



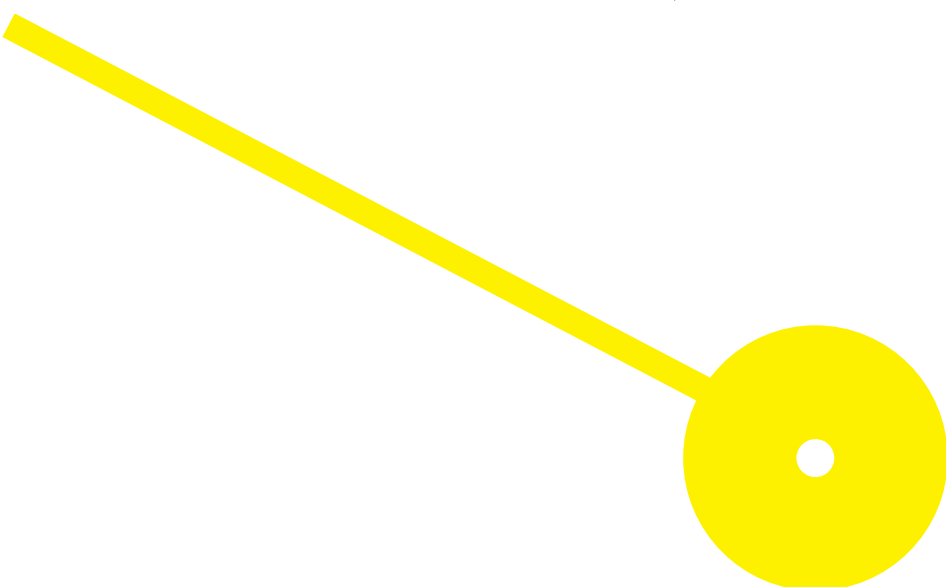
MESTRADO

FARMÁCIA – TECNOLOGIA DO MEDICAMENTO E DE PRODUTOS DE SAÚDE

Desenvolvimento galénico teórico de uma emulsão cutânea óleo em água contendo *Artemisia campestris L.*

Joana Alão Vilar

12/2020





**ESCOLA
SUPERIOR
DE SAÚDE**



**Desenvolvimento galénico teórico de uma emulsão cutânea óleo em água contendo
Artemisia campestris L.**

Autor

Joana Alão Vilar

Orientadores

Prof. Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),
Escola Superior de Saúde (ESS), Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Prof. Doutora Ana Isabel de Freitas Tavares de Oliveira, Centro de Investigação em Saúde e
Ambiente (CISA), Escola Superior de Saúde (ESS), Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Área de Especialização em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Agradeço às professoras Ana Isabel e Cláudia Pinho pois sem elas este trabalho não seria de todo possível. Um enorme obrigada do tamanho do mundo por todo o esforço, paciência, empenho, dedicação, incentivo, profissionalismo e carinho que sempre demonstraram.

À Escola Superior de Saúde e aos excelentes professores e colegas com quem tive oportunidade de me cruzar ao longo destes anos.

À Inês pela sua amizade, por nunca me ter deixado desamparada e por me ter ajudado sempre que necessitei.

Aos meus pais por sempre me apoiarem, incentivarem e darem força para ir mais além.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão desta etapa.

Resumo

A procura por cosméticos tem aumentado, nas últimas décadas, assim como a exigência dos seus utilizadores, o que torna necessário o desenvolvimento de novas formulações. As novas formulações apresentam características distintas, no sentido de tentar aliar a função cosmética à prevenção de inúmeras condições cutâneas. As plantas medicinais, apesar de usadas desde a antiguidade, continuam a ter um papel fundamental na prevenção e tratamento de patologias cutâneas. Assim, tirando o proveito das substâncias ativas de extratos vegetais e combinando-as com as formulações cosméticas, torna-se possível produzir produtos que, para além das características inerentes a uma formulação cosmética, tenham a capacidade de prevenir danos como o caso do envelhecimento cutâneo e de reduzir a inflamação da pele. A *Artemisia campestris L.* é uma planta com aplicações para inúmeras patologias, podendo destacar-se a sua atividade antioxidante e anti-inflamatória. O objetivo do presente trabalho é a produção de um documento de apoio ao desenvolvimento galénico de uma emulsão com extratos de *Artemisia campestris L.* com propriedades de proteção e regeneração cutânea. É explorada a formulação galénica base e os parâmetros que contribuem para que uma emulsão seja eficaz, mas também estável e segura. Futuramente seria importante o complemento deste trabalho com os respetivos ensaios laboratoriais.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Artemisia campestris L.*, Atividade antioxidante, Emulsão, Produto cosmético

Abstract

The demand for cosmetic products has been increasing in the last decades, making it necessary to develop new cosmetic formulations. These new formulations present different characteristics trying to combine the cosmetic function with the prevention of innumerable skin conditions. Despite being used since ancient times, medicinal plants still play an important role nowadays, both in prevention and treatment of pathologies. Therefore, when combining extracts from medicinal plants to cosmetics, it is possible to produce products that, in addition to the inherent characteristics of cosmetic formulations, have the ability to prevent damage such as skin aging and skin inflammation. *Artemisia campestris L.* is a medicinal plant that has several applications for numerous pathologies due to its antioxidant and anti-inflammatory activity. The purpose of this study is to produce a document that can support the galenic development of an emulsion with extracts of *Artemisia campestris L.* with protective and regenerating properties. The basic galenic formulation and the parameters that contribute for an emulsion to be effective are explored, as well as stability and safety tests. In the future, it would be important to complement this work with the respective laboratory tests.

Keywords: Medicinal plants, *Artemisia campestris L.*, Antioxidant activity, Emulsion, Cosmetic product

Índice	
Resumo	III
Abstract	IV
Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas	VII
Lista de Tabelas	VIII
Lista de Figuras	IX
Introdução	1
1. A pele como órgão	1
2. Importância das plantas medicinais e dos compostos bioativos	3
2.1. Produção de extratos vegetais	5
3. <i>Stress</i> oxidativo e compostos antioxidantes	6
4. Produtos cosméticos	7
4.1. Composição e propriedades de um produto cosmético	9
4.2. Abordagem aos sistemas dispersos: Emulsões	10
4.2.1. Agentes emulsificantes na estabilidade da emulsão	11
4.2.2. Mecanismos de ação dos emulsificantes	12
4.2.3. Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)	13
5. <i>Artemisia campestris</i> L.	14
Métodos	16
Resultados	16
6. Atividade antioxidante de extratos de <i>A. campestris</i> L.	16
6.1. Preparação de extrato de <i>A. campestris</i> L.	17
6.2. <i>Screening</i> fitoquímico de extrato de <i>A. campestris</i> L.	21
6.3. Determinação da capacidade antioxidante	22
6.4. Determinação <i>in vitro</i> do potencial protetor do extrato de <i>A. campestris</i> L.	23
6.5. Desenvolvimento teórico da formulação	24
6.5.1. Preparação da emulsão	24
6.5.2. Critérios de seleção preliminares e preparação da emulsão	25
6.5.3. Métodos de preparação de emulsões	25
6.6. Estabilidade das emulsões	26
6.7. Controlo de qualidade de emulsões empregues como cosméticos	27

6.7.1.	Controlo químico.....	27
6.7.2.	Controlo físico.....	28
6.7.3.	Controlo bacteriológico.....	28
6.8.	Ensaio de estabilidade.....	29
6.8.1.	Testes de <i>stress</i> térmico.....	30
6.8.2.	Ciclos de congelamento e descongelamento.....	30
6.8.3.	Exposição à luz solar	31
6.8.4.	Análise organolética	31
6.8.5.	Determinação do pH.....	32
6.8.6.	Determinação da viscosidade.....	32
6.8.7.	Determinação da extensibilidade.....	32
6.8.8.	Determinação da textura.....	33
6.8.9.	Estudo do comportamento reológico.....	33
7.	Preparação da emulsão O/A contendo extrato de <i>A. campestris</i> L.....	33
	Considerações finais.....	35
	Referências bibliográficas	37

Lista de abreviaturas, acrónimos e siglas

ABTS – 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico
A/O – Água em Óleo
ATP – Adenosina Trifosfato
BHT – Hidroxitolueno butilado
CA – Ácido cafeico
CAE – Equivalentes ácido cafeico
CE – Equivalentes catequina
CFT – Compostos Fenólicos Totais
CLEA – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH – 2,2 difenil-1-picrilidrazila
EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético
EHL – Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo
FRAP – Ensaio do poder redutor do ferro
GAE – Equivalentes de ácido gálico
IC₅₀ – 50% da concentração inibitória máxima
MTT – 4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo
NA – Não aplicável
O/A – Óleo em Água
OH⁻ – Grupo Hidroxilo
OMS – Organização Mundial de Saúde
ORAC – Ensaio radial peroxil
QE – Equivalente quercetina
RE – Equivalentes de rutina
ROS – Espécies Reativas de Oxigénio
RNS – Espécies Reativas de Nitrogénio
UV – Ultravioleta

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atividade e valor do EHL de emulsificantes -----	13
Tabela 2. Ensaio antioxidante com extrato de <i>A. campestris</i> L. L. (partes aéreas), com referência ao extrato, método de extração e compostos bioativos -----	18

Lista de Figuras

Figura 1 Anatomia da pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo)-----	1
Figura 2. Grupos de compostos fenólicos derivados de plantas e alguns compostos representativos dos grupos -----	4
Figura 3. Método de obtenção de compostos ativos através das plantas -----	6
Figura 4. <i>Artemisia campestris L.</i> -----	14
Figura 5. Alteração na estabilidade de emulsões-----	26
Figura 6. Fluxograma da produção de uma emulsão O/A com <i>A. campestris L.</i> -----	34

Introdução

1. A pele como órgão

A pele é conhecida como sendo o maior órgão do corpo humano (1,2), cobrindo toda a superfície corporal (3). De entre as suas variadas funções, é a primeira barreira orgânica na defesa contra agentes físicos, químicos e microrganismos patológicos (3,4). Atua ativamente na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, prevenindo perdas excessivas de água e eletrólitos, auxiliando na regulação da temperatura corporal e desempenhando um papel excretor de variados metabolitos (2,4). É também um órgão sensorial *major*, contendo terminações nervosas sensoriais e autonómicas e recetores que detetam estímulos de toque, vibração, pressão, temperatura, e irritação química, traduzidos por dor e prurido (3). É um dos grandes contribuintes para a vigilância e resposta imunológica do organismo (3,4).

Trata-se de um órgão complexo do ponto de vista histológico, sendo constituída pela epiderme, separada da derme por uma membrana basal, abaixo da qual se encontra a hipoderme, constituída maioritariamente por tecido celular subcutâneo (3–5) (Figura 1).

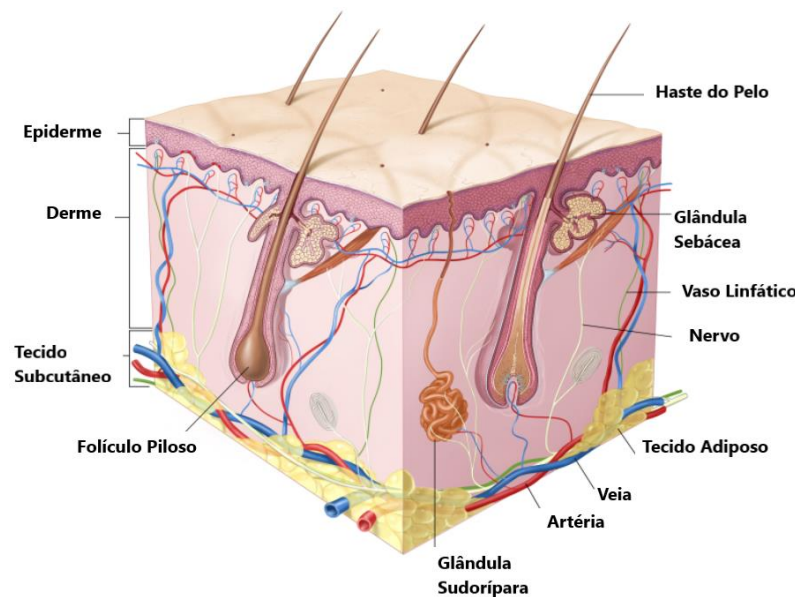


Figura 1 Anatomia da pele (epiderme, derme e tecido subcutâneo). Adaptado de *PDQ Screening and Prevention Editorial Board. National Cancer Institute (US)* (6).

