindo a liberação de elétrons  $H^+$  nas amostras. Ainda assim, as amostras se mantiveram dentro dos parâmetros físico-químicos aceitáveis para microemulsões, especialmente quanto ao diâmetro hidrodinâmico das gotículas e PDI, não sendo observado alterações macroscópicas.

#### 2.3.4 Avaliação microbiológica e potencial antimicrobiano

A qualidade microbiológica das três microemulsões selecionadas mostrou-se dentro dos limites estabelecidos pela RDC nº630 de 16 de março de 2022, pois não

houve crescimento bacteriano ou fúngico nas placas de cultura durante os testes microbiológicos.

Quanto à atividade antimicrobiana, o óleo de Rosa Mosqueta puro não apresentou ação contra as cepas testadas, conforme observado na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações Bactericidas Mínimas (CBM) das microemulsões com óleo de Rosa Mosqueta e do óleo puro. Universidade de Brasília, 2022

Cepas testadas	CBM (g/mL)			Óleo
	A 2,5%	B 1,25%	C 2,5%	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	N	1,00	0,50	N
<i>E. coli</i> ATCC 25922	< 0,20	0,35	< 0,20	N
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	< 0,20	< 0,20	< 0,20	N
<i>C. acnes</i> ATCC 1969	N	N	0,70	N

CBM: Concentração bactericida mínima; N = ausência de atividade antimicrobiana.

Contudo, as microemulsões com maior concentração de óleo e fase aquosa foram mais eficientes no controle microbiano das cepas testadas, especialmente na inibição do crescimento de *C. acnes*, conforme Tabela 9.

Tabela 9 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) das microemulsões de óleo de Rosa Mosqueta para *C. acnes*. Universidade de Brasília, 2022

Cepas testadas	CIM (g/mL)			Óleo
	A 2,5%	B 1,25%	C 2,5%	
<i>C. acnes</i> ATCC 1969	0,7	<0,5	<0,5	N

CIM: Concentração Inibitória Mínima; N = ausência de atividade bacteriostática.

A atividade bacteriana da Rosa Mosqueta tem sido demonstrada na literatura a partir do extrato do fruto, especialmente contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella penumonie* (142,143). Quanto ao óleo, não foi encontrada informação na literatura que indique ação antimicrobiana. Nossos experimentos demonstraram que o óleo não possui ação contra microrganismos e a ação antimicrobiana das microemulsões provavelmente deve-se ao uso de clorexidina como conservante na fase aquosa. Essa interpretação é reforçada ao

observar que as microemulsões que obtiveram melhor resultado antimicrobiano foram as que possuem maior fração de fase aquosa.

### 3.3 CONCLUSÃO

A glicerina foi mais eficiente no desenvolvimento de microemulsões óleo em água quando comparado ao propilenoglicol. Foi possível o desenvolvimento de uma microemulsão contendo até 5% de óleo de Rosa Mosqueta utilizando Tween 80 como tensoativo e glicerina como cotensoativo. Essa combinação mostrou-se mais eficiente na formação de microemulsões água em óleo com menor tamanho de partículas e menor índice de polidispersão. As microemulsões elaboradas se mantiveram dentro da faixa de pH requerida para uso cutâneo (4,5 – 5,5) sem a necessidade de adição de outros componentes.

As microemulsões com os melhores parâmetros de tamanho das partículas e do índice de polidispersão mantiveram-se estáveis por pelo menos 7 dias sob alta temperatura e baixa umidade. As três microemulsões analisadas possuíam diferentes porcentagens de óleo de rosa mosqueta (1,25% e 2,5%), glicerina e fase aquosa. Apesar das variações observadas nas microemulsões durante o período de armazenamento, os parâmetros mantiveram-se dentro das faixas esperadas, com exceção do tamanho das partículas na microemulsão C (2,5% de óleo de Rosa mosqueta e 30% de água)

Quanto ao potencial antimicrobiano, o estudo demonstrou que o óleo de Rosa Mosqueta não possui ação antimicrobiana ou bacteriostática. Por outro lado, a composição da microemulsão demonstrou ter ação antimicrobiana, provavelmente, devido ao uso da clorexidina como conservante na fase aquosa.

A partir desses resultados, elencamos, para os estudos de permeação e cicatrização, a microemulsão A (2,5% de óleo de Rosa Mosqueta), por ter a maior proporção de óleo e por ter mantido os melhores parâmetros no teste de estabilidade de curta duração.

## **CAPÍTULO 4**

---

**ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS**

## 4. ESTUDO DE PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA PURO E INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS

---

### 4.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.1.1 Materiais

Foi adquirido da Êxodo Científica, etanol PA, metanol PA, hidróxido de sódio lentilhas PA, ácido clorídrico PA, éter de petróleo PA, acetonitrila grau HPLC, metanol grau HPL, n-Hexano grau HPLC e ácido acético glacial grau HPLC. Padrão de ácido linoleico com mais de 99% de pureza foi adquirida da Sigma Aldrich Brasil LTDA. Tape Strip foi adquirido de Clinical and Derm®.

#### 4.1.2 Escolha do analito

A permeação e retenção do óleo de Rosa mosqueta foi investigada em método *in vitro* por meio de análise em HPLC. Esse método foi selecionado por já ter sido citado na literatura, exigir menor manuseio das amostras, incorrendo em menor faixa de erro, ser um método mais rápido e exigir menos insumos. Para as análises, selecionamos como analito de interesse o ácido linoleico, visto ser o constituinte de maior concentração no óleo de Rosa mosqueta e ainda por sua função no processo de cicatrização e na manutenção da barreira de proteção da pele.

O óleo de Rosa mosqueta utilizado na elaboração das formulações descritas neste trabalho foi submetido à leitura em HPLC conforme os procedimentos descritos a seguir para avaliação da concentração média de ácido linoleico no óleo. Essa concentração média foi utilizada para identificação da massa de ácido linoleico aplicada conforme a **Equação 8**:

**Equação 8:**  $Conc_t = (M_{rm} * Conc_m)/100$ , onde **M<sub>rm</sub>** = massa de óleo no produto e **Conc<sub>m</sub>**= concentração média de ácido linoleico no óleo de Rosa mosqueta.

#### 4.1.3 Preparo da pele

Orelhas suínas foram adquiridas de um abatedouro local para fins alimentícios e a pele da região externa foi utilizada como modelo animal para teste *in*

*in vitro* de permeação/retenção cutânea. As peles da região externa das orelhas foram cuidadosamente removidas da cartilagem com o auxílio de lâmina de bisturi e tesoura, seguida pela remoção do tecido subcutâneo, mantendo apenas as camadas da derme e epiderme. As peles limpas foram mantidas em refrigerador por 10 dias até o momento do estudo.

#### 4.1.4 Estudo de permeação

Estudo de permeação *in vitro* foi realizado em modelo de difusão de células de Franz com área de difusão de  $1,3\text{cm}^2$  e compartimento receptor de 4mL.

No dia do estudo, as peles foram cortadas em tamanho ligeiramente maior à área da célula de Franz e avaliadas quanto à integridade da barreira cutânea utilizando TEWLmeter (*cf* Figura 44). As leituras foram feitas após 30s para estabilização do aparelho e foi aceita uma perda hídrica de até  $25\text{mg/m}^2/\text{h}$ . As peles foram então posicionadas nas células de difusão mantendo a derme em contato direto com o meio receptor.



Figura 44 Preparo e posicionamento das peles para estudo de permeação *in vitro*. Fonte: Imagem da própria autora.

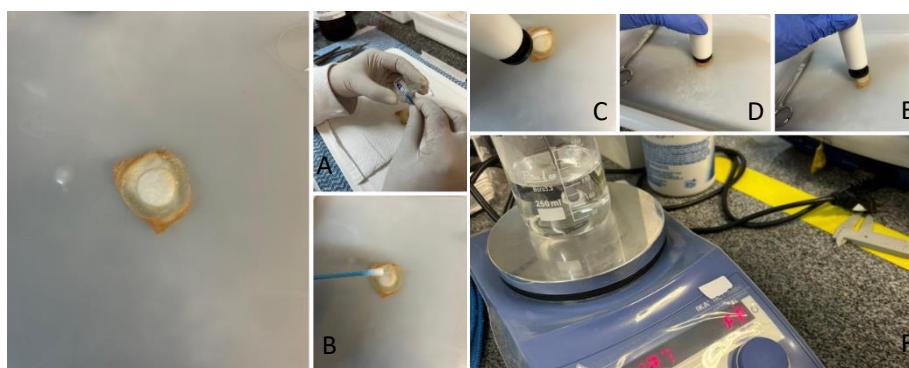
Para garantir a condição sink, foi utilizado, como meio receptor, solução de PBS 7,4M contendo 30% de etanol. Uma alíquota de 9mg ( $\pm 2\text{mg}$ ) das formulações semissólidas e 10mcl de óleo foram aplicadas com o auxílio de um êmbolo de seringa ou pipeta calibrada, recobrimdo toda a área da pele. Alíquotas de 500mcl do líquido receptor foram coletadas, de cada célula, nos tempos 0, 1h, 3h, 6h e 24h, e o volume retirado foi substituído por nova solução a fim de se manter o equilíbrio do

sistema, com o cuidado para não haver formação de bolhas entre a derme e o líquido receptor. O estudo foi conduzido a uma temperatura de  $32^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  e a solução receptora foi mantida em constante agitação a 300rpm com auxílio de barras magnéticas.

#### 4.1.5 Estudo de retenção cutânea

Após as 24h do estudo, as células de Franz foram desmontadas e as peles, cuidadosamente retiradas para avaliar a retenção cutânea. O excesso de formulação presente tanto nas paredes das células quanto na superfície das peles foi removido com o auxílio de 3 e 2 cotonetes respectivamente, embebidos em solução de etanol 30%. O extrato córneo foi removido pelo método tape stripping, empregando-se 10 adesivos D-Squame®, com auxílio de aplicador que garantiu uma pressão constante por 3s. Os adesivos foram agrupados na seguinte ordem: 1-3, 4-7, 8-10, e acondicionados em microtubos contendo 4mL de metanol.

A pele restante foi submersa em água destilada a  $60^{\circ}\text{C}$  e agitada para separação da epiderme e derme (Cf Figura 45). A derme foi picotada com o auxílio de tesoura. Cada camada foi acondicionada em microtubo contendo 4mL de metanol.



**Figura 45** Procedimento de extração dos produtos aplicados da pele e da camada córnea. A: retirada do produto depositado nas células de Franz por meio de Swab; B: swab na superfície da pele; C-E: aplicação dos tapes para retirada das 10 primeiras camadas córneas; C: submersão da pele em banho maria para separação da derme e epiderme. Fonte: Imagem da própria autora.

Todas as amostras foram submetidas a agitação em vórtex por 1 minuto seguido de 30 minutos em ondas de alta frequência para aumentar a eficiência de

extração. As amostras foram congeladas até preparo para leitura em HPLC (High Pressure Liquid Chromatography).

A retenção do ácido linoleico nas camadas da pele foi dada em porcentagem segundo a **Equação 9**:

**Equação 9:**  $\%[\ ] = (Conc_d/Conc_t) * 100$  , onde **Conc<sub>d</sub>**= **Concentração determinada** e **Conc<sub>t</sub>**= **Concentração teórica**

#### 4.1.6 Análise das amostras em HPLC

As amostras foram analisadas pelo método proposto por Guarrasi e colaboradores (144) com adaptações.

##### 4.1.6.1 Procedimento de Hidrolisação

Previamente ao procedimento de hidrolisação, as amostras foram descongeladas e submetidas a ultracentrifugação a 10.000rpm por 5 minutos. Após, todo o líquido foi acondicionado em béquer de vidro e mantido em baixa temperatura até secar completamente. Ao resíduo, foi adicionado 1mL de solução de NaOH 0,5M e mantido a 100°C até completa evaporação. Após resfriamento, foi adicionado 1mL de éter de petróleo duas vezes e acidificado com 1mL de solução de ácido clorídrico a 1M até pH abaixo de 3. Em seguida, foi adicionado mais 1mL de éter de petróleo duas vezes e filtragem da fase éter em funil de separação. A fase éter foi mantida a 40°C até completa evaporação do solvente. O resíduo final foi reconstituído em 1mL de metanol e submetido a leitura em HPLC.

##### 4.1.6.2 Desenvolvimento e validação do método analítico para determinação de ácido linoleico nos estudos de retenção e permeação cutânea

Para quantificação do óleo em HPLC, foi utilizado como substância química de referência (SQR) o ácido linoleico, presente em uma proporção de 35-47% no óleo vegetal(67).

As análises foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1260 Infinity (Agilent, Califórnia, USA), equipado com bomba quaternária, degaseificador, injetor eletrônico



e detector de alta sensibilidade. O equipamento possui amostrador automatizado e detector DAD, operando entre 190nm e 600nm nos canais 208nm e 254nm.

Os experimentos foram executados em coluna de fase reversa Agilent Eclipse XDB - C18 (250 mm ↔ 4,6 mm d.i., 5 µm). O sistema foi operado isocraticamente à 25°C utilizando fase móvel constituída de acetonitrila:metanol:n-hexano (90:8:2; V/V), filtrada em membrana de 0,45 µm e estabilizada com 0,2% de ácido acético. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL/min e volume de injeção de 20 µL. A detecção foi realizada em UV a 208 nm com tempo de corrida de 40min.

O método de análise em HPLC foi validado para as emulsões e microemulsões contendo o óleo de Rosa Mosqueta seguindo os parâmetros definidos no Guia para Validação de Métodos Analíticos(145,146):

#### *4.1.6.2.1 Especificidade e seletividade*

A especificidade e seletividade foram avaliadas pela leitura de amostras contendo o padrão e amostras contendo a emulsão sem o produto de interesse.

#### *4.1.6.2.2 Linearidade*

Para avaliar a linearidade, foi utilizado 10mg de padrão de ácido linoleico obtido da Sigma-Aldrich com 99% de pureza, grau HPLC, e realizadas diluições seriadas com metanol na proporção de 1:1 (v/v) obtendo concentrações na faixa de 1mg/mL até 0,00390625mg/mL. As soluções foram analisadas em HPLC nas condições previamente descritas, em triplicata, e as áreas absolutas encontradas para cada diluição foram comparadas às suas respectivas concentrações para construção de gráfico de dispersão e cálculo da equação da reta.

#### *4.1.6.2.3 Precisão*

A precisão do método foi verificada a partir da dispersão dos resultados de pelo menos três concentrações da curva linear medidos em triplicata, conforme **Equação 10:**

**Equação 10**  $DPR = DP/CMD * 100$ , onde **DPR = Desvio padrão relativo**, **DP = Desvio padrão** e **CMD = concentração média determinada**.

#### 4.1.6.2.4 Intervalo de medição

O limite de detecção teórico foi analisado levando-se em consideração T unilateral para 99% de confiança igual a 3,143. Foram elaboradas 3 curvas de linearidade por meio do padrão de ácido linoleico das quais foram determinados os coeficientes angular e linear de cada curva. A média desses coeficientes foi aplicada na equação **Equação 11**:

**Equação 11**  $LDT = 3,143 \times DP / Coef\ Ang$  , onde **LDT = limite de detecção teórico**, **DP = desvio padrão médio dos coeficientes lineares** e **Coef Ang = Média dos coeficientes angulares**.

O limite de quantificação foi definido como 3 vezes o limite de detecção teórico.

#### 4.1.6.2.5 Exatidão

Uma amostra contendo uma concentração teórica de 0,5mg de ácido linoleico foi submetida a 9 leituras em HPLC e os resultados, aplicados na curva da reta para se conhecer a concentração determinada do marcador. A exatidão foi demonstrada pela **Equação 12**:

**Equação 12**  $CA = CMD/CTA * 100$  , onde **CMD = concentração média determinada** e **CTA = Concentração teórica do analito**.

### 4.1.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 20.0 for Windows® e GraphPad Prism® versão 6.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças de medianas foram examinadas por meio de testes não paramétricos, enquanto as variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste do qui-quadrado. A análise da confiabilidade foi avaliada por meio dos Coeficientes de Correlação Intraclasse (CCI)(Koo; Li, 2016). O nível de significância adotado foi de

5%. Os resultados foram apresentados em tabelas e figuras criadas no Excel® e GraphPad Prism®.

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.2.1 Validação do método em HPLC

O método foi validado a partir do padrão de ácido linoleico em diluições seriadas de 1mg/mL a 0,003906mg/mL. A curva de quantificação foi estabelecida conforme mostrado na Figura 46 com um  $R^2$  superior ao mínimo estabelecido para validação de métodos analíticos(146).

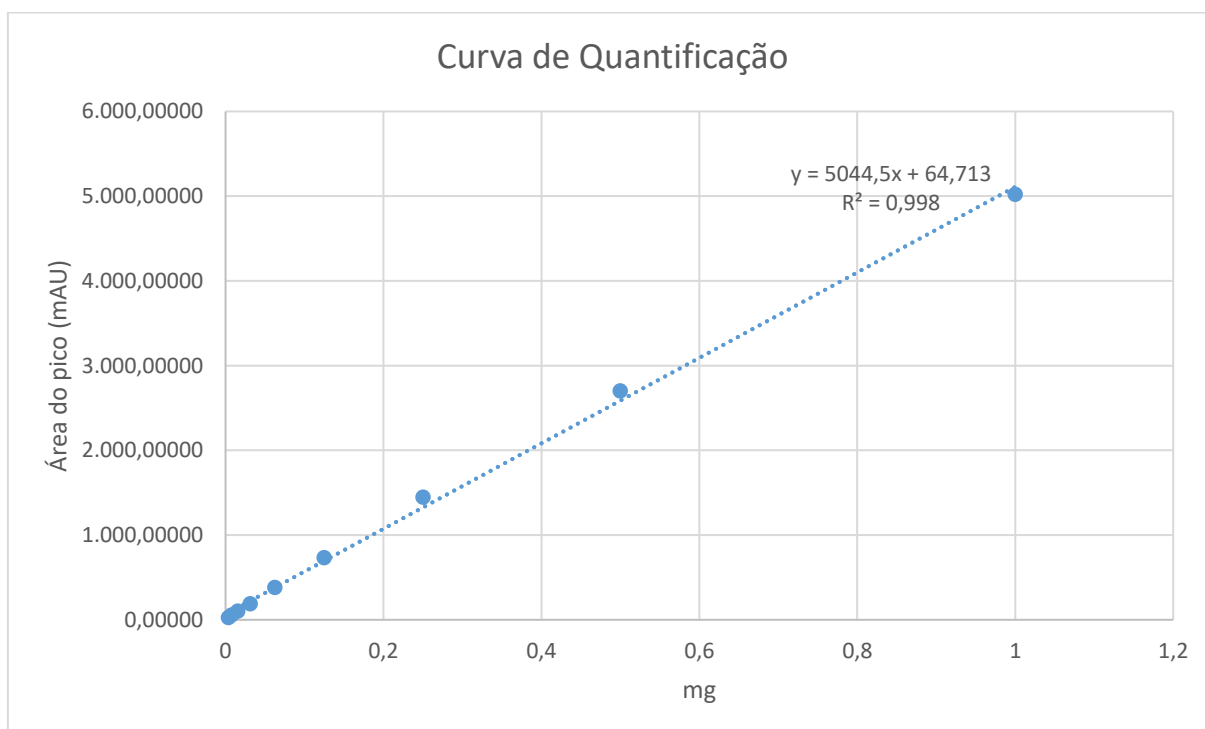


Figura 46 Curva de quantificação do ácido linoleico para o método de leitura em HPLC. Fonte: Imagem da própria autora.