A epiderme é a camada mais superficial e biologicamente ativa, sendo histologicamente caracterizada por um epitélio escamoso estratificado em constante renovação (3,5). Cerca de 95% das células da epiderme são queratinócitos, existindo também melanócitos, células de Langerhans, mediadoras de resposta imunológica (3) e células de Merkel, com atividade mecanoreceptora (3,4).

A derme é constituída por fibras de colagénio e elastina, fibronectina, proteoglicanos e glicaminoglicanos, sendo o seu principal componente os fibroblastos, responsáveis pela produção de colagénio (3,4). Divide-se em duas regiões distintas: a derme papilar superior e a derme reticular inferior. A derme papilar é composta por colagénio, fibras de elastina, fibroblastos, dendrócitos, mastócitos, vasos sanguíneos e terminações nervosas. A derme reticular contém fibras de colagénio compactadas, menor número de fibroblastos, fibras de elastina mais densas e redes vasculares e nervosas (3,5). Mais de 90% das fibras dérmicas são constituídas por colagénio intersticial, proporcionando resistência à pele. As fibras de elastina são responsáveis pela elasticidade do tecido cutâneo (3).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele, encontrando-se abaixo da derme e acima do músculo subjacente. É um agente isolante, protege contra ferimentos mecânicos e é uma fonte de reserva de energia (3). As principais células da hipoderme são os adipócitos, estando dispostos em lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo (3,5). Na hipoderme podem ainda encontrar-se fibroblastos e macrófagos (5).

As estruturas epiteliais especializadas localizam-se maioritariamente na derme e hipoderme, possuindo uma conexão com a epiderme e a superfície cutânea. Incluem os folículos pilossebáceos, as glândulas secretoras e as glândulas sudoríparas apócrinas. Têm um importante papel na fase de epitelização da cicatrização de feridas e na secreção de metabolitos (3).

A área mais complexa e desafiante para os formuladores de produtos para aplicação tópica é o rosto. A pele da face é, genericamente, a mais fina do corpo, com exceção da pele circundante do olho, sendo assim fácil de danificar, mas também rapidamente reparável. No entanto, o facto de ser tão fina facilita a penetração de compostos irritantes e alergénios, requerendo mais cuidado na formulação dos produtos. Um cuidado de limpeza e hidratação adequado permite manter a saúde da pele e a integridade da barreira cutânea. A aparência normal da pele, o equilíbrio hídrico e a contínua integridade da barreira cutânea necessitam de uma barreira cutânea intacta mantendo o conteúdo de água necessário para as funções fisiológicas e enzimáticas da pele. Como a epiderme é uma unidade viva dinâmica, as funções fisiológicas ocorrem num processo contínuo. Havendo uma perturbação na integridade da barreira cutânea são necessários ajustes e reparos para que esta retorne ao seu estado fisiológico de funcionamento normal (7).

Tendo em conta as inúmeras funções e a grande superfície corporal que protege, são inúmeras as condições patológicas associadas à pele, tendo como exemplos alterações de pigmentação, rugas, fotoenvelhecimento, inflamação, acne e neoplasias. Não obstante a existência de um grande investimento a nível de investigação científica no sentido do tratamento das mais diversas condições cutâneas, verifica-se a necessidade de uma maior exploração de diferentes opções terapêuticas, dado o fenótipo variável característico das patologias cutâneas (1).

As doenças inflamatórias da pele são patologias dermatológicas extremamente comuns. A inflamação da pele é caracterizada por rubor, edema, calor, prurido e dor, podendo manifestar-se de forma aguda ou crônica, sendo que uma manifestação aguda pode progredir para uma manifestação crônica. A inflamação aguda pode resultar da exposição à radiação ultravioleta (UV), radiação ionizante, alergénios ou contacto com químicos irritantes. Assim que o estímulo desencadeador seja eliminado, as manifestações inflamatórias cessam em uma a duas semanas, com pouca destruição tecidual. No caso da inflamação crônica, esta pode causar danos consideráveis e irreversíveis na pele (7).

2. Importância das plantas medicinais e dos compostos bioativos

Uma planta medicinal é qualquer planta que possua constituintes que possam ser utilizados para fins terapêuticos e preventivos de diversas patologias (8). A procura de plantas medicinais é um investimento crescente (9) devido à descoberta da existência de inúmeros efeitos adversos inerentes aos compostos ativos dos fármacos presentemente comercializados, efeitos estes que podem ser evitados com a utilização de extratos vegetais (10–12). Os fármacos apresentam normalmente apenas um único princípio ativo responsável pelo seu efeito terapêutico, enquanto que os extratos vegetais apresentam misturas de substâncias ativas que, muitas vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes (13). Assim, as plantas medicinais são frequentemente utilizadas na sociedade moderna como alternativas e/ou adjuvantes dos compostos sintéticos (14).

Ao longo dos séculos, de modo a garantirem a sua sobrevivência e evolução, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa, nomeadamente químicos, tornando a sua constituição complexa, no que diz respeito aos compostos que as constituem (13). Apesar dos grandes avanços verificados nas últimas décadas com a medicina moderna, as plantas continuam a ter uma grande contribuição nos cuidados de saúde (9,15). Nas culturas ancestrais procedia-se à recolha metódica e científica de informações sobre as plantas medicinais e os seus extratos vegetais, dando depois origem às farmacopeias (16). Estima-se que o conhecimento profundo acerca de remédios naturais fornecido pelas culturas tradicionais se desenvolveu através de processos de tentativa-erro ao longo dos séculos, sendo transmitido de geração em geração (14).

Os produtos naturais e os seus derivados representam mais de 50% dos fármacos utilizados em todo o mundo (14). Durante séculos as pessoas procuraram os remédios naturais para tratar diversas patologias, sendo que esta procura continua a aumentar (17). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reportou que 80% da população mundial utiliza plantas medicinais nos cuidados de saúde primários e quotidianos (18). A medicina alopática moderna tem por base a medicina anciã e muitos dos fármacos mais recentemente descobertos e comercializados têm por base a experiência e conhecimento da medicina tradicional (14).

Os metabolitos são compostos orgânicos biologicamente ativos, sintetizados pelas plantas, com a capacidade de fornecerem benefícios para a saúde (7,17). Podem ser classificados em primários e secundários (17). Os metabolitos primários são produzidos por todas as espécies de plantas e são caracterizados por serem indispensáveis às suas funções vitais. Estes incluem hidratos de carbono, proteínas, lípidos, entre outros (7,19). Os metabolitos secundários, também conhecidos por fitoquímicos, são diferenciadores em cada espécie. Exemplos destes compostos são os flavonóides, terpenóides, alcalóides e saponinas (7,17,19). Existem mais de mil fitoquímicos conhecidos e estudados, estimando-se a existência de inúmeros outros por descobrir. As plantas produzem estes compostos para a sua proteção. No entanto, sabe-se que têm também efeitos benéficos contra diversas patologias inerentes à espécie humana. Os metabolitos secundários têm inúmeras propriedades biológicas, funcionando como agentes antioxidantes, antimicrobianos, moduladores de enzimas de desintoxicação, ativadores do sistema imunitário, moduladores da agregação plaquetária, moduladores do metabolismo hormonal e anticancerígenos (19).

Os compostos fenólicos são a maior categoria de fitoquímicos e estão amplamente distribuídos no reino vegetal. Os ácidos fenólicos, os flavonóides e os taninos são importantes representantes deste grupo (Figura 2). São genericamente constituídos por um grupo hidroxilo (-OH) ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático. Possuem várias propriedades benéficas para a espécie humana e as suas propriedades antioxidantes são importantes na determinação do seu papel como agentes protetores contra doenças mediadas por radicais livres (19). Sabe-se que os compostos fenólicos existentes naturalmente nas plantas apresentam um amplo espectro de propriedades promotoras de saúde (4). As propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas dos compostos fenólicos indicam que estes merecem reconhecimento na medicina tradicional e podem ser uma arma na área da terapêutica dermatológica (4).

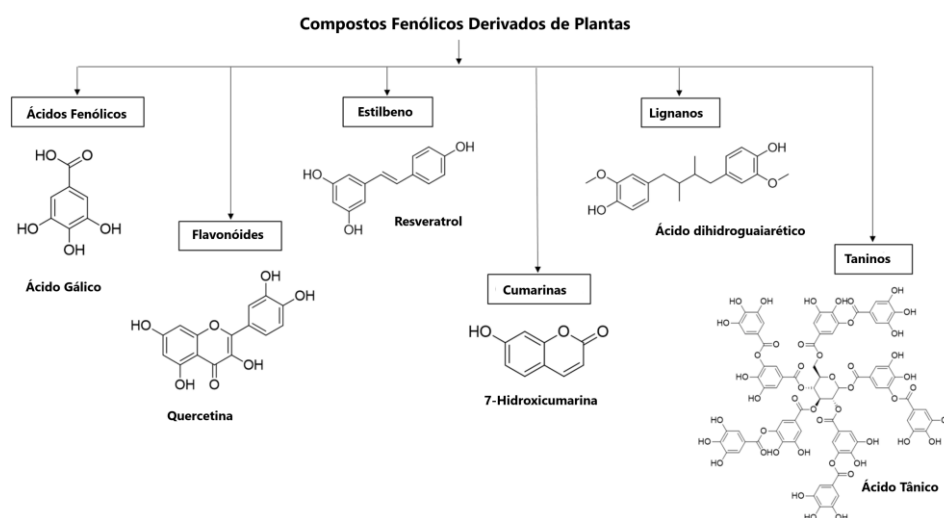


Figura 2. Grupos de compostos fenólicos derivados de plantas e alguns compostos representativos dos grupos. Adaptado de Zambrano, 2020 (20).

Os flavonóides são o maior e mais estudado grupo de compostos fenólicos (19), variando de acordo com a espécie e o ambiente em que a planta da qual são extraídos cresce (21). A sua mais importante propriedade é o poder antioxidante, dependente da sua estrutura molecular. Flavonóides como a luteolina e a catequina são melhores antioxidantes do que os nutrientes antioxidantes como a vitamina C, vitamina E e betacarotenos (19). A quercetina, apigenina, hesperidina e luteolina são flavonóides que contêm potencial anti-inflamatório (21).

Os ácidos fenólicos que ocorrem naturalmente têm duas estruturas distintas: estrutura hidroxicinâmica e hidroxibenzoica. Estes compostos têm sido estudados maioritariamente pelas suas propriedades antioxidantes, prevenindo várias doenças degenerativas como doenças cardiovasculares, inflamatórias e neoplásicas. Apresentam outros efeitos biológicos como o aumento da secreção biliar, redução do colesterol, atividade antimicrobiana, atividade anti ulcerosa, anti-inflamatória, citostática, antiespasmódica e antidepressiva (19).

Os taninos, são compostos de alto peso molecular com a capacidade de formar complexos com proteínas, polissacarídeos, alcalóides, ácidos nucleicos e minerais. São encontrados habitualmente em frutas como uvas e mirtilos, chá, chocolate e legumes. Os extratos vegetais que contêm taninos são usados como adstringentes, anti tumorais, nomeadamente na prevenção de neoplasias duodenais e gástricas, como anti-inflamatórios, antissépticos, antioxidantes e hemostáticos (19).

2.1. Produção de extratos vegetais

Os metabolitos secundários têm vindo a ser estudados em patologias dermatológicas, concluindo-se o seu papel benéfico como princípios ativos no seu tratamento. A composição das plantas difere de acordo com a área de crescimento, o solo, as condições climáticas, o tempo de colheita, o processo de extração escolhido e a porção da planta que é extraída. As condições de armazenamento e os solventes utilizados na sua extração têm também uma implicação significativa nos compostos químicos finais. O processo extrativo (Figura 3) é o primeiro passo para a obtenção de compostos bioativos, sendo crucial o seu estudo. São inúmeros os fatores que influenciam a eficiência da extração dos compostos, como o tipo e a concentração do solvente utilizado, a temperatura, o tempo da extração e o pH. A escolha dos solventes baseia-se na natureza química e na polaridade dos compostos antioxidantes que se pretendem extrair. Diversos solventes como a água, o etanol, o metanol, o propanol, a acetona e misturas aquosas são muito usados no processo extrativo. Os métodos de extração mais utilizados são métodos que implicam aquecimento como a digestão e a infusão, a maceração e a extração por *Soxhlet* (22).