O limite de quantificação teórico ficou em torno de 0,03mg/mL com desvio padrão relativo de 1,27% e exatidão média de 99% conforme se observa na Figura 47, dentro dos limites requeridos para validação de métodos analíticos(146).

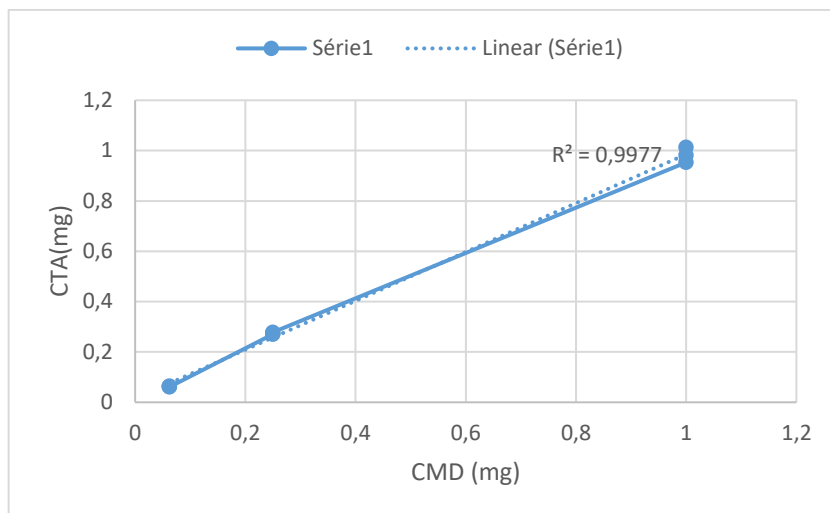


Figura 47 Relação entre a concentração teórica do analito pela concentração média observada no método. Fonte: Imagem da própria autora.

A Figura 48 mostra o padrão cromatográfico encontrado em HPLC para o ácido linoleico no óleo de Rosa Mosqueta de acordo com o padrão. A concentração média de ácido linoleico encontrada no óleo utilizado para confecção das formulações foi de 0,359312 mg/mL.

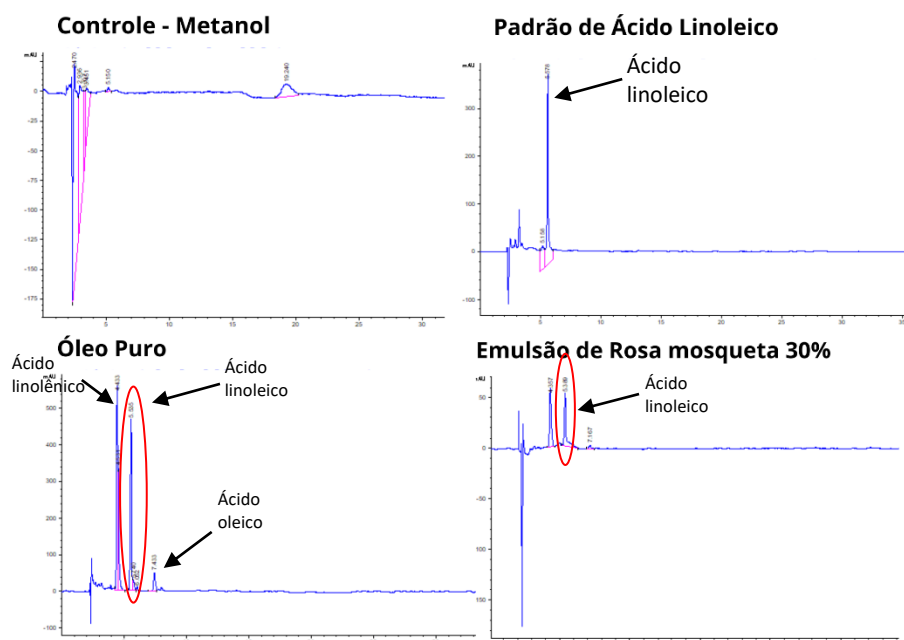


Figura 48 Cromatograma do pico de ácido linoleico em HPLC de acordo com o padrão. Fonte: Imagem da própria autora.

#### 4.2.1 Estudo de permeação e retenção cutânea

O potencial de permeação e penetração cutânea do óleo de Rosa mosqueta incorporado em emulsão a uma concentração de 30% ou em microemulsão a uma concentração de 2,5% foi comparado com o óleo puro e suas respectivas formulações brancas elaboradas com a mesma concentração de óleo mineral, por ser um óleo inerte. A utilização das formulações brancas utilizando o óleo mineral foi realizada para fins comparativos e para avaliar se os insumos utilizados iriam interferir nos valores de ácido linoleico recuperados no estudo.

Foi aplicada uma massa média de 7-10mg de cada formulação e 9mg do óleo puro nos retalhos de pele, mantendo uma média de 5mg de produto por cm<sup>2</sup> de pele(147). O método de análise neste trabalho não identificou a presença de ácido linoleico no líquido receptor em todos os grupos comparados, tendo como limite de detecção 0,01mg/mL.

O potencial de penetração cutânea do ácido linoleico nas camadas da epiderme e na derme quando utilizado o óleo puro ou a emulsão são apresentadas na Figura 49:

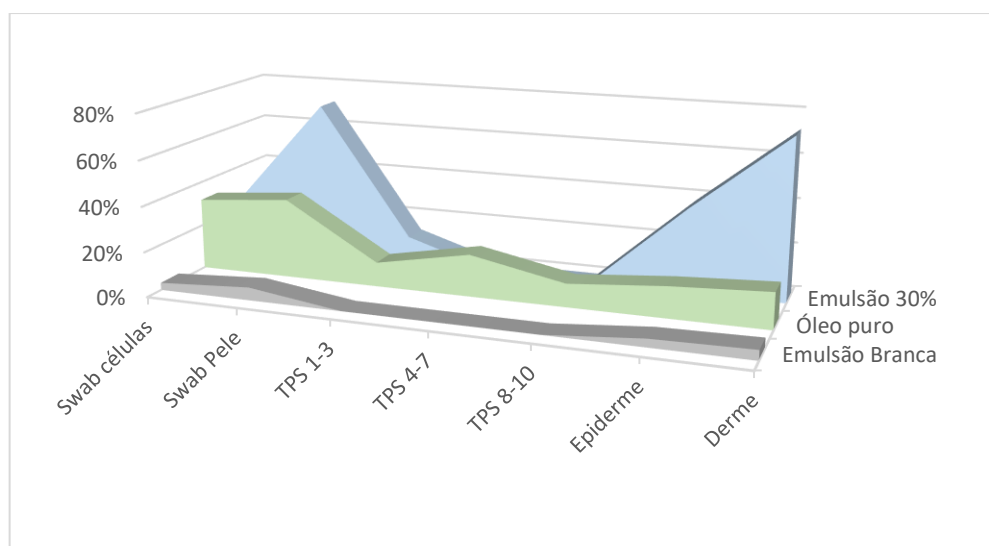


Figura 49 Porcentagem de retenção e penetração do ácido linoleico nas camadas da epiderme e na derme. \*TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora.

Os dados indicam que mais de 60% do ácido linoleico presente no óleo puro ficaram retidos nas células de Franz ou na superfície cutânea. Os outros 40% mostraram uma distribuição decrescente através das camadas da epiderme, com

uma maior concentração nas camadas intermediárias do estrato córneo, representado pelos adesivos de tape striping (TPS 4-7). Somente 16% do ácido linoleico presente no óleo puro penetraram até a derme. Esse resultado está em acordo com aquele encontrado na literatura em que o ácido linoleico conjugado aplicado via cutânea apresentou maior concentração na superfície, pouca penetração na derme e nenhuma absorção(148,149)

Em comparação, as peles tratadas com a emulsão de óleo de Rosa mosqueta apresentaram cerca de 72% de ácido linoleico na camada mais profunda da pele. Em termos objetivos, a derme da pele tratada com o óleo incorporado na emulsão apresentou uma concentração duas vezes maior de ácido linoleico do que a pele tratada com o óleo, ainda que a concentração de óleo puro aplicada tenha sido quase três vezes maior (Cf. Figura 50).

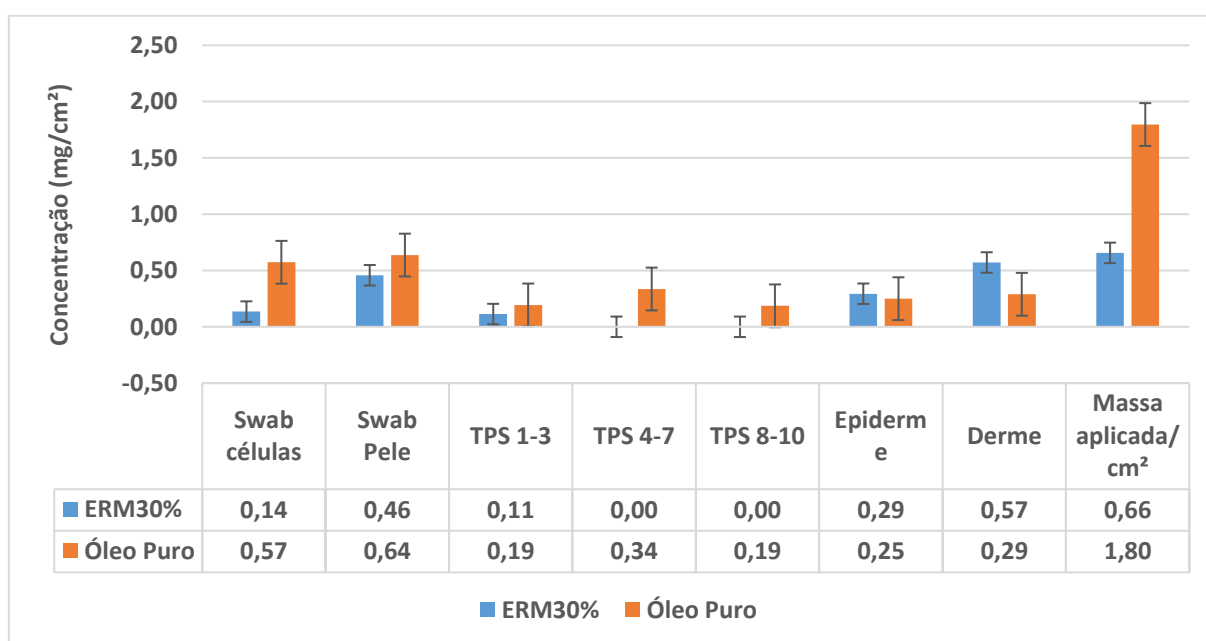


Figura 50 Concentração de ácido linoleico por centímetro quadrado de pele tratada com óleo puro e emulsão 30%. \*TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora.

Esses resultados indicam que a utilização do óleo incorporado em emulsão é mais eficiente quando se espera a penetração dos seus constituintes terapêuticos nas camadas mais profundas da pele. Por outro lado, verificamos que as camadas intermediárias e profundas do estrato córneo não apresentavam quantidades detectáveis de ácido linoleico, diferentemente do óleo puro. Segundo Raufast et al (2006)(149), o ácido linoleico possui um padrão de absorção pelos folículos pilosos, o que pode ter sido ainda mais facilitado com a emulsão em estudo.

Óleos vegetais são largamente utilizados a fim de prevenir ou tratar problemas cutâneos, promover a saúde da pele, reduzir cicatrizes, tratar queimaduras e lesões, penetrando rapidamente através das estruturas do manto lipídico na camada córnea(150,151).

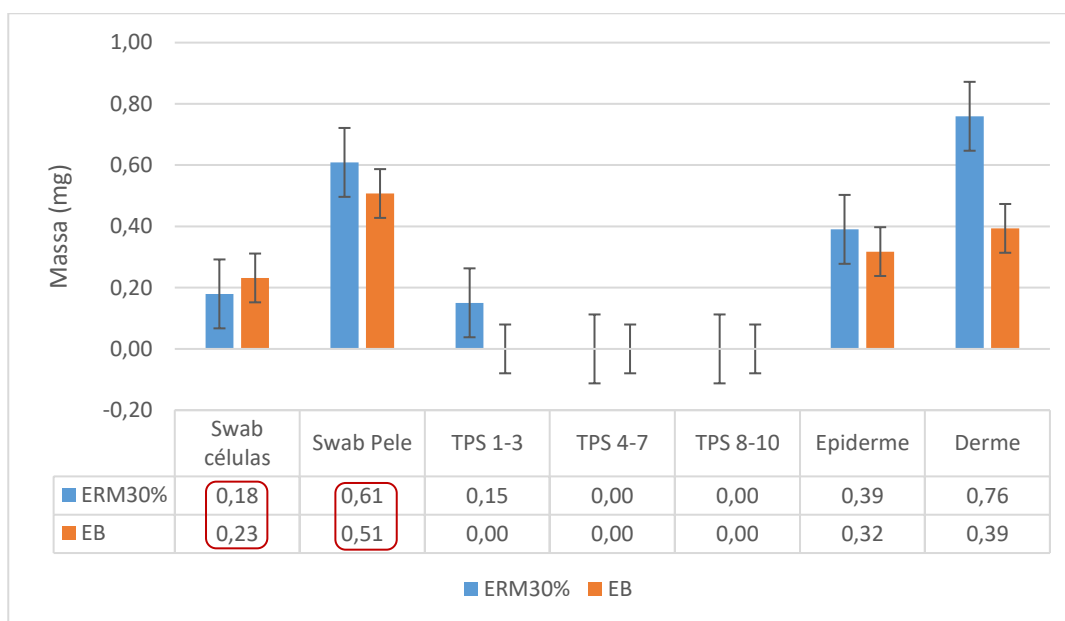
Os ácidos linoleico 18:2(n-6) e linolênico 18:3(n-3) são essenciais para a saúde humana e são adquiridos por meio da dieta. Frequentemente, esses ácidos graxos são encontrados em óleos fixos vegetais, juntamente com o ácido oleico 18:1(n-9). Estudos têm demonstrado que o ácido linoleico é mais benéfico à saúde cutânea do que o ácido oleico, cujas duplas ligações cis parecem aumentar a instabilidade e progressiva perda estrutural da camada lipídica no estrato córneo(152). Por esse motivo, o ácido oleico é frequentemente usado em formulações tópicas para melhorar a penetração de drogas(150,153). Enquanto o ácido linoleico aplicado topicamente rapidamente corrige defeitos na função da barreira da camada córnea(154,155), o ácido oleico resulta em deterioração(44,156). Além disso, o ácido oleico parece ser citotóxico para queratinócitos quando aplicado diretamente em cultura celular(150).

Diferente de óleos como cacau, babaçu, aveia, canola, macadâmia, buriti e oliva, que possuem concentrações maiores de ácido oleico, variando entre 40% e 60%, o óleo de Rosa mosqueta possui uma combinação de ácido linoleico na faixa de 35% a 45% e ácido linolênico entre 19% a 25%, enquanto a concentração de ácido oleico pode variar de 20% a 25%(150).

É evidente, contudo, que a quantidade de ácido linoleico recuperado no grupo tratado com a emulsão é muito maior do que a massa teórica calculada, chegando a 200%. Observando o grupo tratado com a emulsão branca, identificamos uma taxa de recuperação desse ativo em torno de 15% da massa de produto aplicado, enquanto no grupo tratado com a emulsão de óleo de rosa mosqueta a 30%, a taxa de recuperação foi em torno de 26% da massa de produto total aplicado. Na própria célula de Franz da emulsão branca, encontramos cerca de 5% de ácido linoleico quando não deveria conter nada desse produto. Assim, teorizamos que algum insumo utilizado na formulação seria responsável por essa pequena quantidade.