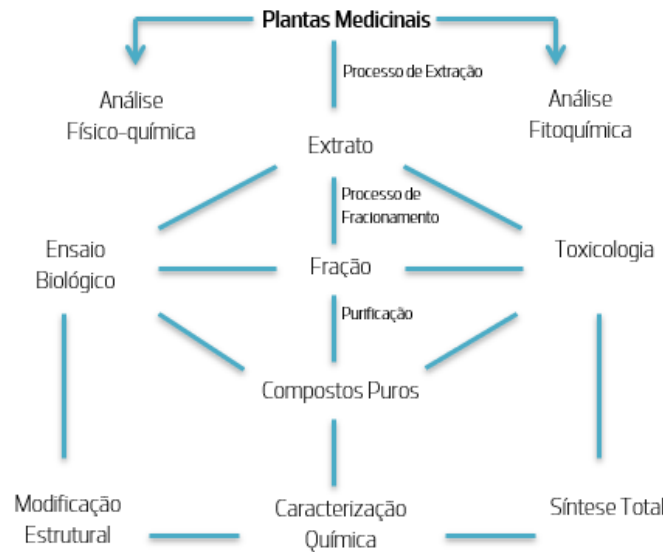


Figura 3. Método de obtenção de compostos ativos através das plantas (17).

Os extratos são, assim, misturas dos compostos químicos líquidos, em pó ou viscosos extraídos do material da planta usando água ou solventes orgânicos como o álcool. Como resultado final do extrato obtém-se apenas a fração solúvel do material da planta e os resíduos não solúveis são descartados (14). A eficácia do extrato da planta a ser adicionado a uma formulação tópica depende da sua concentração (11).

3. Stress oxidativo e compostos antioxidantes

O oxigénio é um elemento indispensável à vida. Quando as células o utilizam para gerar energia, criam-se radicais livres como uma consequência da produção de adenosina trifosfato (ATP) pelas mitocôndrias. Estes radicais livres são normalmente espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS) que resultam do processo de redução/oxidação celular. Estas espécies em níveis baixos e moderados são benéficas na resposta celular e na função imunitária. Contudo, em altas concentrações, geram stress oxidativo que pode danificar as estruturas celulares e contribuir para o desenvolvimento de doenças crónicas e degenerativas como neoplasias, artrite, doenças autoimunes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (23,24).

O corpo humano tem mecanismos para combater o stress oxidativo através da produção de antioxidantes que eliminam ROS/RNS e previnem e reparam os danos causados por eles. Uma molécula com um ou mais eletrões desemparelhados denomina-se por radical livre. A formação dos radicais livres pode ocorrer nas células através de reações enzimáticas e não enzimáticas. As primeiras originam radicais que se encontram envolvidos na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas

e no funcionamento do citocromo P450. As não enzimáticas são originadas pela reação do oxigênio com compostos orgânicos, podendo também ocorrer durante o processo de fosforilação oxidativa (23).

ROS e RNS são geradas através de fontes endógenas e exógenas. Os radicais livres endógenos são gerados através da ativação das células do sistema imunitário, inflamação, exercício excessivo, isquemia, infecção, cancro e envelhecimento. Os exógenos resultam da exposição à poluição do ar e da água, do fumo do tabaco, álcool, metais pesados, alguns fármacos, solventes industriais e radiação, compostos metabolizados em radicais livres após a sua absorção pelo organismo (22,23).

Os compostos antioxidantes existentes nas células classificam-se como endógenos ou exógenos, enzimáticos e não enzimáticos. As enzimas antioxidantes envolvidas diretamente na neutralização das espécies reativas são a superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase. Os antioxidantes não enzimáticos dividem-se em antioxidantes metabólicos e nutrientes. Como exemplos de antioxidantes endógenos, produzidos pelo metabolismo corporal, temos o ácido lipóico, a glutatona, a L-arginina, a coenzima Q10, a melatonina, o ácido úrico, a bilirrubina e a tranferrina. Os antioxidantes nutrientes enquadram-se nos antioxidantes exógenos, que não podem ser produzidos pelo organismo, tendo de ser adquiridos através da alimentação ou suplementação (ex. vitamina C, vitamina E, carotenos, selénio, zinco, flavonóides e ómega 3) (23).

4. Produtos cosméticos

De acordo com a definição legal do Regulamento Nº 1223/2009 do Parlamento Europeu, entende-se por produto cosmético qualquer *substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais* (25).

Os produtos cosméticos abrangem um espectro muito amplo de produtos em várias categorias, englobando os produtos de higiene corporal, como sabonetes, geles de banho, champôs, desodorizantes, pastas dentífricas, e os produtos de beleza, como tintas capilares, vernizes e maquilhagem (25). De acordo com a sua função e aplicação é possível dividir os cosméticos em quatro grupos (26):

- a) Produtos de higiene e proteção - constituem as preparações essenciais à limpeza da pele, cabelo, dente e mucosas. Deste grupo fazem parte os sabonetes, champôs, dentífricos, depilatórios, produtos de higiene feminina, antitranspirantes e desodorizantes;
- b) Produtos de tratamento cosmético - permitem manter a integridade da epiderme, contrariando a ação agressiva do meio ambiente, atrasam a senescência cutânea, fornecem proteção em relação à exposição solar, aos atritos e outras agressões.

c) Produtos de bem-estar da pele – incluem máscaras de beleza, esfoliantes, sais de banho, perfumes, entre outros;

d) Produtos decorativos – permitem mascarar imperfeições ou realçar a beleza natural do rosto– batons, blushes, etc.

A utilização a longo prazo de cremes cosméticos permite conservar a pele, protegê-la contra agressões várias às quais estamos expostos no quotidiano, fornecer substâncias gordas e água, retardar a formação de rugas e limpar em profundidade a epiderme. Os cremes, empregues como cosméticos, podem ser classificados segundo a sua composição e aplicação em cremes de dia e cremes de noite (26).

Os cremes de dia protegem a epiderme das impurezas e alterações climáticas, facilitam a aplicação dos produtos subsequentes e normalmente deixam a pele com um acabamento opaco a acetinado (26). São múltiplas as propriedades inerentes ao creme de dia ideal, nomeadamente, garantir a hidratação; não irritar a pele; ter um pH neutro ou ligeiramente ácido; ser de fácil aplicação, o que implica ser espalhado com facilidade, bem distribuído pela epiderme, sem deixar marcas brancas; não deixar a pele com aspeto oleoso; deixar uma leve película que permita a aderência da maquilhagem; não ser oclusivo, permitindo a passagem de suor e o contacto com gases e vapor de água; ser apenas ligeiramente perfumado; não oxidar e manter boa conservação na embalagem; ser passível de ser removido com água (26).

Historicamente, os cremes de dia eram obtidos a partir da formação de sabões, resultando do processo de sais de ácidos gordos com álcalis. Continham resíduos da reação, como glicerina, e os perfumes aplicados eram de pouca qualidade. Dado o seu carácter alcalino tornavam-se irritantes para os indivíduos com pele seca e sensível. Embora a sua produção se mantenha atualmente, a sua preparação sofreu modificações com a introdução de constituintes, como emulsionantes e adjuvantes, a maioria são emulsões óleo em água (O/A) o que os torna mais agradáveis na pele e mais bem aceites e adaptados a todos os tipos de pele. Entre os adjuvantes mais utilizados atualmente, encontram-se ésteres de álcoois gordos, de glicerol e de glicóis (26).

Em relação ao creme de noite ideal são múltiplas as propriedades inerentes, nomeadamente, ter composição semelhante ao sebo cutâneo; deixar uma fina película permeável à água na pele; ser de aplicação fácil; não deve conter substâncias irritantes; ser bem absorvido pela pele; ser neutro ou ligeiramente ácido; ser estável e de longa conservação. Os cremes de noite são habitualmente cremes gordos, tendo o objetivo a recuperação do equilíbrio biológico da pele. Estes cremes destinam-se preferencialmente às peles secas, de forma a tornar o seu manto hidrolipídico mais estável e evitar a descamação exagerada (26).

Também nos cremes de noite houve uma evolução tecnológica evidente com o aparecimento de novas substâncias cosmetologicamente ativas e introduzidas ou veiculadas por novas moléculas transportadoras, como os lipossomas, microesponjas e ciclodextrinas. Outro aspeto a ter em conta no

desenvolvimento galénico de cremes de noite é a escolha dos corpos gordos emolientes, dado que no passado estes eram pouco estéticos e de difícil aplicação. Com a utilização de novos tensoativos e polímeros é possível a obtenção de cremes que, apesar de apresentarem uma certa consistência, não são acompanhados da perspectiva gordurosa (26).

A maior parte dos cremes de noite baseia-se em emulsões água em óleo (A/O), com emulsificantes como a lanolina e derivados, álcoois gordos e ésteres de álcoois polivalentes. São cremes com pouco teor de água, com matérias gordas minerais na sua constituição, como a parafina e a vaselina, óleos vegetais e outras matérias gordas variadas de origem animal ou vegetal que constituem a fase oleosa (26).

4.1. Composição e propriedades de um produto cosmético

Toda a formulação cosmética é basicamente constituída por um excipiente de natureza variável, no qual são introduzidos elementos específicos (os ditos ativos), conservantes, corantes e perfumes. De acordo com os veículos e a sua finalidade, os produtos podem apresentar-se nas formas líquida, sólida ou semissólida (26).

Os produtos cosméticos podem possuir propriedades antioxidantes, para reparar ou ocultar imperfeições da pele (1), propriedades anti-inflamatórias, entre outras (27). Nos últimos anos cada vez mais produtos cosméticos foram formulados com antioxidantes, tendo como alegações a função de hidratar, proteger e rejuvenescer a pele. São vários os antioxidantes que se demonstraram eficazes na proteção contra os danos UV na pele, conseqüentemente diminuindo o envelhecimento por evitarem a hiperpigmentação solar (7).

Relativamente à atividade anti-inflamatória, esta é de extrema importância pois o organismo é exposto diariamente a fatores externos que podem causar danos diversos, conduzindo, inevitavelmente, a uma resposta inflamatória. Durante o complexo processo de inflamação são produzidos ROS/RNS em grande quantidade, que por sua vez provocam alterações na secreção de moléculas sinalizadoras, como citocinas pró-inflamatórias e interleucinas, que conduzem à inflamação cutânea (4).

De entre as inúmeras funções que possuem, os compostos vegetais desempenham um importante papel na manutenção da integridade cutânea (2). Vários dos produtos derivados de plantas são distinguidos pelos seus benefícios dermatológicos (11). Existe uma grande procura por produtos com ativos naturais e/ou orgânicos conduzindo a um aumento da utilização de extratos de plantas em formulações cosméticas (27,28). Os constituintes botânicos usados nos produtos de cuidado pessoal incluem extratos de plantas, tinturas, ceras e compostos purificados de plantas com atividade biológica como os antioxidantes (28).

4.2. Abordagem aos sistemas dispersos: Emulsões

Os coloides consistem em misturas de dois meios, nas quais as partículas dispersas de um meio no outro têm um diâmetro entre 1 nanómetro e 1 micrómetro. Neste sistema, as partículas dispersas são significativamente menores do que aquelas que podem ser percebidas a olho nu, sendo, contudo, muito maiores do que as moléculas individuais. Estas partículas recebem o nome de partículas coloidais e sofrem fenómenos elétricos de atração e repulsão (movimentos brownianos e efeito de Tyndal). A molécula hidrófila A/O apresenta as cabeças hidrófilas viradas para o solvente hidrófilo e a molécula lipófila ou inversa O/A apresenta as porções lipófilas viradas para o exterior. Podemos distinguir dois tipos de coloides: liófilos e liófobos. Nos coloides liófilos, as partículas têm pouca ou nenhuma afinidade com o solvente no qual estão dispersas. A sua estabilidade depende essencialmente da carga elétrica associada a essas partículas, e por consequência, esse equilíbrio está comprometido com a presença de pequenas quantidades de eletrólitos no meio (26).

Os coloides apresentam uma grande afinidade com o solvente no qual estão dispersos, sendo hidrófilos se o meio dispersante for aquoso e lipófilos se for do tipo oleoso. Atendendo a essa afinidade, as partículas coloidais fixam na sua superfície moléculas de solvente através de pontes de hidrogénio. Essas moléculas de solvente darão origem à camada de solvatação das partículas coloidais. A solvatação é um mecanismo de dissolução em que iões negativos e positivos ficam envoltos por moléculas de solvente (26).

Os diferentes sistemas coloidais são classificados de acordo com a natureza das fases dispersa/dispersante envolvidas. Um coloide sólido/líquido é comumente denominado "sol". Os sistemas líquido/líquido são designados "emulsões". Os coloides do tipo líquido/sólido denominam-se "geles" ou "emulsões sólidas". Os sistemas líquido/gás são conhecidos como aerossóis.

Uma emulsão corresponde, então, a um caso particular de coloide. As duas substâncias líquidas presentes são denominadas fases, em que uma é contínua e a outra está dispersa em pequenas gotículas na anterior, constituindo a fase descontínua. As emulsões são compostas normalmente por uma fase aquosa, com afinidade para a água e uma fase oleosa, com afinidade para o óleo. Existem, desta forma, duas formas clássicas de emulsão: Emulsão O/A, na qual as gotas de óleo são dispersas e encapsuladas na água e emulsão A/O na qual as gotículas de água são dispersas no óleo. Existem ainda emulsões múltiplas do tipo A/O/A e O/A/O (29).

As emulsões para aplicação tópica podem ser O/A ou A/O dependendo da natureza dos princípios/ingredientes ativos, do efeito pretendido sobre a pele e da própria condição desta. Por exemplo, agentes que possam irritar o tecido cutâneo são geralmente menos irritantes na fase interna, pois, quando comparados com a fase externa, os primeiros têm um menor contacto com a pele (30). Numa pele intacta, uma emulsão O/A pode ser aplicada uniformemente, uma vez que existe uma fina camada de sebo na

superfície da pele. Esta emulsão é mais suave porque resiste à remoção por contacto com água. Por outro lado, uma emulsão A/O é mais facilmente removida por água e há uma maior absorção percutânea devido ao menor tamanho das partículas da fase interna (29).

O parâmetro variável mais significativa na produção de uma emulsão é a intensidade de mistura das fases. Uma agitação mais eficiente gera um melhor resultado (29). A temperatura geralmente tem um efeito indireto na emulsificação uma vez que altera a tensão entre as fases, a adsorção do emulsificante e a viscosidade. Posto isto, a viscosidade e a tensão entre fases diminuem com o aumento da temperatura, ou seja, temperaturas mais elevadas são mais favoráveis para as emulsões. O agente emulsificante/tensioativo deve ser qualquer substância tensioativa que tenha a capacidade de formar uma fina camada entre as fases dos dois líquidos e mantenha a emulsão, minimizando o contacto, coalescência e agregação da fase interna dispersa. O tensioativo deve circundar a partícula dispersa como uma película não aderente e a estabilidade da emulsão depende da sua estrutura. Para que seja possível criar uma emulsão estável, são necessárias três condições: 1) os dois líquidos devem ser imiscíveis ou mutualmente insolúveis entre si; 2) devem ser bastante agitados para que seja possível a dispersão de um líquido no outro; 3) tem de existir um ou mais agentes emulsificantes (29).

4.2.1. Agentes emulsificantes na estabilidade da emulsão

Todos os líquidos têm tendência a assumir uma forma que garanta a mínima área de superfície exposta. Para uma gota de líquido essa forma é uma esfera. A esfera possui forças internas que promovem a associação das moléculas de modo a resistirem à distorção da sua forma. Quando duas ou mais gotas de um mesmo líquido entram em contacto têm tendência para se juntar ou aglutinar, formando uma gota maior com uma menor área de superfície do que a total área de superfície das gotas individualmente. Esta tendência das substâncias líquidas pode ser medida quantitativamente, sendo que quando existe ar em torno do líquido esta medida é chamada de tensão superficial. Quando um líquido está em contacto com outro líquido no qual é insolúvel e imiscível, a força que faz com que este resista à fragmentação em partículas menores é chamada de tensão interfasial. As substâncias que reduzem essa resistência e incentivam o líquido a fragmentar em partículas menores são chamadas de agentes tensioativos ou surfactantes (30).

Quando dois líquidos de polaridades opostas são confrontados, as gotículas que se formam estão separadas por uma interface. Esta interface é constituída por moléculas condicionadas pelas forças provenientes da tensão interfasial que se origina entre as duas fases, oleosa e aquosa. O trabalho da distribuição das partículas, ou emulsificação, é diretamente proporcional ao produto da tensão interfasial devido ao aumento de superfície de contacto entre os dois líquidos. A energia fornecida por esse trabalho

é absorvida pelo sistema, tornando-se este altamente energético. Esta energia será tanto maior quanto maior for a tensão interfasial entre os dois líquidos. Por consequência, estes sistemas não são estáveis em termos termodinâmicos, sendo esta a maior problemática na obtenção de emulsões estáveis (30).

A finalidade dos agentes emulsificantes é, tal como referido anteriormente, de impedir a coalescência dos glóbulos que constituem a fase dispersa. O produto final poderá ser uma emulsão líquida ou semissólida. O funcionamento do tensoativo emulsificante consiste na formação de uma película que separa os componentes dos meios em presença, a coalescência. Esta deve ser fina e elástica, com uma formação rápida no momento da preparação (30).

4.2.2. Mecanismos de ação dos emulsificantes

Têm sido desenvolvidas várias teorias numa tentativa de explicar a capacidade dos agentes emulsificantes em promover a emulsificação e a manutenção da estabilidade de uma emulsão. De acordo com a teoria da tensão interfasial de emulsificação, o uso destas substâncias reduz a tensão entre os dois líquidos imiscíveis, reduzindo a força repelente entre eles e diminuindo a atração de cada líquido pelas suas próprias moléculas, facilitando assim a quebra de grandes aglomerados em pequenos com uma menor tendência para a aglomeração (30).

A teoria da cunha orientada assume que camadas mononucleares do agente emulsificante curvam em torno de uma gota da fase interna da emulsão. Esta baseia-se na presunção de que certos agentes emulsionantes se orientam sobre e dentro de um líquido numa forma que reflita a sua solubilidade naquele líquido em específico. Num sistema com dois líquidos imiscíveis, o agente emulsificante será preferencialmente solúvel numa das fases e encontra-se mais profundamente embutido nessa fase que na outra. Geralmente, um agente emulsificante com características mais hidrofílicas do que hidrofóbicas irá promover uma emulsão O/A e, conseqüentemente, um agente emulsificante com características mais hidrofóbicas irá promover uma emulsão A/O. Embora esta teoria possa não ser uma representação precisa do arranjo molecular do agente emulsificante, é uma teoria com elevada reprodutividade, pois este conceito verifica-se inúmeras vezes na prática (30).

A teoria da película plástica ou interfasial descreve a colocação do agente emulsificante na interface entre o óleo e a água, envolvendo as gotículas da fase interna numa fina camada de película adsorvida na sua superfície. Esta película impede o contacto e coalescência da fase dispersa. Quanto mais resistente e flexível for, maior será a estabilidade da emulsão. Novamente, a formação de uma emulsão O/A ou A/O irá depender do grau de solubilidade do agente nas fases (30).

A redução da tensão interfasial é importante na formação inicial de uma emulsão, mas a formação de um protetor das moléculas ou um filme de emulsificante é importante para a manutenção da estabilidade (30).

4.2.3. Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL)

Cada agente emulsificante tem uma porção hidrofílica e uma hidrofóbica, sendo uma ou outra mais ou menos predominante, influenciando a emulsão. Há um método pelo qual os agentes emulsificantes/tensioativos podem ser caracterizados quanto ao seu EHL, com base na sua composição química (Escala de *Griffin*). A partir deste método a cada agente é atribuído um valor que indica a sua polaridade. Apesar de o máximo da escala ser 40 (valor atribuído à água), o intervalo normal, para emulsificantes, é entre 1 e 20. Os valores da escala vão aumentando proporcionalmente à polaridade e hidrofília da substância. Geralmente, os tensioativos com um valor entre 3 e 6 são muito lipofílicos e produzem emulsões A/O, sendo que os agentes com um valor entre 8 e 18 produzem emulsões O/A (Tabela 1).

Tabela 1. Atividade e valor do EHL de emulsificantes (30).

ATIVIDADE	VALORES EHL
ANTI-ESPUMA	Entre 1 e 3
EMULSIFICANTES (A/O)	Entre 3 e 6
HUMECTANTES	Entre 7 e 9
EMULSIFICANTES (O/A)	Entre 8 e 18
DETERGENTES	Entre 13 e 16
SOLUBILIZANTES	Entre 15 e 20

Este sistema atribui valores não só aos agentes emulsificantes, mas também a óleos e substâncias similares. Para preparar uma emulsão estável, o agente emulsificante deve ter um valor similar a um dos óleos dependendo do tipo de emulsão desejada. Quando necessário pode combinar-se mais que um emulsificante para atingir o valor de EHL adequado.

5. *Artemisia campestris* L.

A *Artemisia campestris* L. é uma das mais de 300 espécies do género *Artemisia* (31). É uma planta aromática pertencente à família Asteraceae (32–38). Encontra-se na região da Ásia, América do Norte, Europa e nas regiões áridas do norte de África (33,34,38). É um pequeno arbusto que pode alcançar entre 30 a 150 cm em altura, com hastes ramificadas com forma de panícula, vermelhas acastanhadas e glabras, adquirindo uma forma lenhosa na parte inferior e pubescente na parte superior (38). As folhas são verdes, finamente divididas quase até à nervura central, mas não completamente separadas, são pecioladas ou auriculadas, sendo que as superiores são mais simples (Figura 4). Relativamente à inflorescência, o capítulo é ovoide e heterógeno, contém 8 a 12 flores, organizadas em receptáculos convexos e glabros e rodeadas por brácteas glabras organizadas em filas. Trata-se de uma espécie polimórfica, sendo dividida em seis subespécies distinguidas pela sua morfologia e características citológicas: Subsp. *campestris* L., Subsp. *glutinosa*, Subsp. *marítima* e Subsp. *borealis* (38). Têm um cheiro e sabor característico devido à presença de monoterpenos, sesquiterpenos e vários metabolitos secundários (31).

A planta é capaz de sobreviver em diferentes habitats, sendo preferíveis os habitats abertos como prados e florestas. Esta planta cresce melhor em solos secos, adquirindo diferentes formas dependendo do local onde cresce (38).



Figura 4. *Artemisia campestris* L. (39).

As diferentes espécies desta família são utilizadas na medicina em todo o mundo com diferentes aplicações terapêuticas em diversas patologias (32,33). Estão descritas a atividade anti-inflamatória, antitumoral, antidiabética, anti-hipertensiva, anti-helmíntica, antioxidante, antiespasmódica, antibacteriana e antifúngica (31–38), podendo ser utilizada no tratamento de condições digestivas, cutâneas, oculares, urinárias, respiratórias e genitais (38). Através de análise química determinou-se que a *A. campestris* L. contém alcalóides, saponinas, sesquiterpenos, taninos, polifenóis, cumarinas,

isocumarinas, ácidos gordos, óleo essencial, minerais e flavonóides. As porções da planta mais utilizadas medicinalmente são as folhas e as flores (34,36).

Relativamente à fitoquímica da *A. campestris L.*, é muito estudada pelos seu teor em flavonóides (38). Tem um grande potencial para eliminar ROS/RNS e o perfil fenólico é complexo e diferente nas diferentes subespécies (31). Contém uma grande quantidade de flavonas como a crisina, apigenina, linderoflavonas, ficina, luteonina. A subclasse de flavonóides, flavonol, é representada maioritariamente pelo kaempferol e os seus derivados. As sementes da *A. campestris L.* são ricas em compostos fenólicos como o ácido clorogénico, o ácido ferúlico, o ácido 4-metoxi-cinamico, o ácido vanílico e ácidos isoclorogénicos A, B e C. Nas suas porções aéreas encontram-se ácido clorogénico, ácido hidroxicinâmico e ácido isoclorogénico A, B e C. A planta contém ainda cumarinas como a hidroxycumarina, esculetina, iso-fraxidina, fraxidina, herniarina e escopolina. As folhas da *A. campestris L.* têm uma grande quantidade de ácidos gordos, sendo os mais importantes, o ácido alfa-linoleico e o ácido palmítico. Além disso contêm antocianidinas. Um estudo português demonstrou no óleo essencial da *A. campestris subsp. marítima* a presença de 31 compostos terpénicos (38).