Submetemos a emulsão contendo 30% de óleo de rosa mosqueta à análise em HPLC e identificamos 39% de sua massa em ácido linoleico, quando deveria ser, de, no máximo, 11%. Esse padrão condiz com os resultados obtidos nos testes de permeação. Ao revisar os insumos utilizados na elaboração da emulsão,

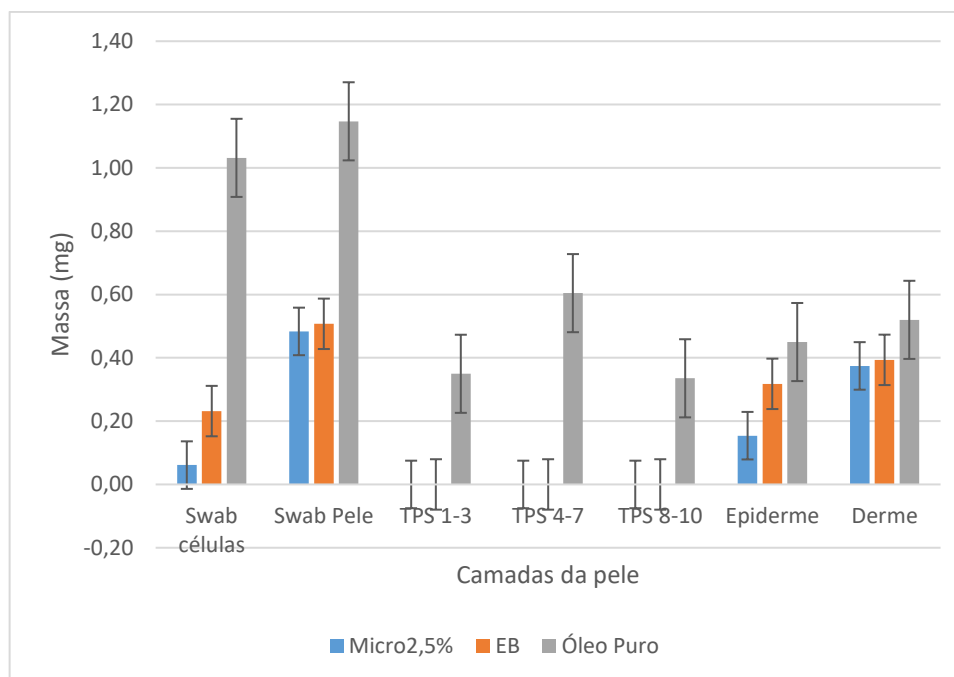
observamos que o cetearil ester, também conhecido como Polawax®, é uma combinação dos ácidos graxos cetílico (C16) e estearílico (C18) e por polissorbato 60. Este último, é constituído por diversos ácidos graxos etoxilados, o que, provavelmente incrementou a concentração de ácido linoleico em nossas amostras. Essa conclusão pode ser reforçada pelo fato de que os swabs retirados da pele tratada com creme branco continha cerca de 0,5mg de ácido linoleico. Esses valores são muito próximos ao encontrado nas células de Franz e na superfície das peles tratadas com a emulsão contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta (Cf. Figura 51), provavelmente provenientes dos insumos da própria formulação que ficaram depositados na superfície cutânea.



**Figura 51** Massa total de ácido linoleico encontrada nas camadas das peles tratadas com emulsão branca e emulsão contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta. ERM30% = Emulsão de Rosa Mosqueta 30%; EB = Emulsão branca; TPS = adesivos de tape striping. Fonte: Imagem da própria autora.

Ao comparar a permeação da microemulsão com o óleo puro, observamos que a massa de ácido linoleico recuperada na microemulsão está muito acima do valor esperado para uma formulação contendo 2,5% de óleo de Rosa mosqueta. Além disso, observamos que a massa de ácido linoleico identificadas nas amostras tratadas com a microemulsão estão em concordância com as amostras tratadas com o creme branco (Cf. Figura 52), observando que a maior parte dessa massa fica retida tanto nas células de Franz quanto na superfície cutânea.





**Figura 52** Massa de ácido linoleico encontrada nas camadas das peles tratadas com a microemulsão contendo 2,5% de óleo de Rosa mosqueta, emulsão branca e óleo puro. EB = Emulsão branca; TPS = adesivos de tape stripping. Fonte: Imagem da própria autora.

A microemulsão elaborada é composta, essencialmente, por Tween 80, glicerina, óleo vegetal e água. Ao submetermos uma microemulsão branca elaborada com óleo mineral à análise em HPLC, encontramos uma massa de ácido linoleico correspondente a 4% de sua massa total, enquanto a microemulsão contendo 2,5% de óleo de Rosa mosqueta chega a 8% de sua massa total em ácido linoleico. O Tween 80, também conhecido como polissorbato 80 possui, em sua constituição, uma série de ácidos graxos etoxilados, que teorizamos, interferiu em nossos resultados.

Ainda assim, essa quantidade de ácido linoleico nos insumos das formulações pode não explicar toda a massa recuperada no estudo de permeação, já que, mesmo para o óleo de rosa mosqueta, a taxa de recuperação foi, em média, de 137%, valor pouco acima do aceitável pela OECD de 80-120%(147). Esses resultados, possivelmente, devem-se à presença de ácido linoleico na pele pura, que aparecem nas peles tratadas com a emulsão branca e cujos resultados são muito semelhantes aos das peles tratadas com a microemulsão.

Ácidos graxos estão naturalmente presentes na pele humana. No estrato córneo, é mais evidente a presença dos ácidos docosanoico 22:0, lignocérico 24:0, hexacosanoico 26:0 e palmítico 16:0, metabolizado a partir dos ácidos sapiênico

16:1(n-10) e sebaléico 18:2. Contudo, pequenas quantidades de ácido oleico 18:1(n-9), resultado da dessaturação de ácido esteárico 18:9 e linoleico 18:2(n-6), também já foram reportados(150).

Nas células da pele, o ácido linoleico é encontrado na forma de glicerofosfolipídios na derme e, mais raramente, na forma de acilglucosilceramida na epiderme. Na pele de porco, o ácido linoleico proveniente da dieta é incorporado no tecido cutâneo no formato de lipídios em até 7 dias e, gradualmente transferido para a forma de acilglucosilceramida na epiderme e, em seguida, para glucosilceramida no estrato córneo(157,158). Dessa forma, parte do ácido linoleico recuperado nas amostras da epiderme e derme são endógenos da pele.

Ainda assim, nosso estudo demonstra que a emulsão foi eficaz em aumentar a permeabilidade do ácido linoleico encontrado no óleo de Rosa mosqueta quando comparado ao óleo puro. Esse resultado é interessante do ponto de vista cosmético, já que o aumento da permeação permite uma maior ação nas camadas mais profundas da pele e melhor aproveitamento dos constituintes do óleo. Além disso, a possibilidade de incorporar princípios ativos no próprio óleo antes de incorporá-lo à emulsão abre um novo campo de pesquisa para a entrega de importantes constituintes para a saúde cutânea.

Quanto à microemulsão, a Figura 52 nos faz inferir que a maior parte do ácido linoleico presente na formulação ficou retido na superfície cutânea, assim como ocorreu com a emulsão branca. A massa de ácido linoleico encontrada nas camadas da derme e epiderme são, provavelmente, de origem endógena.

Embora a microemulsão tenha tido um baixo desempenho na permeação dos constituintes do óleo quando comparado ao uso do óleo puro, também observamos que essa característica pode ser especialmente útil quando se pensa em coberturas voltadas à cicatrização de lesões cutâneas, visto que, havendo lesão de continuidade na pele, a possibilidade de absorção dos constituintes torna-se maior. Nesse caso, tendo como objetivo a ação local e a concentração dos princípios ativos na área da lesão, a baixa permeabilidade da microemulsão torna-se uma característica favorável. De qualquer forma, estudos de permeação e retenção mimetizando a pele não íntegra são necessários para se confirmar tal hipótese.

### 4.3 CONCLUSÃO

O estudo de permeação mostrou que não houve permeação transcutânea dos compostos presentes nas formulações testadas em pele suína íntegra. A emulsão elaborada com 30% de óleo de Rosa mosqueta mostrou-se vantajosa em relação ao uso do óleo puro ao promover, de forma mais eficiente, a penetração do ácido linoleico até a derme. A microemulsão elaborada com 2,5% de óleo de Rosa mosqueta não foi eficiente em promover a penetração do ácido linoleico presente na formulação, retendo o produto na superfície cutânea. Tanto a emulsão quanto a microemulsão apresentaram ação local, com baixo risco de absorção quando aplicado topicamente.

## **CAPÍTULO 5**

---

**ESTUDO EX VIVO DO POTENCIAL CICATRICAL DO ÓLEO DE  
ROSA MOSQUETA INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS**

## 5. ESTUDO EX VIVO DO POTENCIAL CICATRICIAL DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA INCORPORADO EM FORMULAÇÕES TÓPICAS

---

### 5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 5.1.1 Materiais

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Penicillin-Streptomycin Solution e o soro fetal bovino foram adquiridos pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), o óleo de Rosa mosqueta foi adquirido da Farmácia Escola da Universidade Federal de Goiás. Os produtos de teste (microemulsões e emulsões) foram elaborados no Laboratório de Tecnologias da Faculdade de Ceilândia da Universidade de Brasília.

#### 5.1.2 Preparo da pele

Pele humana extraída da região abdominal pós cirurgia de abdominoplastia foi adquirida de um hospital terciário. Tanto o médico quanto os doadores assinaram termo de consentimento livre e esclarecido e aceitaram realizar as doações. Todos os preceitos éticos em relação ao bem-estar e sigilo dos doadores foram observados de acordo com o preconizado pela Resolução nº 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde(159) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Humana da Universidade de Brasília sob protocolo nº 30175020.0.0000.5558 (Anexo 2).

Em fluxo laminar, foi realizada a assepsia da pele com álcool 70% e PBS preparado com 1% de antibiótico. Após, a pele foi submetida a limpeza para retirada do tecido adiposo com auxílio de tesoura e lâmina de bisturi, permanecendo apenas a derme e a epiderme. Um total de 18 fragmentos de pele de 6mm de diâmetro foram cortados com auxílio de um punch e foram realizadas lesões no centro de cada fragmento utilizando punch de 2mm de diâmetro.

#### 5.1.3 Grupos experimentais

Foram aplicados seis tratamentos para comparação, realizados em triplicata, conforme descrito a seguir: DMEM + 10% SFB (controle negativo); MiRM

(Microemulsão de Rosa Mosqueta 2,5%); MiOM (Microemulsão de óleo mineral); EmRM (Emulsão de Rosa Mosqueta 30%); EmOM (Emulsão de Óleo Mineral); Óleo (Óleo de Rosa Mosqueta puro).

#### 5.1.4 Preparo do experimento

Os fragmentos foram distribuídos em triplicata em uma placa de 6 poços sobre uma grid contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, onde cada poço corresponde a um grupo experimental (Cf. Figura 53). O experimento foi realizado em triplicata técnica, de forma que cada poço continha 3 fragmentos de pele do mesmo doador. Foram realizados 3 experimentos independentes, cada um com o tecido de um paciente diferente.

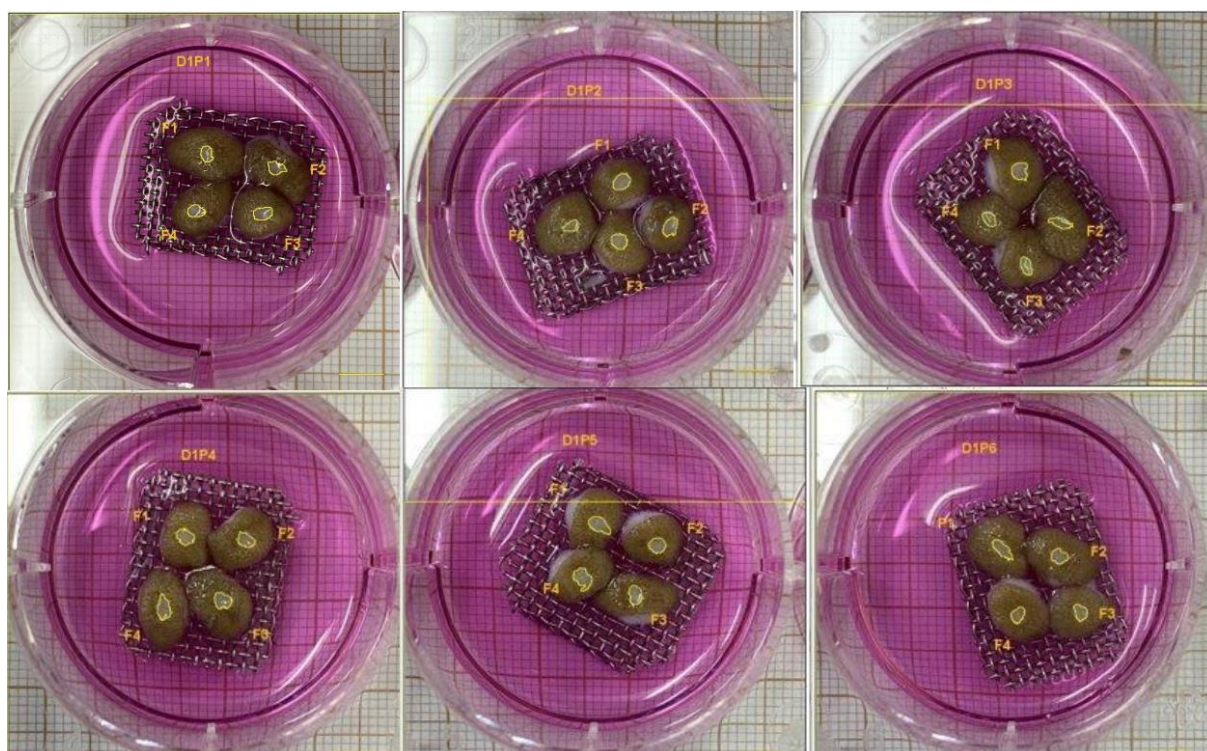


Figura 53 Distribuição dos fragmentos de pele humana nos poços. Cada poço representa um grupo experimental. Fonte: Laboratório Interdisciplinar de Biociências, Universidade de Brasília.

A área lesionada foi foto documentada no dia 0 e os tratamentos foram aplicados. Nos dias 3 e 7, a área de lesão também foi foto documentada para posterior análise comparativa da área lesionada através do software de processamento de imagens ImageJ®. Amostras foram coletadas em cada dia de

avaliação para posterior preparo de lâminas histológicas. Tanto o experimento quanto a análise foram realizados por pesquisadores cegos para os grupos experimentais.

### **5.1.5 Preparo das lâminas**

Nos dias 3 e 7 de avaliação, amostras das peles foram coletadas e acondicionadas em solução de formaldeído 1% para inclusão em blocos de parafina. Posteriormente, os materiais foram seccionados em micrótomo (RM2245, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) em cortes não seriados de 6  $\mu\text{m}$  de espessura que foram colocados em lâminas de vidro e secos em estufa a 37 °C para posterior coloração com Picrosirius-red. Fotomicrografias (pelo menos 4 por lâmina) foram realizadas em microscópio de luz acoplado a câmera digital (DM500 + ICC50 HD, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), com aumento de 400x para mensuração da fibrose intersticial (n = 8-11/grupo). A fibrose intersticial foi analisada por um macroprocessamento usando FIJI (ImageJ®), adaptado de Hadi e colegas [30]. Resumidamente, as imagens foram processadas usando desconvolução de cores para separar o componente de coloração vermelha picrosirius de outros canais. O canal Picrosirius red foi submetido ao limiar para evidenciar áreas reais de coloração. Em seguida, as áreas demarcadas foram quantificadas. A porcentagem de fibrose intersticial foi estimada pela razão entre as áreas marcadas e a área total da imagem. A densidade integrada também foi avaliada para indicar a Densidade do Colágeno. A média da porcentagem de Fibrose Intersticial e Densidade de Colágeno foi calculada para cada conjunto experimental e os resultados comparados entre os grupos.

### **5.1.5 Estudos de expressão gênica**

#### **5.1.5.1 Extração de RNA a partir de amostras**

Foi empregado protocolo de extração de amostras com uso do reagente TRIzol (Invitrogen, CA, USA), com modificações na estratégia, para a melhor obtenção de moléculas de RNA íntegras, com massa suficiente para a condução dos experimentos, e sem contaminação com DNA genômico aparente.

A solução de lavagem com as células foi homogeneizada e centrifugada a 100 G por 10min à 20°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células subsequentemente obtido foi submetido ao protocolo de extração pelo método TRIzol® (Invitrogen, CA, USA) de acordo com o fabricante. Ao final da extração, as amostras de RNA foram diluídas em 20 µL de água deionizada ultrapura livre de RNase.

#### 5.1.5.2 Integridade e quantificação do RNA

A pureza do RNA foi determinada pela relação A260nm/A280nm e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando tampão TBE 1X [Tris-HCl a 45 mM, ácido bórico a 45 mM e EDTA a 1 mM (pH 8,0)] e Isotiocianato de Guanidina (2 mM) (Sambrook, 2001) corado com brometo de etídio (0,4 mg/mL). A separação eletroforética foi realizada a 90V e 60 mA por 30 minutos, em cuba de eletroforese horizontal e o RNA foi visualizado sob luz UV. A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria, utilizando-se o aparelho NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA), com coeficiente de extinção 40ng-cm/µL e comprimento da trajetória da luz OD260 0,1cm, seguindo a equação de Beer-Lambert:

$$\text{Equação 13 } RNA \left[ \frac{ng}{\mu L} \right] = \frac{OD_{260} \times 40ng \frac{cm}{mL}}{0,1cm}, \text{ onde } RNA[ng/\mu L] = \text{Concentração}$$

**de RNA.**

#### 5.1.5.3 Síntese da primeira fita do cDNA

O RNA total resultante foi utilizado como molde (template) para a síntese de cDNA em uma reação de transcrição reversa. Desta forma, foram preparadas as reações contendo 1µg de RNA total, proveniente de cada uma das amostras utilizadas separadamente, adicionando para cada reação: 1µL de Oligo dT 500µg/ml (Amersham Biosciences, Inglaterra), 0,5µL de “Random Primer” 100µg/µL e H<sub>2</sub>O para um volume final de 12µL. As amostras foram incubadas a 75°C por 10 minutos e, em seguida, adicionou-se 7µL de uma solução contendo 2µL de Buffer 5x para a enzima Super Script (Invitrogen, Califórnia, USA), 2µL de DTT (Ditiotrietol) e 0,5µL



de RNase OUT 40U/ $\mu$ L e 2,5 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O para cada amostra de RNA. As amostras foram novamente incubadas a 25°C por 10 minutos e 42°C por 2 minutos, sendo então adicionado 1 $\mu$ L da enzima SuperScript 200U/ $\mu$ l (Invitrogen Carlsbad, Califórnia, USA).

A reação enzimática ocorreu num período de incubação de 2 horas a 42°C. Em seguida, para inativação da enzima, a amostra foi incubada a 72°C por 10 minutos. Visando degradar o RNA, foi adicionado 1 $\mu$ L de RNase H 5U/ $\mu$ L em cada tubo e estes novamente foram incubados a 37°C por 30 minutos seguidos por mais 10 minutos à 72°C, para inativação da RNase H. Posteriormente, as amostras foram diluídas em 60 $\mu$ L de TE.

Para confirmar a qualidade do cDNA sintetizado, foram realizadas, como controle, reações de PCR utilizando um diferente conjunto de “primer” (para o gene GAPDH) e, como molde, o cDNA sintetizado descrito anteriormente. Cada reação foi montada de forma que apresentasse uma concentração final de 1x para o Tampão de Reação (Biolase), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP, 0,2 $\mu$ M do “primer” (Forward e Reverse), enzima Taq (Biolase) e a fita molde (template).

Nas reações onde foi utilizado o “primer” GAPDH foi utilizado um programa de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos e, após os ciclos, 72°C por 6 minutos. As reações foram posteriormente analisadas em um gel de agarose 1% contendo Brometo de Etídeo.

#### 5.1.5.4 Confirmação dos genes por Real-Time PCR

Neste estudo, foi utilizado o TGF- $\beta$  para avaliação do processo cicatricial, por sua importante função sinalizadora e sua participação no estímulo à proliferação de fibroblastos (Massagué, 1990, 1998; Roberts, Sporn, 1996).

Os “primers” que foram utilizados para a amplificação dos genes nos experimentos de Real-Time PCR foram desenhados com o auxílio do programa PrimerExpress (Applied Biosystems, Califórnia, USA), o qual desenha “primers” com as características necessárias para os experimentos de Real-Time PCR no termociclador ABI 5700. As principais características destes oligos são: amplificar fragmentos cujo tamanho máximo não exceda 20bp, quantidade moderada de CG (40-60%), não possuir a capacidade de anelar entre si ou formarem estrutura secundária, temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C.

Levando-se em consideração os parâmetros acima enumerados, os "primers" foram desenhados para cada um dos genes estudados:

*GAPDH-F 5'-ATGACTCTACCCACGGCAAG-3'*

*GAPDH-R 5'-CTGGAAGATGGTGTATGGGTT-3'*

*TGF- $\beta$ -F 5'-CTGAACCAAGGAGACGGAAT-3'*

*TGF- $\beta$ -R 5'-GGTTCATGTCATGGATGGTG-3'*

Para a quantificação do produto formado durante a reação de Real-Time PCR foi utilizado o reagente SYBR® Green Dye (Applied Biosystems, Califórnia, USA). O SYBER Green Dye possui afinidade pela menor curva da dupla fita de DNA. Quando não está ligado ao DNA, emite uma pequena fluorescência no comprimento de onda de 520nm. Ao se ligar à dupla fita de DNA, sua fluorescência aumenta cerca de 100 vezes, permitindo então a detecção do produto do PCR em tempo real.

O gerenciamento do termociclador e a coleta dos dados gerados durante a amplificação foram realizados pelo programa ABI-Manager SDS (Roche). Utilizando o mesmo programa, foi escolhida a concentração de "primers" que resultaram em uma formação de "primer-dimer" mínima, ou inexistente, e a menor variação entre as duplicatas.

Todas as reações de Real-Time PCR foram realizadas em duplicata. Como fita molde, foi utilizado 3 $\mu$ L de cDNA sintetizado anteriormente, 3 $\mu$ L de "primer" na concentração final de 600 $\mu$ M e 6 $\mu$ L do SYBER Green Dye. O aparelho ABI 5700 trabalha com placas de 96 poços, e todas as reações foram montadas tomando-se precauções para que na placa não se depositasse pó, talco ou outras partículas que pudessem interferir na leitura da fluorescência.

Na análise inicial dos dados, realizada por meio do programa ABI- Manager SDS, foi definido, manualmente, um limiar que estivesse na fase exponencial de amplificação do gene. Assim que é selecionado o limiar, da intersecção deste com a curva de amplificação, é obtido o Ct daquela amostra "Threshold Cycle" (Limiar do Ciclo), que é definido como o ciclo onde a fluorescência se encontra estatisticamente acima do background. Assim, temos que, quanto maior a concentração de um gene, mais rapidamente a sua curva de amplificação irá atingir o limiar e menor será o seu Ct. Conseqüentemente, quanto menor a sua concentração, maior o seu Ct. Portanto, podemos dizer que a diferença de expressão de um gene, que está sendo analisado

em diferentes amostras, pode ser dada pela diferença dos seus Cts frente a um determinado limiar.

A análise de amostras por Real-Time PCR leva em consideração a variação da concentração de cDNA entre elas, exigindo, para comparação, a normalização desses dados. Para análise dos dados provenientes dos experimentos de Real-Time PCR foi realizada uma quantificação relativa por meio da obtenção da curva de expressão de um gene que não possui alteração de expressão nas amostras analisadas. Então, para cada amostra, a expressão do gene que está sendo estudado foi determinada em função da expressão do gene controle. Assim, para cada cDNA analisado eram feitas duas reações, uma utilizando “primers” para o gene analisado e a outra utilizando “primers” para um controle interno. Terminada a reação, era fornecido ao ABI-Manager SDS um limiar e então o programa retornava o Ct de cada reação. A partir desses cálculos, foi possível analisar a diferença de formação do produto do PCR, que está diretamente ligado à expressão do gene entre as amostras analisadas.

#### **5.1.6 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no programa SPSS 20.0 for Windows® e GraphPad Prism® versão 6.0. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças de média foram examinadas por meio do teste Anova Two-way com pós-teste. O nível de significância adotado foi de 5% e os resultados foram apresentados em tabelas e figuras criadas no Excel® e GraphPad Prism®.

## **5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise histológica avaliou a taxa de retração das lesões de acordo com o tratamento aplicado. A Figura 54 mostra as diferenças encontradas entre os tratamentos.

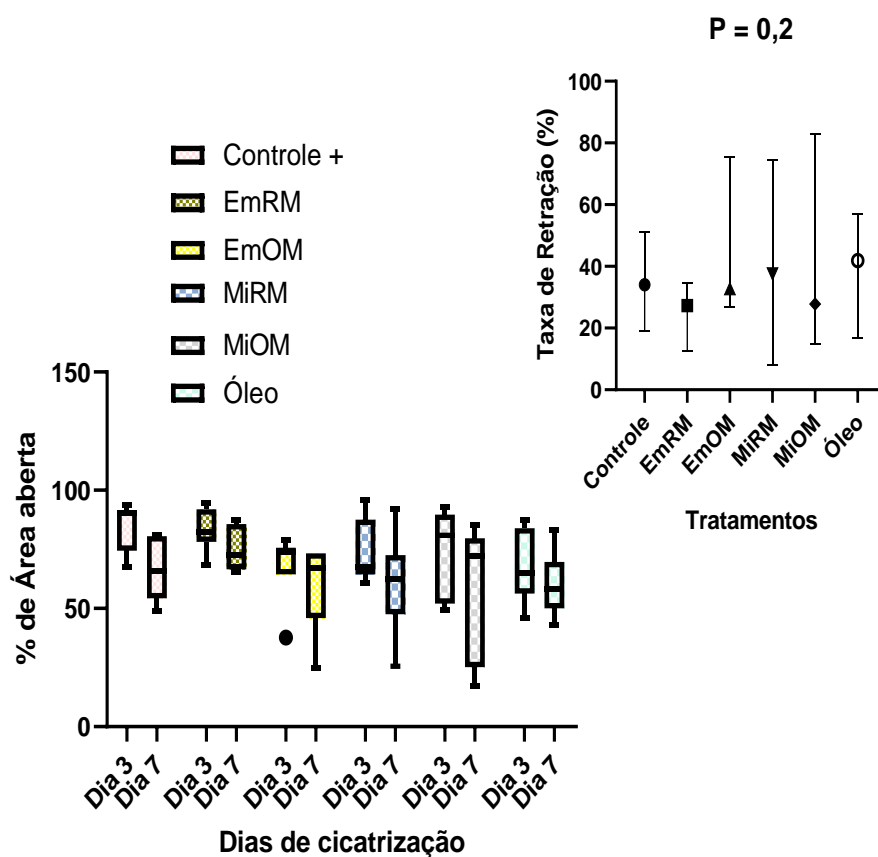


Figura 54 Taxa de área aberta ( $P > 0,1$ ) e taxa de retração das lesões ( $P = 0,2$ ) realizadas em retalho cutâneo *ex vivo* segundo tratamento. \*EmRM= emulsão de Rosa mosqueta 30%; EmOM= Emulsão de óleo mineral a 30%; MiRM= microemulsão de Rosa Mosqueta 2,5%; MiOM= microemulsão de óleo mineral 2,5%.; Teste Anova com pós teste de Brown-Forsythe. Fonte: Imagem da própria autora.

Os resultados da análise histológica quanto à área de fibroplasia e densidade de colágeno são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Resultados de densidade óptica e área de fibroplasia por dia de cicatrização de acordo com os tratamentos aplicados. Universidade Federal de Goiás, 2023

	Dia de cicatrização											
	Dia 3						Dia 7					
	Densidade óptica			Área de fibroplasia ( $\mu\text{m}^2$ )			Densidade óptica			Área de fibroplasia ( $\mu\text{m}^2$ )		
	Média	DP	Total N	Média	DP	Total N	Média	DP	Total N	Média	DP	Total N
<b>DMEM</b>	126630690	4457258	7	1048489	18147	7	128265625	5340062	11	1036486	29861	11
<b>EmOM</b>	125027844	2046929	8	1027658	18191	8	126820181	3825112	10	1031503	22760	10
<b>EmRM</b>	121050453	3029909	8	1022790	11275	8	126655605	3250193	10	1025741	27513	10
<b>MiOM</b>	121891153	3794025	7	1026787	20624	7	129026400	4626608	11	1034272	33023	11
<b>MiRM</b>	126453646	4098617	9	1034328	22336	9	130874856	4844286	9	1048673	31649	9
<b>Óleo</b>	125507879	5318521	7	1036180	20233	7	127731457	4212135	11	1034476	25723	11

Conforme observado na Figura 55 abaixo, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos em relação à área de fibroplasia e a densidade de colágeno encontrada entre os dias 03 e 07. Contudo, quando avaliada a diferença na taxa de deposição de colágeno entre os dias de avaliação, observamos um aumento significativo para os grupos tratados com a emulsão de rosa mosqueta a 30% e a microemulsão com óleo mineral. Embora sem diferenças estatisticamente significativas, tanto a deposição de colágeno, quanto a área de fibroplasia foram maiores no grupo tratado com a microemulsão de rosa mosqueta em relação aos demais grupos.

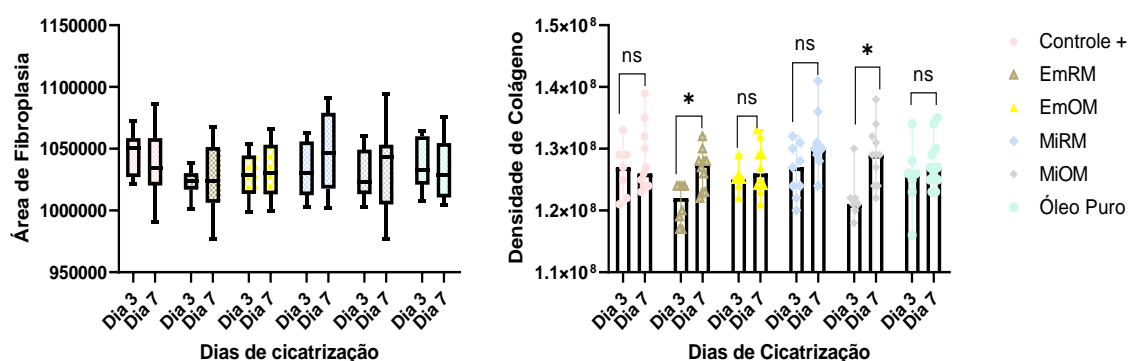
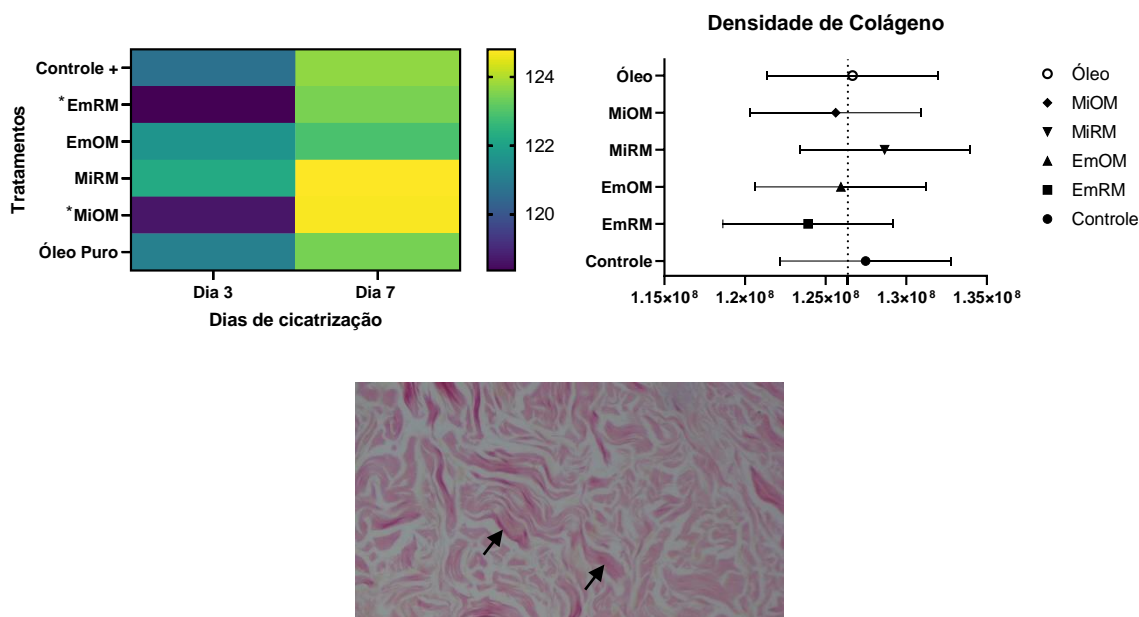


Figura 55 Diferenças na área de fibroplasia e na densidade de colágeno nos dias 3 e 7 de cicatrização por tratamento. \* $P > 0,05$ , Anova Two-way com Comparações Multivariadas de Sidak e pós-teste de Tukey. Fonte: Imagem da própria autora.

A Figura 56 mostra que, a despeito da ausência de diferença significativa na deposição de colágeno do dia 03 para o dia 07, como observado nos grupos EmRM e MiOM, o grupo tratado com a microemulsão de óleo de Rosa Mosqueta a 2,5% apresentou a maior densidade de colágeno nos dois dias de avaliação e teve mais impacto nesse quesito quando comparado aos demais grupos.



**Figura 56** Comparação na densidade de colágeno entre os tratamentos nos dias de avaliação. A figura à esquerda mostra a evolução na densidade de colágeno por área nos dias de avaliação, enquanto a figura à direita mostra o impacto dos tratamentos na deposição de colágeno na área da ferida. Setas indicam área de colágeno. \*P<0,01; Anova Two-Way com pós-teste de Tukey. Fonte: Imagem da própria autora.

A síntese de colágeno na pele depende da ativação de fibroblastos a partir das próprias células inflamatórias, especialmente macrófagos cujas citocinas são responsáveis pela modulação do processo de cicatrização, estimulando fibroplasia e angiogênese. Esse processo ocorre por modificação fenotípica dos macrófagos, que passam de um estágio inflamatório para outro proliferativo, estimulando a produção de componentes da matriz extracelular, angiogênese, contração celular e apoptose por meio da ativação de fibroblastos(160). Em estudo de cicatrização in vivo, Lei e colaboradores (2018) demonstraram que o óleo de Rosa mosqueta acelera essa transição fenotípica de macrófagos(161).

Um dos principais sinalizadores para a ativação de fibroblastos e consequente síntese de colágeno é o fator transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), responsável por aumentar a expressão de genes para a síntese de prolina e de elementos da

matriz extracelular(162). Assim, submetemos as amostras de pele à avaliação de expressão gênica para verificar se houve alteração nos níveis de TGF- $\beta$  em relação aos tratamentos. Os resultados são mostrados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11 - Relação da expressão gênica de TGF $\beta$  de acordo com os tratamentos aplicados. Universidade de Brasília, 2023

Gene	Tipo	Tratamento	Eficiência da reação	Fold Change	Erro padrão	Resultado
TGF $\beta$	alvo	Emulsão de óleo mineral 30%	1,06	0,05*	0,03	↓
		Emulsão Rosa Mosqueta 30%	1,06	2,02 <sup>#</sup>	0,32	↑
		Microemulsão de Rosa Mosqueta 2,5%	1,06	4,43 <sup>&amp;</sup>	0,25	↑
		Microemulsão de óleo mineral 2,5%	1,06	0,87	0,15	---
		Óleo de Rosa Mosqueta puro	1,06	0,82	0,12	---

As formulações contendo óleo de Rosa mosqueta provocaram aumento significativo nos níveis de TGF- $\beta$ . Interessantemente, o mesmo não ocorreu com o grupo tratado apenas com o óleo puro. Tal resultado não pode ser atribuído aos veículos das formulações, visto que os grupos controles não apresentaram os mesmos resultados. Duas suposições, portanto, podem ser levantadas: a melhor permeação dos constituintes do óleo contido na emulsão, conforme demonstrado anteriormente e o incremento de ácidos graxos encontrada na microemulsão devido ao Tween 80 seriam os responsáveis por essa divergência nos resultados; ou concentrações menores do óleo são mais eficientes para induzir a produção de TGF- $\beta$ . Pellenz et al (2018), por exemplo, demonstraram que concentrações de 0,1% de extrato de barbatimão possuem efeito genoprotetor enquanto concentrações entre 5% e 10% são mais adequadas para estimular a proliferação de queratinócitos. Concentrações acima destas, passam a ser pouco efetivas ou até mesmo deletérias no processo de cicatrização(163).