Desta forma, e tendo em conta: a) o rápido crescimento do setor dos produtos cosméticos; b) assim como o facto de que muitos extratos à base de plantas têm demonstrado resultados positivos na saúde, textura e integridade da pele, sendo utilizados cada vez mais em formulações cosméticas, o principal objetivo do trabalho consiste na produção de um documento de apoio ao desenvolvimento galénico de um produto cosmético, nomeadamente uma emulsão O/A contendo extrato de *A. campestris L.*, com propriedades de proteção e reparação cutânea.

Métodos

Trata-se de uma revisão onde foi efetuada uma pesquisa bibliográfica, em livros e artigos científicos, em diferentes bases de dados, nomeadamente: SCIELO, PUBMED e Science Direct. As línguas de pesquisa foram o português e o inglês, sendo usadas as palavras chave: desenvolvimento galénico, cosmético, creme, *A. campestris L.* Estas foram empregues isoladamente ou em combinação. Foi, posteriormente, feita uma seleção da informação a integrar este trabalho, de acordo com a sua temática e relevância.

Face ao principal objetivo do trabalho, que consiste no desenvolvimento galénico teórico de um produto cosmético, nomeadamente uma emulsão O/A contendo extrato de *A. campestris L.*, com propriedades de proteção e reparação cutânea, o desenvolvimento do trabalho encontra-se dividido em duas partes:

Parte 1) Compilação de estudos sobre a atividade antioxidante de extratos da espécie vegetal *A. campestris L.*, de modo a dar suporte à sua potencial atividade na formulação galénica final. Para esta parte do trabalho fez-se uma pesquisa mais restrita, nas bases de dados anteriormente referidas, incluindo apenas estudos com a parte aérea da espécie *A. campestris L.* (folhas e flores); estudos que avaliassem a atividade antioxidante da planta (estudos *in vitro* e *in vivo*); estudos com diferentes técnicas e solventes de extração. Também foi feito um levantamento de informação, materializada na descrição de um conjunto de procedimentos, acerca de estudos prévios, ao nível do extrato, para fundamentar a sua atividade antioxidante.

Parte 2) Desenvolvimento teórico da formulação, partindo dos resultados obtidos na parte 1, nomeadamente identificando a técnica extrativa e solvente mais utilizados pelos autores e com melhores resultados (ensaio do 2,2 difenil-1-picrilidrazila (DPPH), teor de compostos fenólicos, flavonóides e taninos).

Resultados

6. Atividade antioxidante de extratos de *A. campestris L.*

A planta selecionada, neste trabalho, *A. campestris L.*, está descrita como possuindo, tal como referido anteriormente, atividade antioxidante. Na tabela 2 estão descritos os estudos que fazem referência a esta atividade, tendo em conta os critérios de inclusão na pesquisa bibliográfica.

De um modo geral, e analisando a tabela 2, verifica-se que nos estudos as amostras de *A. campestris L.* apresentam um forte poder antioxidante, em especial pelos valores apresentados no ensaio de DPPH. O ensaio do DPPH é o mais antigo método indireto para a determinação da atividade

antioxidante (40). É usado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos individuais e alimentares, bem como amostras biológicas relevantes.

Os extratos etanólicos (etanol:água) ou metanólicos demonstraram atividade antioxidante e teores de compostos fenólicos e flavonóides, regra geral, superior aos extratos aquosos. É mais comum os extratos serem metanólicos ou hidroalcoólicos em vez de aquosos uma vez que os flavonóides apresentam uma maior solubilidade em metanol do que em água. A título de exemplo de uma boa atividade antioxidante de um extrato metanólico, no estudo de Megdiche-Ksouri *et al.* (31) o valor de baixa concentração inibitória máxima (IC₅₀) encontrado no ensaio do DPPH com o extrato metanólico de *A. campestris L.* ($6 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$) foi inferior ao valor do controlo positivo, o hidroxitolueno butilado (BHT) ($11,5 \pm 0,01 \mu\text{g}/\text{mL}$). Diversos estudos têm demonstrado a forte atividade antioxidante dos extratos de *A. campestris L.* e que pode estar associada ao teor de compostos fenólicos e flavonóides (35), como é possível comprovar pela tabela 2. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos parece dever-se, principalmente, às suas propriedades de redução, que têm um papel importante na adsorção e neutralização dos radicais livres e/ou na decomposição de peróxidos (41). Porém, as diferenças nos valores encontrados de atividade antioxidante podem dever-se não apenas às quantidades destes compostos, mas também à variabilidade das suas estruturas e às suas interações nos extratos.

6.1. Preparação de extrato de *A. campestris L.*

Pela análise dos valores da tabela (IC₅₀ no ensaio do DPPH, teores de flavonóides, taninos e compostos fenólicos totais (CFT)) uma opção de extrato a incluir na formulação teórica da emulsão poderá ser o preparado a partir das partes aéreas da planta, por maceração e utilizando como solvente o metanol.

Tabela 2 Ensaio antioxidantes com extrato de *A. campestris* L. (partes áreas), com referência ao extrato, método de extração e compostos bioativos.

Tipo Extrato	Método Extrativo	Ensaio Antioxidantes/Determinação Compostos	Compostos Presentes/Teor	Referências
Metanólico	<p><u>Maceração</u> (M): 10 g do pó com 100 mL metanol por 2,5, 5, 10, 20, 40 e 60 min, temperatura ambiente;</p> <p><u>Ultrassons</u> (U): 10 g do pó com 100 mL metanol por 2,5, 5, 10, 20, 40 e 60 min à temperatura ambiente + ultrassons</p> <p><u>Soxhlet</u> (S): 10 g pó com 100 mL metanol, 7H</p>	<p>Ensaio do DPPH;</p> <p>Compostos Fenólicos Totais (CFT) (Folin Ciocalteu);</p> <p>Teor de Flavonóides Totais</p>	<p>Apigenina e derivados; derivada luteolina; kaempferol 7-metil éter, quercetina e derivados, rutina, hiperósido;</p> <p><u>CFT</u>: 164,7 ± 0,5 mg/g (M); 141,2 ± 0,6 mg/g (U); 128,1 ± 5,4 mg/g (S); <u>Total Flavonóides</u>: 118,2 ± 3,0 mg/g (M); 104,5 ± 3,8 mg/g (S); 102,5 ± 6,2 mg/g (U); DPPH (IC₅₀ = 22,2±0,3 (M), 26,5±0,1 (U), 28,1±0,1 (S) µg/mL)</p>	(32)
Etanólico 80% (V/V)	<p><u>Maceração</u>: 50 g da planta com 500 mL de solução etanólica 80% (V/V), a temperatura ambiente, por 72H</p>	<p>Ensaio do DPPH;</p> <p>Ensaio ABTS;</p> <p>Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu);</p> <p>Teor de Flavonóides Totais</p>	<p>Compostos fenólicos (ácido gálico, catequinas, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico e ácido <i>p</i>-cumárico)</p> <p><u>CFT</u>: 123.90±1.40 mg GAE/g extrato; <u>Total Flavonóides</u>: 24.99±0.90 mg QE/g extrato); DPPH (IC₅₀ = 0,72±0,003 mg/mL)</p>	(42)
Metanólico	<p><u>Maceração</u>: 250 g de pó adicionado a 1000 mL de éter de petróleo para eliminação de compostos gordos. Pó macerado com 750 mL metanol, por 24H, à temperatura ambiente</p>	<p>Ensaio do DPPH;</p> <p>Capacidade antioxidante total</p> <p>Ensaio do poder redutor do ferro (FRAP)</p> <p>Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu)</p> <p>Teor de Flavonóides Totais; Teor Taninos Condensados</p>	<p>Identificados 39 compostos derivados de cumarinas, ácidos fenólicos, flavonas, flavonois e sesquiterpenos; <u>CFT</u> = 158,75 ± 12,5 mg GAE/g extrato; <u>Total Flavonóides</u> = 175,23 ± 7,26 mg CE/g extrato; <u>Teor Taninos</u> = 8,7 ± 0,9 mg CE/ g extrato</p> <p><u>DPPH</u> (IC₅₀ = 6 ± 0,01 µg/mL)</p>	(31)

CFT – Teor Compostos Fenólicos; GAE – equivalentes ácido gálico; QE – Equivalentes quercetina; DPPH (2,2'-difetil-1-picril-hidrazilo); ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico); CE – Equivalentes catequina

Tabela 2 Ensaio antioxidantes com extrato de *A. campestris* L. (partes áreas), com referência ao extrato, método de extração e compostos bioativos (Cont.).

Tipo Extrato	Método Extrativo	Ensaio Antioxidantes/Determinação Compostos	Compostos Presentes/Teor	Referências
Metanólico	Maceração: 10 g do pó seco da planta com 100 mL de metanol, com agitação por 24H a temperatura ambiente)	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) <i>Screening</i> Fitoquímico	<i>Screening</i> Fitoquímico: presença de alcalóides, saponinas, terpenos, flavonóides	(43)
Aquoso	<u>Maceração</u> : 10 g de pó de folhas em 100 mL de água, a temperatura ambiente, por 24H	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) Teor Total de Flavonóides Teor Total de Taninos Ensaio do DPPH Determinação do Poder Redutor Ensaio do β -caroteno	<u>CFT</u> = 313,20 \pm 4,35 mg GAE/g extrato; <u>Teor Total Flavonóides</u> = 28,30 \pm 1,45 mg RE/g extrato <u>Teor Total Taninos</u> = 8,30 \pm 0,45 mg CE/g extrato Melhor valor DPPH = inibição de 86% com concentração 50 mg/mL	(37)
Etanólico 80% (V/V)	Maceração: 1 g de pó misturado com mistura etanol:água (8:2, V/V, 10 mL) e macerado com ultrassons (banho água, temperatura ambiente, 30 min)	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) Teor Total de Flavonóides Teor de Total de ácidos hidroxicinâmico Ensaio radial peroxil (ORAC)	Principais compostos identificados: isômeros do ácido cafeiolquinico, flavonóides, e derivados ácido benzóico; <u>CFT</u> = 61,42 \pm 2,13 mg/g GAE extrato; <u>Teor Total Flavonóides</u> = 17,94 \pm 1,26 mg/g RE extrato <u>Teor ácidos hidroxicinâmicos</u> = 37,26 \pm 0,88 mg/g CA extrato ORAC = 120,5 \pm 10,4 μ mol equivalentes de Trolox/g peso seco	(44)

CFT – Teor Compostos Fenólicos; CA – Ácido cafeico; RE – Equivalentes de rutina; GAE – Equivalentes Ácido gálico

Tabela 2 Ensaio antioxidantes com extrato de *A. campestris* L. (partes áreas), com referência ao extrato, método de extração e compostos bioativos (Cont.).

Tipo Extrato	Método Extrativo	Ensaio Antioxidantes/Determinação Compostos	Compostos Presentes/Teor	Referências
Etanólico 50% (V/V) (1) Hexano (2) Aquoso (3)	<u>Maceração</u> (1 e 2): 5 g de amostra em 50 mL de solvente (etanol:água, 50%; ou hexano), por 24H <u>Infusão</u> (3): 5 g de amostra com 100 mL água fervente, por 15 min	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) Teor Total de Flavonóides Ensaio do DPPH Ensaio ABTS Ensaio do β -caroteno	<u>CFT</u> = 463,2 mg GAE/g extrato (50% etanol) e 311,5 mg GAE/g extrato (infusão); <u>Teor Total Flavonóides</u> = 56,3 mg RE/g extrato (50% etanol) e 24,0 mg RE/g extrato (infusão) <u>DPPH</u> (IC_{50} = 0.658 mg/mL (3) e 2.053 mg/mL (1))	(35)
Aquoso	<u>Maceração</u> : 25 g amostra com 250 mL água, temperatura ambiente, por 3H, com agitação	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) Teor Total de Flavonóides Teor Total de Taninos condensados	<u>CFT</u> = 31,33 \pm 1,87 mg CAE/g extrato; <u>Teor Total Flavonóides</u> = 131,89 \pm 2,02 mg QE/g extrato; <u>Teor Total Taninos condensados</u> = 15,49 \pm 0,99 mg CE/g extrato	(36)
Aquoso	Infusão: 5 g planta por 1L água fervente, por 15-20 min	Compostos Fenólicos Totais (Folin Ciocalteu) Ensaio do DPPH Ensaio do Superóxido	<u>CFT</u> = 56,67 \pm 1,94 mg GAE/100 g de peso seco DPPH (IC_{50} = 3.5 \pm 0.003 mg/mL)	(45)
Aquoso Etanólico	1 g de planta extraída com 10 mL de água ou etanol, a 37°C por 2H	Ensaio do DPPH Ensaio do radical hidroxilo e anião superóxido	Extrato aquoso com melhor atividade antioxidante (DPPH)	(46)

CFT – Teor Compostos Fenólicos; CAE – Equivalentes Ácido cafeico; QE – Equivalente quercetina; CE – Equivalentes catequina; NA – Não aplicável; GAE – Equivalentes ácido gálico

6.2. *Screening* fitoquímico de extrato de *A. campestris* L.