Nossos resultados divergem daqueles previamente encontrados por Lei et al (2018), que observou redução significativa dos níveis de TGF- $\beta$  no sétimo dia em lesões tratadas com óleo de Rosa mosqueta comparadas ao

controle(161). Os pesquisadores observaram que não houve diferença na velocidade de epitelização ou densidade de colágeno de lesões tratadas com óleo de Rosa mosqueta nos primeiros 7 dias de cicatrização comparado ao controle negativo. Essa diferença foi significativa a partir dos 14 dias. Por questões técnicas, nosso estudo compreendeu apenas os primeiros 7 dias de cicatrização devido à dificuldade em manter pele *ex vivo* em condições saudáveis por mais tempo. Ressaltamos, no entanto, que tais resultados são interessantes, visto que nos permite observar o comportamento do produto na pele humana, desde que modelos animais que podem ter certas diferenças do processo de cicatrização humano(164).

O TGF- $\beta$  humano faz parte de uma superfamília de 33 diferentes proteínas que desempenham importante papel na sinalização celular que influencia todas as fases da cicatrização. Exerce ação quimiotática e pró-mitótica para fibroblastos e células endoteliais, essencial nas fases inflamatória e proliferativa, estimulando, inclusive, a angiogênese em feridas isquêmicas(165). Além disso, induz a produção de colágeno I e III, fibronectinas e outras citocinas(166) e atua na fase de contração de lesões por induzir a expressão de isoformas de actina contrátil, semelhante às encontradas em células musculares(160,167). Geng e colaboradores (2023) demonstraram que o TGF- $\beta$  facilitou a cicatrização em úlcera de ratos diabéticos por aumentar a expressão de macrófagos tipo 2 e produção de componentes da matriz extracelular(168).

Os níveis de TGF- $\beta$  aumenta drasticamente no início da cicatrização pela degranulação de plaquetas, o que promove a migração, proliferação e excreção de matriz extracelular pelos fibroblastos. Ao mesmo tempo, inibe a atividade mitogênica de fatores de crescimento como o EGF em queratinócitos(169). Isso é importante a fim de evitar a reepitelização antes da adequada proliferação e preenchimento da área da lesão por meio da deposição de matriz extracelular e substituição por colágeno.

Durante a fase proliferativa, o TGF- $\beta$  sofre importante redução, voltando a ter um novo pico durante a remodelação quando fibroblastos se transformam em miofibroblastos. Nesse processo, os níveis de TGF- $\beta$ 1 e TGF- $\beta$ 3 parecem exercer maior influência na produção e excreção de moléculas da matriz



extracelular, incluindo colágeno e fibronectina, com implicação relevante na resistência da cicatriz(169–171).

Por outro lado, níveis adequados de TGF- $\beta$  em lesões cutâneas continuam bastante controversos. Evidências têm mostrado que, no caso de feridas crônicas, observam-se baixos níveis da citocina na derme, enquanto elevados níveis permanecem sustentados na epiderme na borda da lesão. Adicionalmente, estudos com ratos transgênicos apresentando excessiva expressão de TGF- $\beta$ 1 em queratinócitos mostra características histológicas que são similares à epiderme encontrada em feridas crônicas, sugerindo que a excessiva e prolongada expressão dessa citocina no sítio da lesão pode não ser benéfico(169,171,172)

De qualquer forma, os resultados obtidos em nossos estudos nos levam a crer que os níveis de TGF- $\beta$  encontrados não resultaram em atraso na reepitelização, visto que o grupo tratado com a microemulsão apresentou maior taxa de retração comparado ao grupo controle combinado com a maior densidade de colágeno por área, embora a diferença não tenha sido significativa. Os motivos pelos quais os níveis de TGF- $\beta$  divergiram nos grupos tratados com as formulações elaboradas com o óleo de Rosa mosqueta comparado ao óleo puro permanecem controversos.

Destacamos, no entanto, que o grupo tratado com a emulsão contendo 30% de óleo de Rosa mosqueta apresentou níveis moderados de interleucina TGF- $\beta$  e menor densidade de colágeno. Embora a deposição de colágeno na área lesionada seja importante do ponto de vista do fechamento da ferida, pode também estar relacionado à ocorrência de cicatrizes hipertróficas e quelóides(172). Da mesma forma, o óleo de Rosa mosqueta puro resultou em menor densidade de colágeno na área da ferida quando comparado ao controle, embora tal diferença não tenha sido significativa. Ainda assim, esses achados podem corroborar o uso do óleo de Rosa mosqueta na atenuação de cicatrizes(161), e a emulsão pode ter aumentado esse feito por sua ação promotora de permeação dos componentes do óleo.

As limitações deste estudo estão relacionadas à metodologia *ex vivo*, por restringir toda a complexa rede celular e de sinalização encontrada no organismo vivo. Por outro lado, é o primeiro estudo que demonstra a ação do

óleo de Rosa mosqueta em retalho de pele humana e sua implicação na densidade de colágeno e expressão da citocina TGF- $\beta$ .

### 5.3 CONCLUSÃO

Neste estudo, comparamos lesões confeccionadas em retalhos de pele humana tratados com óleo de Rosa mosqueta puro ou em formulação cosmética. A emulsão e a microemulsão elaboradas com óleo de Rosa mosqueta aumentaram a expressão de TGF- $\beta$  durante a cicatrização, enquanto o grupo tratado com o óleo puro não apresentou alterações nos níveis dessa citocina. As lesões tratadas com emulsão à concentração de 30% de óleo de Rosa mosqueta apresentaram níveis moderados de TGF- $\beta$ , menor densidade de colágeno e epitelização semelhante ao grupo controle, corroborando o uso do óleo de Rosa mosqueta para uma cicatriz mais estética.

# **CAPÍTULO 6**

---

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A partir deste estudo, foi possível o desenvolvimento de uma emulsão estável contendo 30% de óleo de Rosa Mosqueta, mantendo suas características organolépticas e químicas por 90 dias mesmo sob estresse térmico e de umidade. Embora tenham sido notadas variações nos parâmetros reológicos da emulsão, provavelmente devido à maior perda de água, tais alterações não foram suficientes para comprometer a qualidade da formulação.

Além do envase em frascos airless, a incorporação do óleo vegetal em uma emulsão óleo em água contribuiu para a proteção dos compostos ativos do óleo, visto que a perda de atividade antioxidante no óleo puro foi significativamente maior que a perda de atividade antioxidante na emulsão. Óleo e antioxidante sintético parecem atuar sinergicamente para a proteção dos compostos antioxidantes. Assim, demonstramos que a incorporação do óleo em emulsão garantiu a proteção de seus compostos químicos contra o processo de peroxidação lipídica, apresentando vantagens de uso comparado ao óleo puro.

Tanto o óleo puro quanto a emulsão não mostraram potencial irritante na membrana corio-alantoide de aves. A avaliação de viabilidade celular não indicou toxicidade da emulsão, mostrando-se um produto seguro para uso tópico em humanos. Além disso, foi possível observar que a emulsão apresentou um potencial anti-inflamatório pelo estímulo da produção de citocina IL10.

As microemulsões desenvolvidas neste trabalho incorporaram até 5% de óleo de Rosa Mosqueta utilizando Tween 80 como tensoativo e glicerina como cotensoativo. As microemulsões elaboradas mantiveram-se dentro da faixa de pH requerida para uso cutâneo (4,5 – 5,5) sem a necessidade de adição de outros componentes.

Semelhante às emulsões, as microemulsões elaboradas não apresentaram toxicidade em cultura de queratinócitos humanos HaCat ou potencial inflamatório in vitro. A ação microbiológica das microemulsões observada contra *C. acnes* ou contra os demais microrganismos testados, deve-se à composição da fase aquosa, que utiliza clorexidina 0,1%, visto que o óleo de Rosa mosqueta não mostrou ação microbiológica para nenhum dos microrganismos testados neste trabalho.

No estudo de permeação, os produtos mostraram apresentar ação local pois não houve absorção através da superfície cutânea. A emulsão de Rosa mosqueta

30% foi mais eficaz para promover a permeação de ácido linoleico quando comparado ao óleo puro. Esse dado confere vantagem ao uso da emulsão em comparação ao óleo puro, permitindo maior aproveitamento dos ativos do óleo nas camadas mais profundas da pele.

Embora a microemulsão elaborada com 2,5% de óleo de rosa mosqueta tenha sido pouco eficaz para promover a permeação do óleo, observamos, em estudo de cicatrização *ex vivo*, que a pele tratada com esse produto apresentou maior densidade de colágeno comparado aos demais grupos, provavelmente pelo estímulo à produção do fator de crescimento  $\beta$  (TGF  $\beta$ ). Já a emulsão contendo 30% do óleo manteve níveis moderados dessa citocina durante o processo de cicatrização, estimulando menor densidade de colágeno, favorecendo a ocorrência de uma cicatriz mais estética.

Como limitação, devemos destacar que a quantidade de óleo incorporada em microemulsão foi pequena e o uso do Twee 80 como tensoativo pode ter confundido os resultados de permeação. O método analítico desenvolvido necessita de aperfeiçoamento para melhor compreensão do potencial de permeação da microemulsão. Além disso, o estudo de permeação se baseou em um único constituinte do óleo, que, embora em maior concentração, pode não corresponder ao comportamento do óleo em si.

Por outro lado, os resultados apresentados neste trabalho nos levam às seguintes conclusões:

1. O uso do óleo de Rosa mosqueta é mais vantajoso quando incorporado em emulsão tanto para proteção e conservação dos princípios ativos do óleo quanto para promover sua ação nas camadas mais profundas da pele.
2. O uso de clorexidina aquosa a 0,1% é eficiente como sistema conservante nas formulações tópicas, tanto para a proteção do produto contra contaminação, quanto para ação antimicrobiana.
3. O óleo de Rosa mosqueta, bem como as formulações elaboradas neste trabalho não apresentaram potencial irritativo, citotóxico ou inflamatório, mostrando-se seguros para o uso tópico em pele humana.
4. A microemulsão de óleo de Rosa mosqueta elaborada neste trabalho não apresentou boa permeação de seus componentes nas camadas da pele,

mas, em estudo de cicatrização *ex vivo*, promoveu maior deposição de colágeno e estimulou a produção de TGF $\beta$ .

5. O óleo puro não alterou a expressão de TGF- $\beta$  durante o processo de cicatrização e a densidade de colágeno foi semelhante ao do grupo controle.
6. A emulsão de Rosa mosqueta a 30% foi mais eficiente em promover a permeação do ácido linoleico contido no óleo, estimulou a expressão de níveis moderados de TGF- $\beta$  durante o processo de cicatrização, resultando em uma área de fibroplasia com menor densidade de colágeno, o que corrobora seu uso na atenuação de cicatrizes.

Essas conclusões abrem espaço, inclusive, para estudos futuros. Levantamos a possibilidade de utilizar a microemulsão como carreador de elementos necessários ao metabolismo cutâneo. Um novo estudo de cicatrização *ex vivo* com a adição de cultura de macrófagos traria mais luz à ação da microemulsão nas células inflamatórias e o papel do TGF $\beta$  na densidade de colágeno. Ademais, um estudo de dose-resposta ajudaria a entender se a proporção de óleo no produto teve papel nos resultados encontrados.

Este trabalho, além de atender aos objetivos propostos, traz novos questionamentos que irão expandir os conhecimentos científicos acerca do uso do óleo de Rosa mosqueta na cosmética ou na medicina.

## BIBLIOGRAFIA

---

1. Robert L, Labat-Robert J, Robert A-M. Physiology of skin aging. *Pathol Biol* [Internet]. 2009 Jun;57(4):336–41. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0369811408002423>
2. Santos JS. Estudo morfológico e morfométrico do processo de cicatrização em ratos Wistar adultos tratados com creme de óleo de Rosa Mosqueta. Universidade de Brasília; 2016.
3. Yamada BFA. Pele: o manto protetor, higiene e hidratação. Andreoli, editor. São Paulo: Andreoli; 2015. 288 p.
4. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. Vol. 21, *Endocrine Reviews*. 2000. p. 457–87.
5. Irion GL. Anatomia e fisiologia da pele. In: *Feridas: novas abordagens, manejo clínico e atlas em cores*. 2<sup>a</sup>. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012. p. 336p.
6. Kabashima K, Honda T, Ginhoux F, Egawa G. The immunological anatomy of the skin. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2019;19(1):19–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-018-0084-5>
7. Abdo JM, Sopko NA, Milner SM. The applied anatomy of human skin: A model for regeneration. *Wound Med* [Internet]. 2020;28(January):100179. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.wndm.2020.100179>
8. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermatol Nurses Assoc* [Internet]. 2011 Jul;3(4):203–13. Available from: <http://journals.lww.com/01412499-201107000-00003>
9. Baker LB. Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature* [Internet]. 2019 Jul 3;6(3):211–59. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/23328940.2019.1632145>
10. Alves, Dalton G.L.; Lima, Douglas F.; Rocha, Silvia Gabrieli; Kashiwabara TGB. Estrutura e função da pele. In: Kashiwabara, Tatiliana Bacelar; Kashiwabara, Ysadora M.B.; Rocha, Lamara L.V.; Bacelar, Letícia F.F.; França PLVL, editor. *Medicina ambulatorial IV* [Internet]. Montes Claros - MG: Dejan Gráfica e Editora; 2016. p. 560p. Available from: <https://www.researchgate.net/profile/Kashiwabara->

- Kashiwabara/publication/332762755\_1\_-  
 \_MEDICINA\_AMBULATORIAL\_7/links/5cc852044585156cd7bc10ec/1-  
 MEDICINA-AMBULATORIAL-7.pdf#page=13
11. Barcaui E de O, Carvalho ACP, Piñeiro-Maceira J, Barcaui CB, Moraes H. Study of the skin anatomy with high-frequency (22 MHz) ultrasonography and histological correlation. *Radiol Bras* [Internet]. 2015 Oct;48(5):324–9. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-39842015000500324&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-39842015000500324&lng=en&tlng=en)
  12. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surg* [Internet]. 2010 Oct;28(10):469–72. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0263931910001596>
  13. Hirabayashi T, Anjo T, Kaneko A, Senoo Y, Shibata A, Takama H, et al. PNPLA1 has a crucial role in skin barrier function by directing acylceramide biosynthesis. *Nat Commun* [Internet]. 2017 Apr 1;8(1):14609. Available from: <http://www.nature.com/articles/ncomms14609>
  14. Elias PM. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012 Sep;132(9):2131–3. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15358929>
  15. Ceruti JM, Leirós GJ, Balañá ME. Androgens and androgen receptor action in skin and hair follicles. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018 Apr;465:122–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720717304926>
  16. Holick MF, Chen TC, Lu Z, Sauter E. Vitamin D and Skin Physiology: A D-Lightful Story. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2007 Dec 1;22(S2):V28–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1359/jbmr.07s211>
  17. Zouboulis C. The human skin as a hormone target and an endocrine gland. *Hormones*. 2004;3(1):9–26.
  18. Antonini D, Sibilio A, Dentice M, Missero C. An Intimate Relationship between Thyroid Hormone and Skin: Regulation of Gene Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2013;4. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2013.00104/abstract>
  19. Aguirre GU, Ciuffo GM, Ciuffo LEC. Genetic differentiation of *Rosa rubiginosa* L. in two different Argentinean ecoregions. *Plant Syst Evol*. 2009;281(1–2):183–92.
  20. Pareja B. Plantas medicinales con aplicaciones en dermatología y cosmética.



- Dermofarm Folia Dermat Peru. 1996;7(3/4).
21. Valdebenito, G.; Campos, J.; Larrín, O.; Aguilera, M.; Kahler, C.; Ferrando, M.; García, E.; Sotomayor AG. Innovación tecnológica y comercial de productos forestales no madereros (PFNM) en Chile. 2003.
  22. Wenzig EM, Widowitz U, Kunert O, Chrubasik S, Bucar F, Knauder E, et al. Phytochemical composition and in vitro pharmacological activity of two rose hip (*Rosa canina* L.) preparations. *Phytomedicine* [Internet]. 2008 Oct;15(10):826–35. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094471130800127X>
  23. Pino RMC. Formulación de un agente pigmentante a base de Carotenoides extraídos de cascarilla comercial de Rosa Mosqueta (*Rosa Rubiginosa*) para su uso en alimentos. Universidad Austral de Chile; 2001.
  24. Rosa Canina vs Rosa Rubiginosa [Internet]. Rio Rosa Mosqueta. 2018 [cited 2021 Aug 24]. p. 1. Available from: <https://riorosa.co.uk/blogs/news/rosa-canina-vs-rosa-rubiginosa>
  25. Franco D, Pinelo M, Sineiro J, Núñez MJ. Processing of *Rosa rubiginosa*: Extraction of oil and antioxidant substances. *Bioresour Technol*. 2007;98(18):3506–12.
  26. Andersson SC, Rumpunen K, Johansson E, Olsson ME. Carotenoid content and composition in rose hips (*Rosa* spp .) during ripening , determination of suitable maturity marker and implications for health promoting food products. *Food Chem* [Internet]. 2011;128(3):689–96. Available from:  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.088>
  27. Roman I, Stănilă A, Stănilă S. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J* [Internet]. 2013 Dec 23;7(1):73. Available from:  
<https://bmcchem.biomedcentral.com/articles/10.1186/1752-153X-7-73>
  28. Fromm M, Bayha S, Kammerer DR, Carle R. Identification and Quantitation of Carotenoids and Tocopherols in Seed Oils Recovered from Different Rosaceae Species. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2012 Oct 31;60(43):10733–42. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf3028446>
  29. Kazankaya A, . NT, . MY, . MFB. Pomological Description of *Rosa canina* Selections from Eastern Anatolia, Turkey. *Int J Bot* [Internet]. 2004 Dec 15;1(1):100–2. Available from:

- <https://www.scialert.net/abstract/?doi=ijb.2005.100.102>
30. Salminen J-P, Karonen M, Lempa K, Liimatainen J, Sinkkonen J, Lukkarinen M, et al. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. *J Chromatogr A* [Internet]. 2005 Jun;1077(2):170–80. Available from:  
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967305008630>
  31. Marchini FB. Estudo morfológico e morfométrico da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos albinos com e sem tratamento com óleo de Rosa Mosqueta. Universidade de São Paulo - Unifesp; 1994.
  32. Eurides, Duvaldo; Silva, Luiz Antônio Franco; Deleck, Carlos Roberto; Freitas, Patrícia Maria Coletto; Alves LB. Efecto del extracto de óleo de rosa mosqueda (*Rosa aff. Rubiginosa*) en la cicatrización de heridas cutâneas. *Rev electrónica Vet* [Internet]. 2011;12(1):1–9. Available from:  
[https://www.researchgate.net/publication/49612023\\_Efecto\\_del\\_extracto\\_de\\_oleo\\_de\\_rosa\\_mosqueda\\_Rosa\\_aff\\_Rubiginosa\\_en\\_la\\_cicatrizacion\\_de\\_heridas\\_cutaneas\\_-\\_Effect\\_of\\_rose\\_mosqueda\\_extract\\_oil\\_Rosa\\_aff\\_Rubiginosa\\_in\\_cutaneous\\_wound\\_healing](https://www.researchgate.net/publication/49612023_Efecto_del_extracto_de_oleo_de_rosa_mosqueda_Rosa_aff_Rubiginosa_en_la_cicatrizacion_de_heridas_cutaneas_-_Effect_of_rose_mosqueda_extract_oil_Rosa_aff_Rubiginosa_in_cutaneous_wound_healing)
  33. González-Mañán D, Espessailles AD, Dossi CG, Martín MS, Mancilla RA, Tapia GS. Rosa mosqueta oil prevents oxidative stress and inflammation through the upregulation of PPAR- $\alpha$  and NRF2 in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *J Nutr*. 2017;147(4):579–88.
  34. Chrubasik C, Roufogalis BD, Müller-Ladner U, Chrubasik S. A systematic review on the *Rosa canina* effect and efficacy profiles. *Phyther Res* [Internet]. 2008 Jun;22(6):725–33. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.2400>
  35. Molezi, Andrea; Albedaña A. Fitomedicina: usos más comunes en Dermatología / Herbal therapy in dermatology. *Dermatol argent*. 2002;8(3):123–34.
  36. Madjarof, Cristiana; Linarelli MCB. Estudo da eficácia percebida na melhora da textura, elasticidade e aparência geral de cicatrizes hipertróficas, através da aplicação do produto cosmético Renopel®. *RBM rev bras med*. 2011;68(5):160–4.