Deve ser realizada a caracterização fitoquímica do extrato em estudo, por um método de identificação e quantificação de compostos, como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLEA). Na impossibilidade de efetuar, por dificuldades ou impedimentos de ordem técnica, esta determinação, podem efetuar-se um conjunto de ensaios de caráter qualitativo: *screening fitoquímico*. Estes permitem a determinação e prospeção preliminar dos compostos através da aplicação de testes de coloração. São tidos como métodos rápidos, de fácil execução e de baixo custo. Contudo, podem apresentar algumas limitações, como a especificidade de alguns reagentes utilizados ser diferente e a intensa mistura de compostos ou a baixa concentração dos mesmos poderem originar resultados falsos (47).

Assim, poderiam realizar-se várias determinações:

Compostos Fenólicos – a 2,5 mL de extrato adicionar 5-10 gotas de cloreto férrico (5%). O aparecimento de uma coloração azul escura indica a presença deste grupo de compostos (48).

Polifenóis – misturar 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu, 400 µL de solução de carbonato de sódio e 100 µL de extrato e incubar à temperatura ambiente por 2 horas. O aparecimento de uma coloração azul escura identifica a presença de polifenóis (49).

Flavonóides – adicionar algumas gotas de acetato de chumbo a 5% (não ultrapassando os 2 mL) a 2,5 mL de extrato. A presença de flavonóides é identificada através da formação de um precipitado de cor branco-amarelado (50).

Taninos – adicionar 5-10 gotas de cloreto férrico (1%), a 2,5 mL de extrato. A presença de taninos é identificada através do aparecimento de uma coloração verde-acastanhada (51).

Diterpenóides – adicionar 4-10 gotas de acetato de cobre (5%) a 1 mL de extrato. O aparecimento de uma coloração verde-esmeralda confirma a presença deste grupo de compostos (52).

Terpenóides e Triterpenóides – adicionar 3 mL de extrato a 1 mL de clorofórmio. Lentamente e de seguida, adicionar algumas gotas de ácido sulfúrico, até um máximo de 1,5 mL. A formação de um anel vermelho-acastanhado é indicativo da presença de terpenóides e a formação de uma camada de cor amarela indica a presença de triterpenóides (50).

Alcalóides – a 2,5 mL de extrato acrescentar 2 gotas do reagente de Dragendorff. A presença de alcalóides pode ser confirmada pelo aparecimento de um precipitado vermelho (50,51).

Proantocianidinas – adicionar, a 2 mL do extrato, 2 mL de água destilada e 2-3 gotas de cloreto de ferro (5%). O aparecimento de um precipitado verde é indicativo da presença destes compostos. Resultado positivo: precipitado verde (53).

6.3. Determinação da capacidade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, diferentes métodos podem ser empregues. Para este trabalho são referenciados três métodos: ensaio de DPPH, a determinação da capacidade quelante do ferro e a determinação do teor em CFT.

- Ensaio de DPPH – o ensaio pode ser realizado de acordo com o descrito por Ahn et al., 2018 (54). Depois de selecionada a gama de concentrações de extrato em estudo, deve adicionar-se a solução etanólica de DPPH (90 µM); a percentagem do radical DPPH por reagir é determinada a diferentes tempos, a um comprimento de onda de 515 nm, sendo medido num leitor de microplacas. O etanol absoluto é utilizado como controlo negativo. Como controlo positivo deve empregar-se um composto considerado como *gold standard* para o ensaio, como é o caso da quercetina. A percentagem de inibição do radical DPPH calcula-se pela seguinte fórmula: % inibição DPPH = $[(Ac - As)/Ac] \times 100$, em que Ac = absorvância do controlo, e As = absorvância da amostra, sendo expressa em IC₅₀ (concentração necessária para inibir 50% do radical DPPH).

- Determinação da capacidade quelante de ferro – o ensaio pode ser realizado de acordo com o descrito por Canabady-Rochelle et al., 2015 (55). Da mesma forma que anteriormente e depois de se definir a gama de concentrações de extrato em estudo, deve adicionar-se a 50 µL de extrato, 50 µL de sulfato de ferro (0,12 mM) e 50 µL de ferrozina (0,6 mM). A placa, protegida da luz, deve ser incubada, à temperatura ambiente, por 10 minutos. A leitura da absorvância é feita em leitor de microplacas, a um comprimento de onda de 562 nm. Da mesma forma, deve ser usado um controlo positivo (neste ensaio, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)). A capacidade quelante do ferro, em percentagem (%) é calculada através da seguinte fórmula: $[(Ac - As)/Ac] \times 100$, em que Ac é a absorvância do controlo e As a absorvância da amostra. A capacidade antioxidante é também expressa em IC₅₀ (concentração necessária para quelar 50% do ferro).

- Determinação do teor em CFT – pode ser realizado adaptando os métodos descritos por Xie et al., 2014 e Kupina et al., 2018 (56,57). Assim, esta quantificação é feita por espectrofotometria recorrendo ao reagente de Folin-Ciocalteu. Para cada amostra a analisar, misturar-se 250 µL (0,5mg/mL) de extrato com 1,25 mL de reagente Folin (1:10) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%), incubando-se depois a placa durante 1h. Para o branco, misturar-se 250 µL de solvente do extrato com 1,25 mL de reagente Folin (1:10) e 2 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). A absorvância é medida com uso de um espectrofotómetro, a 765 nm, sendo a determinação do teor em CFT feita tendo por base a equação da curva do ácido gálico. Assim, o teor em CFT pode ser expresso em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de extrato seco, através da seguinte fórmula: $C = (c \times V/m)$; em que C corresponde ao conteúdo de fenólicos totais (µg/g extrato em GAE), c é a concentração de ácido

gálico estabelecida pela curva de calibração ($\mu\text{g}/\text{mL}$), V é o volume de extrato em mL e m é a massa do extrato da planta em mg.

6.4. Determinação *in vitro* do potencial protetor do extrato de *A. campestris* L.

Tendo determinado o potencial antioxidante do extrato em estudo, poder-se-ão efetuar ensaios, em linhagens celulares, para verificar esse potencial e aferir toxicidade (ou ausência dela, que será o desejado, tendo em conta o objetivo de utilização deste extrato).

Assim, em linhagens de células cutâneas (por exemplo, fibroblastos – *Human dermal fibroblasts cells* (HDFa cells – ATCC® PCS-201-012™), depois de as cultivar nas condições ideais (que neste caso e de acordo com as indicações do fornecedor, será em frascos de 75 cm², usando meio de cultura apropriado, suplementado com 15% de soro bovino fetal e 1% de antibiótico, num ambiente com 5% de CO₂ e 37°C de temperatura. O meio de cultura deve ser mudado a cada dois dias, sendo a cultura tripsinizada a cada semana) (58).

Deve ser realizado um ensaio de determinação da atividade metabólica, através do ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), conforme descrito por Oliveira *et al.* (59). Deste modo e depois de determinada a gama de concentrações de extrato a usar neste ensaio (após análise dos resultados dos ensaios antioxidantes, adaptar a gama de concentrações empregues, para esta determinação, em linhagens celulares), devem ser plaqueadas as células (que, no caso desta linhagem celular será numa densidade celular de 2×10^{-6} células/mL) e, após 40 horas, adicionar as diferentes concentrações do extrato de *A. campestris* L. Os resultados devem ser expressos como a percentagem de atividade metabólica celular, comparativamente com o controlo (células sem qualquer extrato em estudo). Será desejável que alguma(s) da(s) concentração(ões) aumente significativamente a proliferação dos fibroblastos, o que é um indicador de proteção celular (59), ou que, pelo menos, não decresça significativamente a viabilidade celular, o que indicaria que o extrato é prejudicial para a atividade celular.

Analisando criticamente os resultados dos ensaios de determinação antioxidante e em linhagens celulares será selecionada a concentração de extrato de *A. campestris* L., para o desenvolvimento galénico.

6.5. Desenvolvimento teórico da formulação

6.5.1. Preparação da emulsão

A preparação de uma emulsão inicia-se na sua formulação, com a escolha das substâncias que irão constituir cada uma das fases, seguindo-se a sua elaboração recorrendo a tecnologia adequada. Um importante passo na preparação de uma emulsão é a seleção do emulsificante, sendo que este deve ser compatível com os outros ingredientes da fórmula e não deve interferir com a estabilidade ou eficácia do princípio/ingrediente ativo. Deve ser estável e não se deteriorar. Não deve ser tóxico, deve possuir pouco odor, sabor ou cor. Deve promover o processo de emulsificação e manter a estabilidade durante todo o tempo de validade do produto (26). O processo de emulsificação inicia-se com a preparação das fases aquosa e oleosa, sendo a ordem do procedimento determinada pelas características destes constituintes e dos adjuvantes a adicionar. No que respeita à tecnologia de preparação, são predominantes os seguintes parâmetros:

- Processo de fabrico;
- Temperatura a que deve ocorrer o processo;
- Aparelhagem de agitação;
- Modo de junção dos componentes;
- Modo de arrefecimento (26).

Estes parâmetros são fundamentais para garantir um produto de qualidade, sendo que a padronização de todas estas variáveis é o que permitirá a obtenção de um produto de qualidade com características constantes (26).

A síntese de uma emulsão requer duas fases distintas:

- Primeira fase: Estudo da formulação, procedendo-se à escolha qualitativa e quantitativa dos constituintes óleo e hidrossolúveis, dos produtos dispersíveis e dos princípios ativos específicos (26);
- Segunda fase: Reunir no mesmo produto substâncias com afinidades opostas (fase aquosa e fase oleosa) (26).

6.5.2. Critérios de seleção preliminares e preparação da emulsão

É necessário definir com precisão o tipo de emulsão e a viscosidade/consistência pretendida (creme consistente, creme mais fluído, emulsão fluída, leite) sendo para isso necessário definir o tipo de emoliente que irá constituir a fase oleosa da emulsão e o elemento de consistência (ceras ou álcoois gordos) dos constituintes, que para além da água, irão constituir a fase aquosa, especialmente os espessantes e por fim os emulsionantes adequados (26).

Em relação à fase oleosa estão integrados nesta fase todos os compostos com características untuosas e aditivos lipossolúveis. Nesta fase é necessário ter em conta a facilidade com que o produto final irá ser aplicado (emoliência), criando uma película untuosa que se adapte à finalidade pretendida, podendo ter uma ação mais superficial (oclusiva) ou maior ação em profundidade com rápido desaparecimento do aspeto oleoso, não deixando de ser emoliente e agradável ao tato. Em relação à fase aquosa, para além da água poderão ser adicionados compostos com características hidrófilas, destacando-se os humectantes e os hidratantes (26).

Pode ser utilizado apenas um emulsionante ou uma mistura de emulsionantes, sendo ainda possível a utilização de um emulsionante e um co-emulsionante. Esta escolha deverá ter em atenção o EHL da fase aquosa e deverá ser otimizada dentro dessa perspetiva, equacionando o EHL da fase oleosa e o EHL do conjunto de emulsionantes. Podem ainda ser acrescentados perfumes que deverão esconder o cheiro da base conferindo à preparação o aroma desejado (26).

O volume relativo das fases interna e externa das emulsões é importante, independentemente do emulsificante usado. À medida que a concentração interna de uma emulsão aumenta, aumenta também a viscosidade até um certo ponto, após o qual a viscosidade diminui drasticamente, sendo este o ponto de inversão da emulsão. Ou seja, passa de uma emulsão O/A para A/O ou o contrário (30).