37. Walt V der. Transdermal diffusion stability and clinical efficacy of cosmetic formulations containing Rosa rubiginosa rosehip seed oil AC van der Walt degree Master of Science of Pharmaceutics at the Supervisor : Assistant Supervisor : October 2016 Prof J du Plessis. Potchefstroom Campus of the North-West University; 2016.
38. Ferreira AM, Souza BMV de, Rigotti MA, Loureiro MRD. Utilização dos ácidos graxos no tratamento de feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. Rev da Esc Enferm da USP [Internet]. 2012 Jun;46(3):752–60. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0080-62342012000300030&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0080-62342012000300030&lng=pt&tlng=pt)
39. Rodrigues LM. Desenvolvimento e estudo de estabilidade preliminar de emulsões óleo/água (O/A) a base de óleos vegetais para prevenção e/ou adjuvante no tratamento de úlceras por pressão. Universidade de Brasília; 2013.
40. Costa C da L, França ET de R, Santos DS, Costa MCP, Barbosa M do CL, Nascimento M do DSB. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE ÓLEOS FIXOS ARTESANAIS DO COCO BABAÇU (*Orbignya phalerata*) DE REGIÕES ECOLÓGICAS DO ESTADO DO MARANHÃO, BRASIL. Pesqui em Foco. 2015;20(1):27–38.
41. Manhezi AC, Bachion MM, Pereira ÂL. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. Rev Bras Enferm. 2008;61(5):620–8.
42. Geller FC, Teixeira MR, Pereira ABD, Dourado LPA, Souza DG, Braga FC, et al. Evaluation of the Wound Healing Properties of *Hancornia speciosa* Leaves. Phyther Res. 2015;29(12):1887–93.
43. Lania BG, Morari J, de Almeida AR, da Silva MN, Vieira-Damiani G, de Almeida Lins K, et al. Topical essential fatty acid oil on wounds: Local and systemic effects. PLoS One. 2019;14(1):1–15.
44. Elias PM, Brown BE, Ziboh VA. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: Evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. J Invest Dermatol [Internet]. 1980;74(4):230–3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12541775>
45. Li X, Yang Q, Zheng J, Gu H, Chen K, Jin H, et al. Efficacy and safety of a topical moisturizer containing linoleic acid and ceramide for mild-to-moderate psoriasis vulgaris: A multicenter randomized controlled trial. Dermatol Ther.

- 2020;33(6):1–7.
46. Diniz DGA, Lima EM, Antoniosi Filho NR. Isotretinoína: Perfis farmacológico, farmacocinético e analítico. *Rev Bras Ciências Farm J Pharm Sci*. 2002;38(4):415–30.
  47. Zhang Y-R, Zhao Y-Q, Huang J-F. Retinoid-Binding Proteins: Similar Protein Architectures Bind Similar Ligands via Completely Different Ways. Uversky VN, editor. *PLoS One* [Internet]. 2012 May 4;7(5):e36772. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036772>
  48. Mukherjee S, Date A, Patravale V, Korting HC, Roeder A, Weindl G. Retinoids in the treatment of skin aging: an overview of clinical efficacy and safety. *Clin Interv Aging* [Internet]. 2006 Dec;1(4):327–48. Available from: <http://www.atypon-link.com/DMP/doi/abs/10.2147/ciia.2006.1.4.327>
  49. Budhu AS, Noy N. Direct Channeling of Retinoic Acid between Cellular Retinoic Acid-Binding Protein II and Retinoic Acid Receptor Sensitizes Mammary Carcinoma Cells to Retinoic Acid-Induced Growth Arrest. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2002 Apr 15;22(8):2632–41. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.22.8.2632-2641.2002>
  50. Fisher GJ, Datta SC, Talwar HS, Wang Z-Q, Varani J, Kang S, et al. Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* [Internet]. 1996 Jan;379(6563):335–9. Available from: <http://www.nature.com/articles/379335a0>
  51. Griffiths CEM, Kang S, Ellis CN, Kim KJ, Lawrence JF, Ortiz-Ferrer, LisseWhite MG, et al. *Improvement Degrees*. 2013;
  52. Weinstein GD, Nigra TP, Pochi PE, Savin RC, Allan A, Benik K, et al. Topical Tretinoin for Treatment of Photodamaged Skin: A Multicenter Study. *Arch Dermatol*. 1991;127(5):659–65.
  53. Villagrán M, Muñoz M, Díaz F, Troncoso C, Celis-Morales C, Mardones L. Una mirada actual de la vitamina C en salud y enfermedad. *Rev Chil Nutr* [Internet]. 2019 Dec;46(6):800–8. Available from: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-75182019000600800&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-75182019000600800&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
  54. Cavalari TGF, sanches RA. Os Efeitos da Vitamina C. *Rev Saúde em Foco*. 2018;749–65.
  55. Manela-Azulay M, Mandarim-de-Lacerda CA, Perez M de A, Filgueira AL,

- Cuzzi T. Vitamina C. *An Bras Dermatol* [Internet]. 2003 Jun;78(3):265–72. Available from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0365-05962003000300002&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962003000300002&lng=pt&tlng=pt)
56. Pullar J, Carr A, Vissers M. The Roles of Vitamin C in Skin Health. Bsoul SA, Terezhalmay GT, editors. *Nutrients* [Internet]. 2017 Aug 12;9(8):232–70. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6643/9/8/866>
57. Phillips CL, Combs SB, Pinnell SR. Effects of Ascorbic Acid on Proliferation and Collagen Synthesis in Relation to the Donor Age of Human Dermal Fibroblasts. *J Invest Dermatol* [Internet]. 1994 Aug;103(2):228–32. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X94976635>
58. Chung JH, Youn SH, Kwon OS, Cho KH, Youn J II, Eun HC. Regulations of collagen synthesis by ascorbic acid, transforming growth factor- $\beta$  and interferon- $\gamma$  in human dermal fibroblasts cultured in three-dimensional collagen gel are photoaging- and aging-independent. *J Dermatol Sci* [Internet]. 1997 Sep;15(3):188–200. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181197006075>
59. Queiroz NDCA, Jorge MP, Sousa IMDO, Lima CSP, Matias MCDM, Dal Rio AC, et al. *Arrabidaea chica* for oral mucositis in patients with head and neck cancer: A protocol of a randomised clinical trial. *BMJ Open*. 2018;8(10):6–10.
60. Mota Da Silva L, Boeing T, Somensi LB, Cury BJ, Bispo Steimbach VM, Oliveira Silveria AC De, et al. Evidence of gastric ulcer healing activity of *Maytenus robusta* Reissek: In vitro and in vivo studies. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2015;175:75–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.006>
61. Renda MDO, Soares AS, Wanzeler AMV, Gomes JT TF. Avaliação dos efeitos terapêuticos da andiroba - *carapa guianensis* aubl (meliceae) - na mucosite oral induzida em crianças com câncer submetido à quimioterapia. In: *Anais do V Congresso de Educação em Saúde da Amazônia (COESA)*. Pará: Universidade Federal do Pará; 2016. p. 3.
62. Sousa I, Jorge M, Priolli D, Queiroz N, Carvalho J, Foglio M. Skin formulation containing *Arrabidaea chica* extract for wound-healing. *Planta Med* [Internet]. 2013 Aug 21;79(13). Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0033-1352010>
63. Servat-Medina L, González-Gómez A, Reyes-Ortega F, Sousa IMO, Queiroz N

- de CA, Zago PMW, et al. Chitosan–tripolyphosphate nanoparticles as *Arrabidaea chica* standardized extract carrier: Synthesis, characterization, biocompatibility, and antiulcerogenic activity. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:3897–909.
64. Arnosso BJ de M, Da Costa GF, Schmidt B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutr Bras [Internet]*. 2019 Aug 4;18(1):39. Available from:  
<http://portalatlanticaeditora.com.br/index.php/nutricaoBrasil/article/view/1432>
65. Mesquita SDS, Teixeira CMLL, Servulo EFC. Carotenoids: Properties, applications and market. *Rev Virtual Quim*. 2017;9(2):672–88.
66. Uenojo M, Maróstica Junior MR, Pastore GM. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim Nova [Internet]*. 2007 Jun;30(3):616–22. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000300022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300022&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)
67. Concha J, Soto C, Chamy R, Zúñiga ME. Effect of rosehip extraction process on oil and defatted meal physicochemical properties. *JAOCS, J Am Oil Chem Soc*. 2006;83(9):771–5.
68. ALMEIDA DT de, VIANA TV, COSTA MM, SILVA C de S, FEITOSA S. Effects of different storage conditions on the oxidative stability of crude and refined palm oil, olein and stearin (*Elaeis guineensis*). *Food Sci Technol [Internet]*. 2019 Jun;39(suppl 1):211–7. Available from:  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612019000500211&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612019000500211&tlng=en)
69. Brasil. Vocabulário Controlado de Formas Farmacêuticas, Vias de Administração e Embalagens de Medicamentos, 1ª Edição / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Brasília; 2011.
70. Teixeira CCC. *Farmacotécnica 1 [Internet]*. 1ª. Paes, Roberto; Lima G, editor. Rio de Janeiro: SESES; 2018. 144p p. Available from:  
[https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60816780/ESTACIO\\_BIO\\_FARMACOTECNICA\\_120191006-16659-1npdl3q-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1630532539&Signature=XfCQREggTLVvZO1p6HOZipI5Y3catv53FD3UqhVIYNSZ0fXbG~DLp~7dxq8TINWwMT80sHAP2Vh5tyoYGjO9uwI51s9UgMAvpFLWgxXpU](https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/60816780/ESTACIO_BIO_FARMACOTECNICA_120191006-16659-1npdl3q-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1630532539&Signature=XfCQREggTLVvZO1p6HOZipI5Y3catv53FD3UqhVIYNSZ0fXbG~DLp~7dxq8TINWwMT80sHAP2Vh5tyoYGjO9uwI51s9UgMAvpFLWgxXpU)

71. Toledo, Ana Cristina Oltramari ; Hirata LL, Buffon, Marilene da Cruz M.; Miguel, Marilis Dallarmi; Miguel OG. Fitoterápicos : uma abordagem farmacotécnica  
Fitoterápicos : uma abordagem farmacotécnica. Rev Lecta [Internet].  
2014;21(January 2003):7–13. Available from:  
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-418973?lang=en>
72. Chorilli M, Leonardi GR, Regina H, Salgado N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas Free radicals and antioxidant agents: concepts to application in pharmaceutical and cosmetic formulations. Rev Bras Farm. 2007;88(3).
73. Barry BW. Structure and rheology of emulsions stabilised by mixed emulsifiers. Rheol Acta. 1971;10(1):96–105.
74. Fonseca SG da C. Farmacotécnica de Fitoterápicos. Fortaleza - CE: Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará; 2005. 65p p.
75. Gomes FP, Boldo EM. Estudo de ensaios de permeação e liberação, in vitro, de formas farmacêuticas semissólidas tópicas para padronização dos requisitos de qualidade em uma indústria farmacêutica. Res Soc Dev [Internet]. 2020 Nov 28;9(11):e59491110210. Available from:  
<https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10210>
76. Bolla PK, Clark BA, Juluri A, Cheruvu HS, Renukuntla J. Evaluation of Formulation Parameters on Permeation of Ibuprofen from Topical Formulations Using Strat-M® Membrane. Pharmaceutics [Internet]. 2020 Feb 13;12(2):151. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/12/2/151>
77. Coutinho, Cristal dos Santos Cerqueira; Santos EP. Cremes e Loções: visão geral. Fundam Cosmetol [Internet]. 2014;26:36–8. Available from:  
[https://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/class/artigos/uploads/b5e27-Cremes-e-Locoes-Ed\\_jul\\_ago\\_2014.pdf](https://www.cosmeticsonline.com.br/ct/painel/class/artigos/uploads/b5e27-Cremes-e-Locoes-Ed_jul_ago_2014.pdf)
78. ZANIN SMW, MIGUEL MD, CHIMELLI MC, OLIVEIRA AB. Determinação Do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (Ehl) De Óleos De Origem Vegetal. Visão Acadêmica. 2002;3(1):3–7.
79. Rai VK, Mishra N, Yadav KS, Yadav NP. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications [Internet]. Vol. 270, Journal of Controlled Release. Elsevier B.V; 2018. 203–225 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.11.049>

80. Oliveira AG de, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim Nova*. 2004;27(1):131–8.
81. Anton N, Vandamme TF. Nano-emulsions and Micro-emulsions : Clarifications of the Critical Differences. 2011;978–85.
82. McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*. 2012;8(6):1719–29.
83. Silva JDF da, Silva YP da, Piatnicki CMS, Böckel WJ, Mendonça CRB. Microemulsions: Components, Characteristics, Potentialities in Food Chemistry and Other Applications. *Quim Nova*. 2015;38(9):1196–206.
84. Böckel WJ. Metodologia analítica para a determinação de ácidos graxos de óleo vegetal [Internet]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009. Available from: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/24006/000739272.pdf?...>
85. Hategekimana J, Chamba MVM, Shoemaker CF, Majeed H, Zhong F. Vitamin E nanoemulsions by emulsion phase inversion: Effect of environmental stress and long-term storage on stability and degradation in different carrier oil types. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet]. 2015;483:70–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.03.020>
86. Group IEW. Stability testing of new drug substances and products. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. 1993. p. 15 p.
87. WHO WHO. WHO Guidelines on stability testing of pharmaceutical products containing well-established drug substances in conventional dosage forms [Internet]. World Health Organization; 1994. p. 13 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/62169>
88. Meirelles LMA. Estabilidade De Medicamentos: Estado Da Arte. *Rev Eletrônica Farmácia*. 2014;11(4):06.
89. ANVISA AN de VS. Resolução RDC N° 318 [Internet]. Brasil: Ministério da Saúde; 2021 p. 1–17. Available from: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-318-de-6-de-novembro-de-2019-226513805>
90. Anvisa. Guia sobre requisitos de qualidade para produtos tópicos e transdérmicos. Brasília, Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2021



- p. 19.
91. Knorst MT. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) Compositae - Marcela. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 1991.
  92. Dib W (Org), editor. Farmacopeia brasileira. 6ª. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa; 2019. 874p p.
  93. Kim J, Noh JH, Lee S, Choi JS, Suh H. Methyl Ether ( TDB ) and Its Antioxidant Activity. *Korean Chem Soc.* 2002;23(5):661–2.
  94. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol.* 2011;48(4):412–22.
  95. Oliveira AG de L, Silva RS, Alves EN, Presgrave R de F, Presgrave OAF, Delgado IF. Chorioallantoic membrane assays ( HET-CAM and CAM-TBS ): alternative tests for performing toxicological evaluation of products with low potential for ocular irritation. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2012;71(1):153–9.
  96. Arrêté du 29 Novembre 1996 relatif aux méthodes officielles d'analyses nécessaires aux controles des produits cosmetiques. [Internet]. *Journal Officiel de la République Française*, 300 França; 1996 p. 19137–8. Available from: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000369360>
  97. Balestrin LA, Kreutz T, Fachel FNS, Bidone J, Gelsleichter NE, Koester LS, et al. *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC (Asteraceae) Extract-Loaded Nanoemulsions as a Promising Topical Wound Healing Delivery System: In Vitro Assessments in Human Keratinocytes (HaCaT) and HET-CAM Irritant Potential. *Pharmaceutics* [Internet]. 2021 Aug 12;13(8):1241. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/13/8/1241>
  98. Pal R. Modeling of sedimentation and creaming in suspensions and pickering emulsions. *Fluids.* 2019;4(186):22.
  99. Franzol, Angélica; Rezende MC. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. *Polímeros* [Internet]. 2015;25(spe):9. Available from: <https://www.scielo.br/j/po/a/3zgzkZ5GKyNRyfqVqZYTBM9z/?lang=pt#>
  100. Souza FM. Desenvolvimento de microemulsão contendo minoxidil para o tratamento da alopecia [Internet]. Universidade Federal do Amazonas; 2017. Available from: <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/5772>
  101. Lonni AASG, Munhoz VM, Lopes GC, Longhini R, Borghi-Pangoni FB, dos