6.5.3. Métodos de preparação de emulsões

Existem diversos métodos para preparar uma emulsão. A escolha do método depende dos compostos e equipamento disponíveis. Em pequena escala podem ser preparadas usando um almofariz e pilão, um liquidificador ou misturador elétrico ou um homogeneizador manual. Em termos de grande escala poderão ser utilizados grandes tanques de mistura usando um impulsor de alta velocidade (30).

6.6. Estabilidade das emulsões

As emulsões são construídas de forma a manterem as suas propriedades ao longo de um tempo determinado. Todavia, apesar dos cuidados na sua formulação, podem existir alterações algum tempo após a sua preparação. Excluindo as alterações do foro microbiano, a instabilidade das emulsões pode ser agrupada em três categorias:

- Floculação e formação de creme;
- Coalescência e separação das fases;
- Alterações físicas e químicas diversas (Figura 5) (26,30).

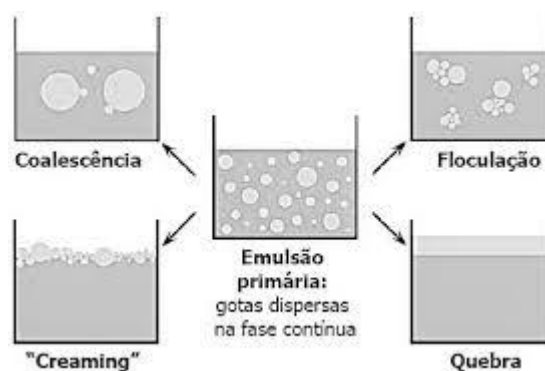


Figura 5. Alteração na estabilidade de emulsões (60).

Esta instabilidade das emulsões é de extrema importância, pois compromete a concentração e absorção de determinado princípio/ingrediente ativo a longo prazo (30). As formas de instabilidade física mais frequentemente observadas nas emulsões são:

- **Coalescência:** fenómeno irreversível que corresponde à união de gotículas para a formação de outras de maiores dimensões;
- **Formação de creme:** consequência do agrupamento de gotículas oleosas da fase interna, devido às diferenças de densidade entre as fases que constituem o sistema. A formação de creme na parte superior das emulsões acontece tanto em emulsões A/O como O/A, quando a sua fase interna tem uma densidade mais baixa que a fase externa. A formação de creme na parte inferior acontece quando ocorre o oposto. É um processo reversível mediante agitação e aumento da viscosidade do sistema;
- **Sedimentação:** ocorre quando uma parte da emulsão se separa no sentido descendente, formando um sedimento mais ou menos compacto. Trata-se de consequência reversível mediante aumento de viscosidade do sistema.
- **Floculação:** traduz o agrupamento de partículas em agregados. É um processo reversível mediante agitação (30).

Para aumentar a estabilidade de uma emulsão, o tamanho das partículas deve ser o menor possível, assim como a diferença de densidades entre as fases. A viscosidade da fase externa deve ser razoavelmente elevada. É necessário proteger as emulsões de temperaturas extremas (tanto quentes como frias). O processo de congelar e descongelar uma emulsão torna-a mais espessa e pode danificá-la (30).

Na produção da maioria das emulsões são realizados ensaios a 5°C, 40°C e 50°C de modo a determinar a sua estabilidade. A estabilidade a 5°C e 40°C por 3 meses é considerada um critério mínimo de qualidade. Como teste alternativo também se podem considerar tempos de exposição mais curtos a 50°C. Dada a existência de outras condições que podem afetar a produção de emulsão, como a presença de luz, ar e contaminação por microrganismos, são também tidas em consideração a embalagem e o embalamento. Perante emulsões sensíveis à luz utilizam-se frascos opacos, enquanto que para emulsões suscetíveis a decomposição oxidativa, utilizam-se antioxidantes e são colocadas indicações no rótulo para fechar bem o frasco após utilização (30).

6.7. Controlo de qualidade de emulsões empregues como cosméticos

O controlo de qualidade do produto obtido passa por uma análise de características macroscópicas e organolépticas bem definidas, sendo estas o aspeto do produto, a sua cor, odor e conteúdo volumétrico extraível.

6.7.1. Controlo químico

A análise química acompanha a análise física, fazendo-se determinações várias:

- Determinação do teor de diversos ingredientes, como conservantes, estabilizantes e corantes;
- Determinação quantitativa das substâncias cosmetologicamente ativas, conforme definido nos Anexos ao Regulamento 1223/2009;
- Análise do comportamento referente à estabilidade de certas moléculas biológicas ou de estabilidade química por interação dos componentes;
- Resistência ao envelhecimento acelerado. Considerando que os produtos deverão apresentar um tempo de vida útil mínimo, são efetuados ensaios de envelhecimento acelerado baseados no comportamento, relativamente à resistência do produto sujeito a pressões da gravidade e à ação da temperatura. Nestes ensaios, o produto é colocado sob a ação da força da gravidade, a 4500 rotações por minuto durante 30 minutos e à temperatura de 40°C durante três meses e em ciclos curtos repetidos,

constituídos de aquecimento seguido de arrefecimento. Após este ensaio, o produto deve continuar a apresentar as características padrão iniciais;

- Análise do comportamento relativo à adequação do pH. Determinação do pH das formulações por potenciométrica (no produto final e em diluições a 10%). As alterações do pH traduzem uma modificação química, pelo que são de admitir grandes intervalos nas variações em relação aos valores padrão;
- Análise dos critérios de ordem tecnológica referentes à qualidade das emulsões e sua estabilidade;
- Análise dos recipientes de acondicionamento (61).

6.7.2. Controlo físico

Os ensaios físicos efetuados nos produtos cosméticos podem ser do tipo macro e micro, tendo por base o aspeto inicial do produto. Exemplos de ensaios físicos são:

- Determinação do sentido da emulsão (método dos corantes);
- Determinação do tamanho de partícula (microscópio);
- Determinação da consistência (características teológicas) e viscosidade, recorrendo a um viscosímetro rotativo; consistência por penetrometria (determinação da dureza);
- Determinação da capacidade de extensibilidade (facilidade no espalhamento) através da espalmabilidade com um extensímetro;
- Determinação do ponto de gota- temperatura à qual um produto ou excipiente liberta a primeira gota;
- Determinação da quantidade de água- índice de água (61).

$$\text{Índice água} = \frac{100 * \% \text{ em água}}{100\% \text{ água}}$$

6.7.3. Controlo bacteriológico

A análise do risco microbiológico depende de vários fatores como:

- Alteração potencial do produto cosmético;
- Local de aplicação do produto cosmético;
- Categoria ou tipo de utilizador (adulto, idade pediátrica) (61).

De acordo com o Regulamento 1223/2009, os produtos cosméticos deverão respeitar as linhas de aplicação referidas no Anexo I. Assim sendo, o controlo microbiológico faz-se através da determinação do número de bactérias e de fungos por grama ou mililitro de produto, sendo especificados os microrganismos caso seja detetado o seu crescimento, com especial atenção a microrganismos patogénicos, dos quais: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* e *Clostridium sp.* Devem ser seguidos os requisitos e procedimentos descritos na norma ISSO 11930:2012, para aferir estabilidade microbiológica (61).

6.8. Ensaaios de estabilidade

O propósito dos ensaios de estabilidade de produtos cosméticos é assegurar que o produto cumpre os critérios de qualidade físicos, químicos e microbiológicos pretendidos, assim como a sua função e estética quando acondicionados de forma adequada. O estudo da estabilidade fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (62).

De acordo com as *Guidelines* existentes, os testes devem ser feitos de modo a assegurar a estabilidade e integridade física do produto cosmético em condições específicas de armazenamento, transporte e utilização. Devem ser garantidas a estabilidade química, a estabilidade microbiológica e a compatibilidade entre o recipiente de armazenamento e o conteúdo (62).

Um teste de estabilidade deve ter em consideração:

- A utilização de métodos que irão acelerar e permitir antever os efeitos de condições normais de uso e armazenamento ao longo do tempo;
- A avaliação de propriedades estéticas críticas como a cor, fragrância, textura e fluidez, particularmente após exposição a condições projetadas para enfatizar cada propriedade;
- O impacto da embalagem na manutenção da qualidade do produto, assim como os efeitos que este pode ter na embalagem (62).

Antes dos ensaios de estabilidade propriamente ditos, pode ser feita a determinação da conformidade genérica do produto: método de centrifugação. Neste, a força gravítica atua sobre o produto, promovendo o movimento das suas partículas. A centrifugação gera stresse na preparação pois são criadas condições que simulam um aumento da força da gravidade, o que permite antecipar possíveis alterações de estabilidade. Estas alterações podem ser observadas sob a forma de precipitados, ocorrência de separação de fases, formação de sedimentos compactos (*caking*), coalescência, entre outros. As amostras são centrifugadas a temperatura, tempo e velocidade padronizados e depois são verificadas, visualmente. A não ocorrência de separação de fases não assegura a sua estabilidade,

somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação, aos testes de estabilidade (61).

As técnicas de envelhecimento utilizadas para avaliar a estabilidade dos produtos cosméticos devem ser adaptadas ao tipo de amostra para que seja possível detetar quaisquer alterações nas características da preparação. Interessa, por isso, realizar ensaios de estabilidade num curto espaço de tempo, pelo que se efetuam ensaios de estabilidade acelerada. Estes ensaios permitem aumentar a velocidade das alterações físicas e/ou químicas do produto e podem recorrer a diferentes métodos, tais como os testes mecânicos ou testes que utilizam condições de temperatura e humidade exageradas (61).

As condições apropriadas devem ser escolhidas de acordo com o produto a ser testado. Para os testes de estabilidade acelerada, as condições de armazenagem mais comuns são: temperatura (elevada, do ambiente e baixa), exposição à luz e ciclos de congelamento e de descongelamento. A temperatura ambiente deverá ser monitorada, sendo aceita variação de até $\pm 2^{\circ}\text{C}$ e as temperaturas elevadas devem obedecer aos limites mais frequentemente praticados, em estufas a 37, 40, 45 e 50°C , sendo aceita variação de até $\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os limites de temperaturas baixas mais utilizados são 5°C , -5 a -10°C . Estes testes têm a duração média de 90 dias (61).

6.8.1. Testes de *stresst*érmico

Em embalagem adequada, semelhante àquela a ser utilizada para a comercialização do produto cosmético, 10 g da amostra devem ser submetidos a condições extremas de temperatura, como 5°C e 45°C , para permitir a deteção de sinais de instabilidade perante mudanças de temperaturas ou sob manutenção de temperaturas baixas e elevadas por um determinado intervalo de tempo. A não ocorrência de separação de fases deve ser indicativa de estabilidade do produto ensaiado (61).

6.8.2. Ciclos de congelamento e descongelamento

Cerca de 10g da amostra devem ser submetidos a condições extremas de temperatura, nos chamados ciclos, sendo considerados para efeito de estudo de estabilidade preliminar, a realização de pelo menos seis ciclos.

Os ciclos de congelamento e descongelamento alternam 24 horas em temperaturas elevadas e 24 horas em temperaturas baixas, sendo recomendados os seguintes conjuntos: ambiente e $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $45 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (61).

6.8.3. Exposição à luz solar

Cerca de 10g da amostra devem ser submetidos a condições extremas de incidência luminosa direta, para detecção de sinais de instabilidade à exposição à luz. A não ocorrência de separação de fases e a não alteração da coloração devem ser indicativas de estabilidade do produto ensaiado (61).

6.8.4. Análise organoléptica

Os caracteres organolépticos constituem o indicativo mais acessível na avaliação da qualidade de uma preparação semissólida e na detecção de alterações desta. O simples exame visual pode funcionar como um indicativo da homogeneidade da preparação (61).

Qualquer indivíduo, após a aplicação de um creme na pele, submete-o, involuntariamente a uma análise visual, olfativa e táctil (61).

A cor, o aroma e o aspeto são três índices seguros para elucidar quanto ao estado de conservação da preparação, pelo que uma mudança da cor, do aspeto ou um cheiro diferente, mais ou menos pronunciado, são indícios de que houve alteração (61).

A amostra deve ser analisada, em relação ao padrão, a fim de avaliar as características macroscópicas para verificação de sinais de instabilidade. O aspeto pode ser descrito como granulado, pó seco, pó húmido, cristalino, pasta, gel, fluido, viscoso, volátil, homogéneo, heterogéneo, transparente, opaco e leitoso. A amostra pode ser descrita como normal, sem alteração; levemente separada, precipitada, turva; separada, precipitada, turva (61).