- Santos RS, et al. Development and characterization of multiple emulsions for controlled release of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract. *Pharm Dev Technol*. 2016;21(8):933–42.
102. Nogala-Kalucka M, Rudzinska M, Zadernowski R, Siger A, Krzyzostaniak I. Phytochemical content and antioxidant properties of seeds of unconventional oil plants. *JAACS, J Am Oil Chem Soc*. 2010;87(12):1481–7.
  103. Schmidt Š, Niklová I, Pokorný J, Farkaš P, Sekretár S. Antioxidant activity of evening primrose phenolics in sunflower and rapeseed oils. *Eur J Lipid Sci Technol* [Internet]. 2003 Aug 31;105(8):427–35. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.200300842>
  104. Reda SY, Carneiro PIB. Óleos e Gorduras: Aplicações e Implicações. *Rev Anal* [Internet]. 2007;27:60–7. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:leos+e+gorduras+:+aplicaes+e+implicaes#0>
  105. Oliveira VB, Zuchetto M, Paula CS, Verdam MCS, Campos R, Duarte AFS, et al. Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. *Rev Bras Plantas Med*. 2015;17(4):614–21.
  106. Morais NS. Avaliação da citotoxicidade e do potencial bioativo do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) nanoencapsulado em gelatina suína [Internet]. Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2021. Available from: <https://repositorio.ufrn.br/handle/123456789/45653>
  107. Contri R V., Kulkamp-Guerreiro IC, da Silva SJ, Frank LA, Pohlmann AR, Guterres SS. Nanoencapsulation of rose-hip oil prevents oil oxidation and allows obtainment of gel and film topical formulations. *AAPS PharmSciTech* [Internet]. 2016 Aug 17;17(4):863–71. Available from: <http://link.springer.com/10.1208/s12249-015-0379-9>
  108. Machado M, Rodriguez-Alcalá LM, Gomes AM, Pintado M. Vegetable oils oxidation: mechanisms, consequences and protective strategies. *Food Rev Int* [Internet]. 2023 Aug 25;39(7):4180–97. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/87559129.2022.2026378>
  109. Fadda A, Sanna D, Sakar EH, Gharby S, Mulas M, Medda S, et al. Innovative and Sustainable Technologies to Enhance the Oxidative Stability of Vegetable Oils. *Sustainability* [Internet]. 2022 Jan 12;14(2):849. Available from:

- <https://www.mdpi.com/2071-1050/14/2/849>
110. Santos JS dos. Estudo morfológico e morfométrico do processo de cicatrização em ratos Wistar adultos tratados com creme de óleo de Rosa Mosqueta [Internet]. Universidade de Brasília; 2016. Available from: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/22931>
  111. Ahonen E, Damerau A, Suomela J-P, Kortensniemi M, Linderborg KM. Oxidative stability, oxidation pattern and  $\alpha$ -tocopherol response of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6n-3)-containing triacylglycerols and ethyl esters. *Food Chem* [Internet]. 2022 Sep;387:132882. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814622008445>
  112. Choe E, Min DB. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr Rev Food Sci Food Saf* [Internet]. 2006 Sep 29;5(4):169–86. Available from: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>
  113. Nowak K, Jabłońska E, Ratajczak-Wrona W. Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products. *Environ Res* [Internet]. 2021 Jul;198:110488. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0013935120313852>
  114. Boxberger M, Cenizo V, Cassir N, La Scola B. Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome* [Internet]. 2021 Dec 30;9(1):125. Available from: <https://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-021-01062-5>
  115. Nowak K, Ratajczak-Wrona W, Górska M, Jabłońska E. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2018 Oct;474:238–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0303720718301060>
  116. Waqar M, Chari A, Islim AI, Davies BM, Fountain DM, Larkin S, et al. Chlorhexidine dressings could reduce external ventricular drain infections: results from a systematic review and meta-analysis. *J Hosp Infect* [Internet]. 2021 Nov;117:37–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0195670121002395>
  117. Van den Poel B, Saegeman V, Schuermans A. Increasing usage of chlorhexidine in health care settings: blessing or curse? A narrative review of the risk of chlorhexidine resistance and the implications for infection prevention

- and control. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2022 Mar 19;41(3):349–62. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10096-022-04403-w>
118. Horstmann Risso N, Stopiglia CD, Oliveira MT, Haas SE, Ramos Maciel T, Reginatto Lazzari N, et al. Chlorhexidine Nanoemulsion: A New Antiseptic Formulation. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2020 Sep;Volume 15:6935–44. Available from: <https://www.dovepress.com/chlorhexidine-nanoemulsion-a-new-antiseptic-formulation-peer-reviewed-article-IJN>
119. Sousa G, Leal L. New Oils for Cosmetic O/W Emulsions: In Vitro/In Vivo Evaluation. *Cosmetics* [Internet]. 2018 Jan 4;5(1):6. Available from: <https://www.mdpi.com/2079-9284/5/1/6>
120. Weimer P, Lisbôa Moura JG, Mossmann V, Immig ML, de Castilhos J, Rossi RC. Citrus aurantiifolia (Christm) Swingle: Biological potential and safety profile of essential oils from leaves and fruit peels. *Food Biosci* [Internet]. 2021 Apr;40:100905. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2212429221000304>
121. Silva, Jessé de Oliveira; Pimentel, Kilma Gabrielle Barbosa; Santos, Ester Batista de Oliveira; Oliveira, Vimerson Matheus Lucena; Fernandes FH de A. UTILIZAÇÃO DO ENSAIO HET-CAM COMO ALTERNATIVA PARA AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS OFTÁLMICOS. *J Biol Pharm Agric Manag* [Internet]. 2021;17(2):431–42. Available from: [revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm](http://revista.uepb.edu.br/index.php/biofarm)
122. NCI NCI-. Mission statement [Internet]. 2021 [cited 2021 Nov 11]. Available from: <https://www.cancer.gov/>
123. Abdel-Hameed, El-Sayed S.; Bazaid, Salih A.; Shohayeb, Mohamed M.; El-Sayed, Mortada M.; El-Wakil EA. Phytochemical Studies and Evaluation of Antioxidant, Anticancer and Antimicrobial Properties of *Conocarpus erectus* L. Growing in Taif, Saudi Arabia. *European J Med Plants* [Internet]. 2012;2(1):92–112. Available from: <https://journalejmp.com/index.php/EJMP/article/view/28585>
124. Brandão, Camila Maria Martins; Hass, Viviane; Zago, Patrícia W.; Galvão LC de C et al. Action of *Arrabidaea chica* extract on *Candida albicans* biofilms, cytotoxic effect on fibroblasts and keratinocytes, and on physical/mechanical properties of poli(methylmethacrylate) resin. *Res Soc Dev* [Internet]. 2021;10(13):13p. Available from:

- <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/20667/18917>
125. Schappo FB. Nanopartículas de óleo de palma bruto: estabilidade e citotoxicidade [Internet]. Universidade Federal de Santa Catarina; 2021. Available from: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/227095>
  126. King A, Balaji S, Le LD, Crombleholme TM. Regenerative wound healing: the role of Interleukin-10. *Advances wound care*. 2014;3(4):315–23.
  127. Tapia G, Silva D, Romero N, Pettinelli P, Dossi CG, de Miguel M, et al. Role of dietary  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol from *Rosa mosqueta* oil in the prevention of alterations induced by high-fat diet in a murine model. *Nutrition* [Internet]. 2018;53:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.01.012>
  128. Cheng W-L, Lii C-K, Chen H-W, Lin T-H, Liu K-L. Contribution of Conjugated Linoleic Acid to the Suppression of Inflammatory Responses through the Regulation of the NF- $\kappa$ B Pathway. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2004 Jan 14;52(1):71–8. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jf0348626>
  129. Ahn KS, Noh EJ, Zhao HL, Jung SH, Kang SS, Kim YS. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase II by *Platycodon grandiflorum* saponins via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. *Life Sci* [Internet]. 2005 Apr;76(20):2315–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0024320505000329>
  130. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically [Internet]. 10th ed. Wayne, Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015. 89 p. Available from: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://clsi.org/media/1632/m07a\\_10\\_sample.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://clsi.org/media/1632/m07a_10_sample.pdf)
  131. CLSI. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline. [Internet]. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute; 1999. 29 p. Available from: [chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://clsi.org/media/1462/m26a\\_sample.pdf](chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://clsi.org/media/1462/m26a_sample.pdf)
  132. Fluhr, J.W.; Darlenski, R.; Surber C. Glycerol and the skin: holistic approach to its origin and functions. *Br J Dermatol* [Internet]. 2008;159(1):23–34. Available from: <https://academic.oup.com/bjd/article-abstract/159/1/23/6641450>
  133. Mast R. Functions of glycerine in cosmetics. In: Jungermann, Eric; Sonntag NOV, editor. *Glycerine: a key cosmetic ingredient*. 1st ed. Boca Raton: CRC

- Press; 1991. p. 53.
134. Sethi, Anisha; Kaur, Tejinder; Malhotra SG, ML. Moisturizers: the slippery road. *Indian J Dermatol* [Internet]. 2016;61(3):279–87. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4885180/>
  135. Ethier A, Bansal P, Baxter J, Langley N, Richardson N, Patel AM. The Role of Excipients in the Microstructure of Topical Semisolid Drug Products. Vol. 36, *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series*. 2019. 155–193 p.
  136. Xu R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. *Particuology* [Internet]. 2008 Apr;6(2):112–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1674200108000357>
  137. Hassan, Puthusserickal A.; Rana, Suman; Verma G. Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* [Internet]. 2015;31(1):3–12. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la501789z>
  138. Guimarães, Carla Vanessa Dias; Nóbrega GAS da. Estudo do comportamento das propriedades físicoquímicas em sistemas de micela inversa. [Internet]. Universidade Federal Rural do Semiárido; 2020. Available from: <https://repositorio.ufersa.edu.br/handle/prefix/6278>
  139. Clogston, J.D., Patri AK. Zeta potential measurement. In: McNeil, S. (eds) *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. *Methods Mol Biol*. 2011;697.
  140. Nogueira RC. Medicamentos manipulados em dermatologia [Internet]. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias; 2020. Available from: <https://recil.ensinolusofona.pt/bitstream/10437/11844/1/RAFAELA CADIMA NOGUEIRA- dissertacao.pdf>
  141. Costa, Adilson; Pires, Mário César; Zambaldi Fabrício LHB de OT, Liliana; Langen, Stephanie; Bruder Botero E. Estudo clínico multicêntrico para avaliação de segurança e eficácia clínica de um hidratante corporal à base de ceramidas, ômegas, glicerina, Imperata cilíndrica, erythritol e homarine. *Surg Cosmet Dermatology* [Internet]. 2014;6(1):32–8. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=265530997016>
  142. Wang Y, Liang Y, Cock IE. Rosa canina L. fruit extracts inhibit the growth of bacterial triggers of some autoimmune inflammatory diseases and potentiate the activity of conventional antibiotics. *Pharmacogn Commun* [Internet]. 2019

- Dec 17;10(1):7–17. Available from: <http://www.phcogcommn.org/content/243>
143. Ghendov-Moşanu, Aliona; Cojocari, Daniela; Balan, Greta; Sturza R. Antimicrobial activity of rose hip and hawthorn powders on pathogenic bacteria. *J Eng Sci* [Internet]. 2018;25(4):100–7. Available from: <https://zenodo.org/records/2576764>
144. Guarrasi V, Mangione MR, Sanfratello V, Martorana V, Bulone D. Quantification of underivatized fatty acids from vegetable oils by HPLC with UV detection. *J Chromatogr Sci*. 2010;48(8):663–8.
145. Brasil. RESOLUÇÃO-RE Nº 899 [Internet]. Brasil: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2003. Available from: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899\\_29\\_05\\_2003.html](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html)
146. Brasil. RDC 166 [Internet]. Brasil: Ministério da Saúde; 2017. Available from: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC\\_166\\_2017\\_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401)
147. OECD. Test Guideline 428: Skin Absorption: in vitro Method. [Internet]. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.; 2004. Available from: [https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO\(2011\)36/REV1/en/pdf](https://one.oecd.org/document/ENV/JM/MONO(2011)36/REV1/en/pdf)
148. Hoelgaard A, Møllgaard B. Permeation of linoleic acid through skin in vitro. *J Pharm Pharmacol* [Internet]. 1982 Apr 12;34(9):610–1. Available from: <https://academic.oup.com/jpp/article/34/9/610/6198131>
149. Raufast V, Mavon A. Transfollicular delivery of linoleic acid in human scalp skin: Permeation study and microautoradiographic analysis. *Int J Cosmet Sci*. 2006;28(2):117–23.
150. Moore EM, Wagner C, Komarnytsky S. The Enigma of Bioactivity and Toxicity of Botanical Oils for Skin Care. *Front Pharmacol*. 2020;11(May):1–17.
151. Poljšak N, Kočevar Glavač N. Vegetable Butters and Oils as Therapeutically and Cosmetically Active Ingredients for Dermal Use: A Review of Clinical Studies. *Front Pharmacol*. 2022;13(April).
152. Akinshina A, Das C, Noro MG. Effect of monoglycerides and fatty acids on a ceramide bilayer. *Phys Chem Chem Phys* [Internet]. 2016;18(26):17446–60. Available from: <https://xlink.rsc.org/?DOI=C6CP01238H>
153. Francoeur ML, Golden GM, Potts RO. Oleic Acid: Its Effects on Stratum Corneum in Relation to (Trans)Dermal Drug Delivery. Vol. 7, *Pharmaceutical*

- Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists. 1990. p. 621–7.
154. Simard M, Tremblay A, Morin S, Martin C, Julien P, Fradette J, et al.  $\alpha$ -Linolenic acid and linoleic acid modulate the lipidome and the skin barrier of a tissue-engineered skin model. *Acta Biomater*. 2022;140:261–74.
  155. Nugteren DH, Christ-Hazelhof E, van der Beek A, Houtsmuller UMT. Metabolism of linoleic acid and other essential fatty acids in the epidermis of the rat. *Biochim Biophys Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab*. 1985;834(3):429–36.
  156. Jiang SJ, Hwang SM, Choi EH, Ahn SK, Elias PM, Lee SH. Structural and Functional Effects of Oleic Acid and Iontophoresis on Hairless Mouse Stratum Corneum. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2000 Jan;114(1):64–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15407328>
  157. Wertz PW, Downing DT. Metabolism of linoleic acid in porcine epidermis. *J Lipid Res* [Internet]. 1990;31(10):1839–44. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42327-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42327-2)
  158. Bowser PA, Nugteren DH, White RJ, Houtsmuller UMT, Prottey C. Identification, isolation and characterization of epidermal lipids containing linoleic acid. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* [Internet]. 1985 May;834(3):419–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0005276085900165>
  159. Brasil. RE nº 196. Conselho Nacional de Saúde Brasil: Ministério da Saúde; 1996.
  160. Newton PM, Watson JA, Wolowacz RG, Wood EJ. Macrophages restrain contraction of an in vitro wound healing model. *Inflammation*. 2004;28(4):207–14.
  161. Lei Z, Cao Z, Yang Z, Ao M, Jin W, Yu L. Rosehip Oil Promotes Excisional Wound Healing by Accelerating the Phenotypic Transition of Macrophages. *Planta Med* [Internet]. 2019 May 10;85(07):563–9. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/a-0725-8456>
  162. Kay EJ, Koulouras G, Zanivan S. Regulation of Extracellular Matrix Production in Activated Fibroblasts: Roles of Amino Acid Metabolism in Collagen Synthesis. *Front Oncol* [Internet]. 2021 Aug 27;11. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2021.719922/full>
  163. Pellenz NL, Barbisan F, Azzolin VF, Duarte T, Bolognon A, Mastella MH, et al.

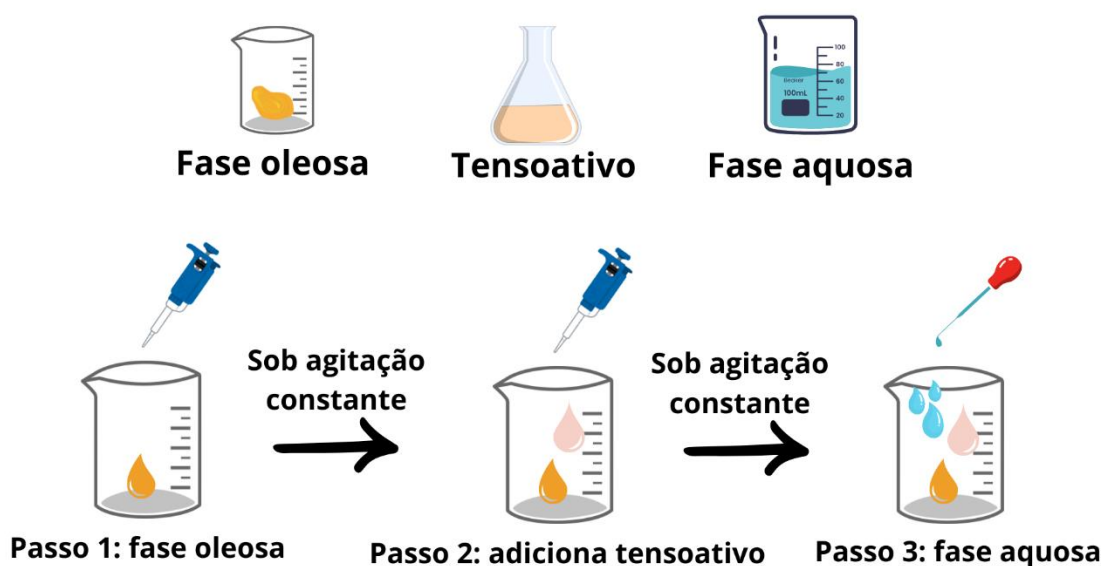


- Analysis of in Vitro Cyto- and Genotoxicity of Barbatimão Extract on Human Keratinocytes and Fibroblasts. *Biomed Res Int*. 2018;2018.
164. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Role of TGF- $\beta$  in Skin Chronic Wounds: A Keratinocyte Perspective. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 28;9(2):306. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/306>
  165. Shi A, Li J, Qiu X, Sabbah M, Boroumand S, Huang TC-T, et al. TGF- $\beta$  loaded exosome enhances ischemic wound healing in vitro and in vivo. *Theranostics* [Internet]. 2021;11(13):6616–31. Available from: <https://www.thno.org/v11p6616.htm>
  166. Vaidyanathan L. Growth Factors in Wound Healing – A Review. *Biomed Pharmacol J* [Internet]. 2021 Sep 30;14(3):1469–80. Available from: <https://biomedpharmajournal.org/vol14no3/growth-factors-in-wound-healing-a-review/>
  167. Costa Filho OAA da, Ribas Filho JM, Ariede BL, Cavalcanti T, Scapini JGS, Pasetto CV. Avaliação da eficácia de três marcadores imunoistoquímicos envolvidos nos diferentes tempos da cicatrização da ferida cirúrgica. *Rev Col Bras Cir*. 2017;44(4):367–73.
  168. Geng K, Ma X, Jiang Z, Gu J, Huang W, Wang W, et al. WDR74 facilitates TGF- $\beta$ /Smad pathway activation to promote M2 macrophage polarization and diabetic foot ulcer wound healing in mice. *Cell Biol Toxicol* [Internet]. 2023 Aug 19;39(4):1577–91. Available from: <https://link.springer.com/10.1007/s10565-022-09748-8>
  169. Liarte S, Bernabé-García Á, Nicolás FJ. Human Skin Keratinocytes on Sustained TGF- $\beta$  Stimulation Reveal Partial EMT Features and Weaken Growth Arrest Responses. *Cells* [Internet]. 2020 Jan 20;9(1):255. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/1/255>
  170. Chalmers RL. The evidence for the role of transforming growth factor-beta in the formation of abnormal scarring. *Int Wound J* [Internet]. 2011 Jun 30;8(3):218–23. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-481X.2011.00771.x>
  171. Wang X-J, Han G, Owens P, Siddiqui Y, Li AG. Role of TGF $\beta$ -Mediated Inflammation in Cutaneous Wound Healing. *J Investig Dermatology Symp Proc* [Internet]. 2006 Sep;11(1):112–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15526213>

172. Ruiz-Cañada C, Bernabé-García Á, Liarte S, Rodríguez-Valiente M, Nicolás FJ. Chronic Wound Healing by Amniotic Membrane: TGF- $\beta$  and EGF Signaling Modulation in Re-epithelialization. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2021 Jul 6;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2021.689328/full>

## APÊNDICE A - ESQUEMA DE ELABORAÇÃO DAS MICROEMULSÕES

As microemulsões são elaboradas com o uso de uma fase oleosa, uma fase aquosa e um tensoativo. O tensoativo pode conter apenas um elemento ou ser uma combinação de tensoativos e cotensoativo para ajuste do EHL. No geral, a ordem de adição dos elementos não irá interferir na formação das microemulsões. Mas em nosso estudo, realizamos a adição de cada elemento da seguinte forma:



O primeiro desafio nesse processo, é justamente encontrar a mistura de tensoativos e a proporção adequadas. Em nosso estudo, testamos uma mistura de Tween 80 e Span 80 (8:2, 7:3), Tween 80 e glicerina (9:1; 9,5:0,5) e apenas o uso de Tween 80.

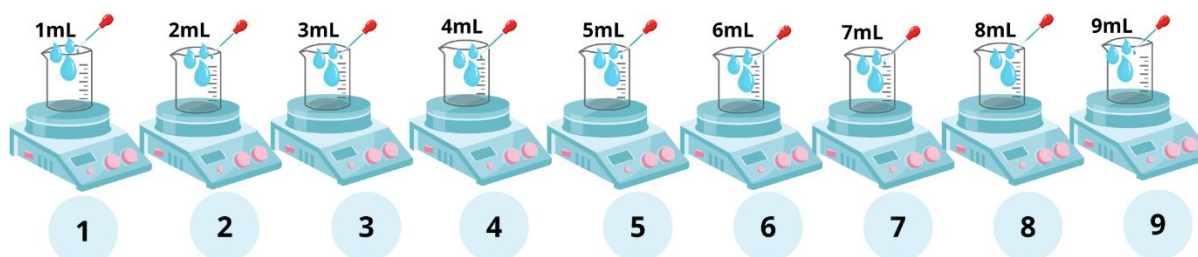
Um outro ponto importante observado, é que, frequentemente, faz-se uma mistura de tensoativo com cotensoativo. Contudo, em nosso estudo, a melhor forma de atingir o sistema microemulsionado, foi misturando o cotensoativo ao óleo de interesse em proporções de 1:1 ou 1:2.

Para encontrar os pontos de microemulsão, é necessário avaliar todas as proporções de fase aquosa, tensoativo e fase oleosa possíveis. Assim, inicia-se com o mínimo volume de fase oleosa possível para o máximo volume de teosoativo, em valores normalizados. Por exemplo, perfazendo um volume total de 1mL (mas que pode variar com o volume de microemulsão que você deseja elaborar), começa-se com 100mcL de fase oleosa e 900mcL de tensoativo em todos os béqueres, aos

quais se realiza a titulação da fase aquosa, como no exemplo abaixo:

**Fase oleosa: 100mcl**

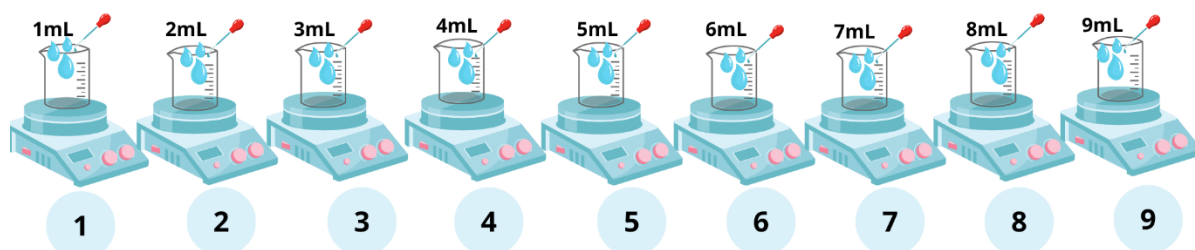
**Tensoativo: 900mcl**



Observe que há uma equivalência entre a fase oleosa + tensoativo e a fase aquosa. Assim, em cada béquer, a água é titulada em volume equivalente ao da fase oleosa + tensoativo. Em nosso exemplo, o volume total de fase oleosa + tensoativo foi de 1mL. Assim, a cada béquer, a água é titulada nas proporções 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e assim sucessivamente até 1:9, quando haverá, no béquer, 1mL de fase oleosa + tensoativo e 9mL de fase aquosa. Esse mesmo processo deve ser repetido para cada proporção de fase oleosa + tensoativo:

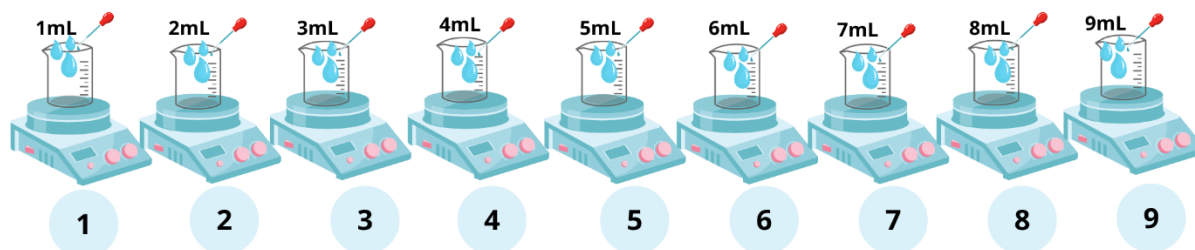
**Fase oleosa: 200mcl**

**Tensoativo: 800mcl**



**Fase oleosa: 300mcl**

**Tensoativo: 700mcl**



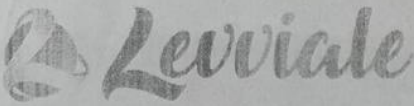
Ao final, serão elaboradas 81 formulações, com diferentes proporções de fase aquosa, tensoativo e fase oleosa. As formulações identificadas como microemulsões são descritas em proporções de fase aquosa, oleosa e tensoativo calculado a partir do volume final. Por exemplo:

Fase Oleosa mL	Tensoativo mL	Fase aquosa mL	Volume Final mL	%Fase Oleosa	%Tensoativo	%Fase Aquosa
0,1	0,9	1	2	5%	45%	50%
0,1	0,9	2	3	3,33%	30%	66,6%
0,1	0,9	3	4	2,5%	22,5%	75%
...						
0,2	0,8	1	2	10%	40%	50%
0,2	0,8	2	3	6,6%	26,6%	66,6%
0,2	0,8	3	4	5%	20%	75%
0,2	0,8	4	5	4%	16%	80%
...						

Para um exemplo prático da elaboração de microemulsão, acesse:  
<https://youtu.be/8OqF0CaC1tk>

## ANEXO 1 - LAUDO DE QUALIDADE DO ÓLEO DE ROSA MOSQUETA UTILIZADO NO ESTUDO

SAT (11) 2165-9259  
 www.levviade.com.br  
 C.C. 09/000000



### Certificado de Análise

Produto: Óleo de Rosa Mosqueta Sinonímia: Não aplicável Nome Químico: Não aplicável Nome científico: <i>Rosa rubiginosa affinis</i> Fórmula Molecular: Não aplicável Lote Original: 62/03 Data Fab: 01/08/2018 Origem: Brasil Fabricante: MPR Data de Emissão: 17/10/2018	P.M: Não aplicável Lote Interno: 3026 Data Val: 01/02/2020 Procedência: Brasil DCB: Não aplicável      CAS: 84603-93-0
--	--

TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS
Densidade (20°C)	0,912 a 0,933 g/cm <sup>3</sup>	0,92 g/cm <sup>3</sup>
Índice de Acidez	Máximo 1,0 mgKOH/g	0,17 mgKOH/g
Índice de Iodo	150 a 195 cgl/g	160 cgl/g
Índice de Peróxido	Máximo 5,0 meq/Kg	0,1 meq/Kg
Índice de Saponificação	184 a 210 mgKOH/g	186 mgKOH/g
Cor	De amarelo claro a alaranjado	De acordo
Odor	Característico	De acordo
Umidade	Máximo 0,3%	0,1%

Referência: Especificação interna do fabricante.

Metodologia: Metodologia do Fabricante.

Conservação: Conservar em recipiente hermético protegido de umidade, ao abrigo de luz e calor.  
 Controle da Temperatura: 15 a 30°C. Controle da Umidade: Não mais que 70%.

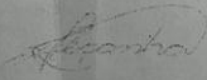
Higroscópico: Sim ( ) Não ( x )

Fotossensível: Sim ( ) Não ( x )

Conclusão: Todos os resultados estão dentro das especificações.

OBS.: Transcrição do certificado do Fornecedor.  
 Certificado Original se encontra à disposição de nossos clientes.  
 Esse produto encontra-se na embalagem original do fornecedor. Não foi realizado o processo de fracionamento nas instalações da Embrafarma – Diadema.

**Resultado: (X) Aprovado**

  
 Dra. Juliana Ferreira Peçanha  
 CRF – SP 38413  
 Farmacêutica Responsável Técnica

Matriz | VP - 1D, Quadra 2 - Módulos 3 e 4  
 Diadema - Arapópolis - GO - CEP 75132-035 | Fone: (62) 3316.1244

Filial | Av. Deputado Desvaldo Mourão d'Almeida, 35  
 GPQ - Conceição - Diadema - SP - CEP: 09991-100 | Fone: (11) 2165-9259

## ANEXO 2 - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUMANA

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Uso de células humanas para pesquisas in vitro, em substituição a experimentação animal.

**Pesquisador:** Juliana Lott de Carvalho

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30175020.0.0000.5558

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília - UNB

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.954.541

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa em sua primeira versão que visa investigar o uso de células humanas para pesquisas in vitro em substituição à experimentação em animais. A pele é o maior órgão do corpo e tem funções essenciais ao organismo como proteger o organismo de insultos externos, homeostase de fluidos e detecção sensorial. Por este motivo, é o primeiro órgão insultado por substâncias tóxicas aplicadas topicamente, lesões mecânicas, infecções, dentre outros. Pesquisas envolvendo este órgão incluem a busca de agentes regenerativos, que limitem o comprometimento estético e funcional da pele com cicatrizes; a avaliação da capacidade de novos produtos (ex. peptídeos) penetrarem na pele; a pesquisa envolvendo o envelhecimento da pele e desenvolvimento de novos extratos com potencial cosmético. Entre os modelos de pesquisa que representem a pele disponíveis atualmente estão as linhagens celulares imortalizadas, as células primárias (diretamente isoladas de tecidos humanos) e os modelos animais. Dentre eles, as células primárias destacam-se pois não são artificialmente imortalizadas como as linhagens celulares imortalizadas são, e não apresentam questões éticas nem dissimilaridade genética, como os modelos animais. Portanto, as células humanas compõem os modelos que mais fielmente mimetizam a pele humana e são interessantes também por substituir os animais como modelo de pesquisa. 30 indivíduos de 18 a 60 anos, de ambos os sexos, consideradas aptos (com base nos exames indicados pelo médico responsável) que passarem por procedimento cirúrgico estético (lipoaspiração, abdominoplastia, blefaroplastia, ou outros), que assinarem o TCLE irão compor a

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA



Continuação do Parecer: 3.954.541

amostra. A estratégia de recrutamento será por meio de convite feito pela médica Dra. Márcia Moreira aos pacientes de sua clínica de cirurgia plástica que atenderem aos critérios de inclusão. Serão excluídos do estudo menores de 18 anos ou maiores de 60 anos e pacientes considerados inaptos a realizar o procedimento cirúrgico. A clínica Márcia Moreira Cirurgia Plástica, localizada em Brasília ficará responsável pela coleta do material humano (pele e tecido adiposo) que seria descartado. Será apresentado aos pacientes que irão realizar procedimentos de lipoaspiração, blefaroplastia, abdominoplastia, ou outros, o projeto de pesquisa e o TCLE. Evidencia-se que o procedimento de escolha dos indivíduos doadores das amostras não será alterado em nada em função do presente projeto. Apenas as amostras de tecido humano que seriam descartadas serão entregues à pesquisadora principal. Não haverá remuneração alguma à clínica ou aos pacientes. Os procedimentos para o isolamento das células da epiderme, derme e tecido adiposo estão detalhados no projeto de pesquisa.

**Objetivo da Pesquisa:**

O objetivo da proposta é obter tecidos de pele e tecido adiposo humanos para isolamento, expansão, caracterização e utilização em pesquisa científica e tecnológica, aplicada sobretudo à testagem de novos cosméticos e medicamentos aplicados à pele humana.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O risco ou desconforto relatado pelo pesquisador é mínimo e que eventualmente será o da entrevista aplicada pela médica coletora do material. O risco atribuível às informações coletadas serão mitigadas pelo seu completo sigilo. Ademais, o procedimento cirúrgico pelo qual o paciente irá passar não será alterado de nenhuma forma em função da pesquisa, não acarretando nenhum risco adicional ao paciente neste estágio. Apenas após o procedimento, ao invés do excesso de tecido eventualmente retirado do paciente ser eliminado, este será encaminhado ao laboratório para isolamento de células e realização de pesquisa científica. Esta proposta poderá não trazer benefícios diretos ao paciente, mas as células obtidas a partir dos tecidos coletados serão de grande valia no desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, cosméticos, objetos de pesquisa do grupo proponente. A proposta também propõe potencialmente salvar a vida de milhares de animais, que deixarão de ser usados em pesquisas para desenvolvimento destes produtos. O doador estará contribuindo para a evolução da ciência e desenvolvimento de produtos mais seguros e eficazes pelo simples gesto de doar os subprodutos da sua cirurgia, que normalmente seriam descartados. A participação na pesquisa não acarretará gasto ao paciente, sendo totalmente gratuita.

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** ceptm@unb.br



**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 3.954.541

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa prevê respeito ao participante em sua dignidade e autonomia, pondera os riscos e benefícios, garante o direito à privacidade das informações dos pacientes, bem como que o material biológico doado será utilizado exclusivamente na pesquisa. Por fim mostra o benefício social do desenvolvimento de um modelo para a testagem de drogas e medicamentos que trará um impacto socioambiental enorme frente à não utilização de experimentação em animais.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados, em conformidade com a Resolução 466/CNS, os seguintes documentos: projeto detalhado da pesquisa, resumo estruturado, termo de ciência das instituições participantes, termo de compromisso dos pesquisadores, termo para utilização de dados individuais e institucionais, currículo lattes atualizado da pesquisadora principal, orçamento e cronograma atualizado. Cabe ressaltar que no projeto original consta o nome da pesquisadora associada, Dra. Márcia Moreira.

**Recomendações:**

Ajuntar ao processo o Currículo Lattes atualizado dos últimos 6 meses da Dra. Márcia Moreira.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto não apresenta impedimentos éticos. O parecer do colegiado foi pela aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O colegiado em reunião extraordinária de 01/04/2020 aprovou o projeto. De acordo com a Resolução 466/2012-CONEP/CNS, itens X.1. - 3.b. e XI. -2.d, este Comitê chama a atenção da obrigatoriedade de envio do relatório parcial semestral e final do projeto de pesquisa para o CEP-FM, através de Notificações submetidas pela Plataforma Brasil, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1070199.pdf	12/03/2020 10:46:59		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa_Brochura.pdf	12/03/2020 10:46:20	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Orcamento.pdf	12/03/2020 10:44:48	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

Endereço: Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.910-900  
 UF: DF Município: BRASÍLIA  
 Telefone: (61)3107-1918 E-mail: ceptm@unb.br

**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 3.954.541

Cronograma	Cronograma.pdf	12/03/2020 10:33:44	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Pesquisadores	12_Termo_de_Resp_e_Compromisso_F esq_Responsvel.pdf	12/03/2020 10:24:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	04_Carta_de_Encaminhamento_de_proj etos.pdf	12/03/2020 10:22:33	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Juliana_Lott.pdf	12/03/2020 10:20:53	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_de_concordancia_institucional.p df	12/03/2020 10:15:38	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Outros	Termo_concordancia_participante.pdf	12/03/2020 10:14:16	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pdf.pdf	12/03/2020 10:12:51	Juliana Lott de Carvalho	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/03/2020 10:09:19	Juliana Lott de Carvalho	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 04 de Abril de 2020

Assinado por:

**Antônio Carlos Rodrigues da Cunha  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASÍLIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** cepfm@unb.br