A colorimetria deve ser realizada pela comparação visual, sob condições de luz branca e espectrofotométrica, pela análise na região espectral do visível, da cor da amostra com a cor do padrão, armazenado nas mesmas condições e embalagem que a amostra (61).

A comparação visual da cor da amostra ensaiada com a cor do padrão deve ser realizada em cerca de 5 g da amostra acondicionados em frascos iguais. A fonte de luz empregada deve ser a luz branca, natural. A amostra pode ser classificada, em relação à cor em: normal, sem alteração; levemente modificada; modificada; intensamente modificada (61).

O odor da amostra ensaiada deve ser comparado ao odor do padrão, diretamente através do olfato. A amostra pode ser classificada, em relação ao odor em: normal, sem alteração; levemente modificado; modificado; intensamente modificado (61).

6.8.5. Determinação do pH

A determinação do pH deve ser realizada numa dispersão aquosa a 10% (m/m) da amostra ensaiada em água recém destilada, com recurso a um medidor de pH digital, que avalia a diferença de potencial entre dois elétrodos imersos na amostra em estudo. O eléctrodo deve ser inserido diretamente na dispersão aquosa, sendo que valores mantidos entre 5,5 e 6,5, compatíveis com o pH cutâneo, devem ser usados como critério de estabilidade (61).

6.8.6. Determinação da viscosidade

A viscosidade é um parâmetro altamente dependente das características físico-químicas e das condições de temperatura da amostra. Existem vários métodos para a sua determinação. Os mais frequentes utilizam viscosímetros rotativos, de orifício e capilares. A determinação por viscosímetro rotativo consiste na medição do torque requerido para rodar uma agulha imersa numa amostra. Dependendo da faixa de viscosidade da amostra, selecciona-se a agulha (*spindle*) adequada. Cerca de 8 a 15 g de amostra devem ser analisados no dispositivo de amostras, sendo que o sensor imerso possibilita, sob velocidades crescentes, a leitura das viscosidades. Podem ser traçadas curvas ascendente e descendente, correspondentes a velocidades crescentes e decrescentes, a fim de permitirem a classificação da amostra como um sistema Newtoniano ou não-Newtoniano, isto é, que apresenta ou não viscosidades constantes sob qualquer condição (61).

6.8.7. Determinação da extensibilidade

A determinação da extensibilidade da amostra deve ser realizada a partir da leitura dos diâmetros abrangidos por esta num sistema formado por uma placa molde circular de vidro com orifício central, sobre uma placa suporte de vidro posicionada sobre uma escala milimétrica. Cerca de 0,3g de produto devem ser colocados entre duas placas de vidro, com 10 X 18 cm e 0,5 cm de espessura, sendo uma delas disposta sobre um papel milimétrico numa placa de madeira. A adição de pesos calibrados de 250, 500, 750 e 1000 g, a cada três minutos, na placa superior, promove o espalhamento do produto, que pode ser medido como extensibilidade, em centímetros (61).

6.8.8. Determinação da textura

Para a análise da textura, geralmente realiza-se o teste da penetração, no qual uma sonda penetra na amostra a uma determinada velocidade e a uma distância pré-definida, voltando depois para uma posição a uma distância pré-determinada acima da superfície da amostra (61).

6.8.9. Estudo do comportamento reológico

A determinação do comportamento reológico é realizada em reómetro acoplado a banho termostaticado, por meio de ensaios rotativos e oscilatórios, para caracterização reológica dos produtos estudados. Os ensaios rotativos permitem a determinação/análise de diversos parâmetros, como o fluxo da amostra, da tixotropia e o limite de escoamento (61).

7. Preparação da emulsão O/A contendo extrato de *A. campestris* L.

Tendo em conta uma formulação quadro para cremes descrita por (26) desenvolver-se-ia a emulsão abaixo descrita:

Fórmula para a emulsão O/A *Artemisia campestris* L.

Parafina líquida (Óleo mineral)-----	10%
Cera branca (ceras)-----	2%
Glicerina (humectante)-----	15%
Carbómero 940 (espessante)-----	10%
Polissorbato 80 (agente emulsivo)-----	5%
Acetato de tocoferilo (Vitamina E) (antioxidante)-----	5%
Etanol (solvente)-----	1%
Extrato <i>A. campestris</i> L.-----	x%
Parabenos (conservante)-----	1%
Água purificada-----	qbp 100%

Os compostos selecionados para esta formulação estão amplamente estudados e são habitualmente usados em produtos cosméticos.

Tal como referido anteriormente, a concentração de extrato de *A. campestris* L. está condicionada aos resultados dos ensaios de atividade antioxidante, sendo que e segundo a fórmula quadro em que este

trabalho se baseia a sua concentração, aliada à da Vitamina E (seria o outro ingrediente ativo desta formulação) não deve ultrapassar os 10%. No caso de necessidade de adaptação de quantidades e tendo em conta o objetivo deste trabalho, sugere-se a diminuição da quantidade de vitamina E. De referir que a Vitamina E é um potente antioxidante e fotoprotetor, comumente empregue em formulações cosméticas (26). Esperar-se-ia, com a sua adição, um aumento da atividade antioxidante da formulação, com comprovada ação preventiva do fotoenvelhecimento.

No que diz respeito à preparação da emulsão e assumindo uma escala laboratorial:

- Aquecer os compostos oleosos entre 70°C a 75°C em banho de água termostaticado;
- Aquecer os compostos hidrossolúveis entre 70°C a 75°C em banho de água termostaticado;
- Adicionar a fase oleosa à fase aquosa, alternando a incorporação de porções da fase oleosa com agitação (feita, por exemplo, num agitador mecânico, tipo Unguator®);
- Após arrefecimento adicionar o extrato de *A. campestris* L. L. e a vitamina E a cerca de 30°C, com homogeneização final;
- Medir pH (que se deve situar entre os 5,5-6,5), ajustando caso necessário;
- Acondicionar no recipiente final e rotular.

Numa lógica de sistematização de processos, apresenta-se um fluxograma de produção desta emulsão (Figura 6).

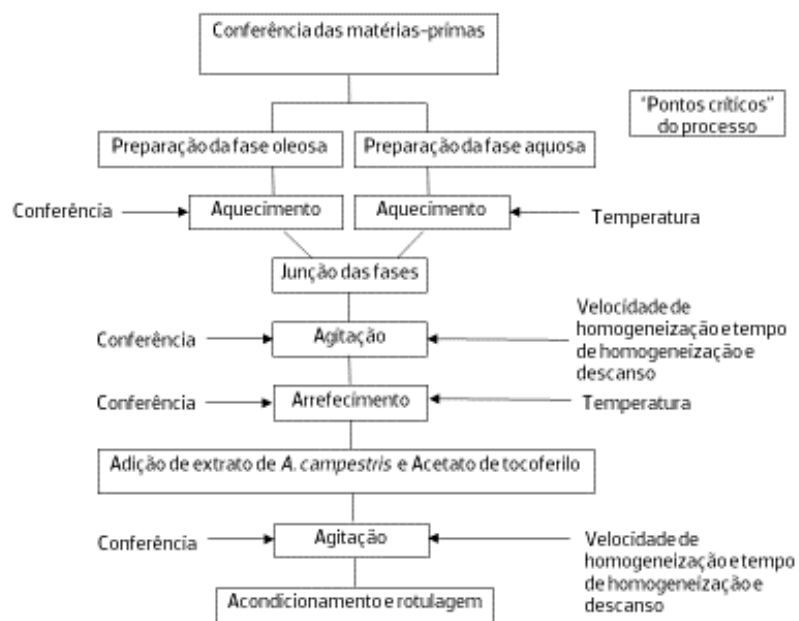


Figura 6. Fluxograma da produção de uma emulsão O/A com *A. campestris* L.

Existem um conjunto de pontos de controlo do processo (assinalados lateralmente no fluxograma), sendo estes considerados os “pontos críticos” na preparação de emulsões, estando relacionados com a velocidade, tempo de agitação e com a temperatura. Estas variáveis devem padronizar-se, já que condicionam diretamente a estabilidade da formulação. No caso da temperatura, nunca ultrapassar os 80°C, uma vez que esta condiciona a mais rápida oxidação das gorduras. Parâmetros relacionados com a agitação devem ser estabelecidos, podendo, em pequena escala, ser efetuados manual ou mecanicamente. A agitação mecânica é tida como mais eficaz, uma vez que, com o atingimento de velocidades maiores que a agitação manual, mais facilmente se conseguem dispersar os glóbulos constituintes da fase interna dispersa. Devem alternar-se momentos de agitação com momentos de repouso, uma vez que a agitação mecânica contínua poderia provocar, mais fácil e rapidamente, fenómenos de separação de fases (63).

Após 24h da produção da emulsão retira-se uma amostra de 150g para a determinação das propriedades reológicas, da viscosidade e teste da extensibilidade do produto (todos com três determinações).

Também após 24h (e repetidos trimestralmente para verificar possíveis alterações) deve ser realizada análise e documentação das características organolépticas (aspeto, coloração e odor), testes de *stress*térmico, ciclos de congelamento e descongelamento, viscosidade, e exposição à luz solar.

No caso da emulsão em questão, espera-se um aspeto homogéneo, brilhante, de coloração branca, opaca e sem odor. Alterações nas características organolépticas, nomeadamente cor, devido a oxidação de compostos oleosos é espectável, não sendo, tendo em conta as matérias-primas empregues, espectáveis outro tipo de alterações. Relativamente ao pH, é de esperar que ele varie ligeiramente ao longo do tempo em que decorrem os ensaios de estabilidade. Contudo, estas variações costumam manter as formulações dentro da faixa considerada mais adequada para os produtos de aplicação tópica, não sendo considerado um fator de instabilidade. Por último, no caso de exposição a temperaturas mais elevadas (como no caso do ensaio de stress térmico) é espectável que haja um aumento da viscosidade da formulação por perda de água por evaporação (64).

Considerações finais

A *A. campestris L.* é uma planta amplamente distribuída por todo o mundo, sendo conhecidos inúmeros efeitos benéficos desta, nomeadamente a sua atividade anti-inflamatória e antioxidante, em grande parte devido à produção de flavonóides, metabolitos secundários produzidos por esta espécie vegetal.

O presente estudo contribui para o estabelecimento de protocolos de extração desta planta, ensaios para determinação de atividade antioxidante e potencial protetor *in vitro*, assim como um protocolo e fluxograma de produção de uma emulsão O/A, com a descrição ensaios de estabilidade a realizar ao nível da hidratação. Os dados aqui apresentados resultam da integração de estudos e conhecimento científico, pelo que este poderá ser um guia em trabalhos futuros nos quais haja a possibilidade de avançar para a execução dos mesmos

A grande limitação do presente trabalho foi a impossibilidade da realização de trabalho laboratorial, face ao atual contexto de pandemia. Assim e futuramente seria importante efetuar ensaios laboratoriais de modo a corroborar e complementar o presente trabalho, permitindo também a execução de um teste de eficácia da emulsão produzida, avaliando os efeitos desta quando utilizada como creme cosmético diário, tanto nível da hidratação da pele como da sua atividade antioxidante.

Espera-se, assim, que esta dissertação sirva de base teórica para a formulação de uma emulsão cosmética O/A contendo *A. campestris L.*, o seu aperfeiçoamento e garantia do controlo de qualidade.

Referências bibliográficas

1. Lee CJ, Chen LG, Chang TL, Ke WM, Lo YF, Wang CC. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. *Food Chem.* 2011;124(3):833–41.
2. Abbasi AM, Khan MA, Ahmad M, Zafar M, Jahan S, Sultana S. Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *J Ethnopharmacol.* 2010;128(2):322–35.
3. Khavkin J, Ellis DAF. *Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology* [Internet]. Vol. 19, *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*. Elsevier Ltd; 2011. p. 229–34.
4. Działo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. 2016. p. 1–41.
5. Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC, Wong JK. The dynamic anatomy and patterning of skin. *Exp Dermatol.* 2016;25(2):92–8.
6. PDQ Screening and Prevention Editorial Board. *Skin Cancer Screening (PDQ®): Patient Version*. [Internet]. 2020. Available from: in: *PDQ Cancer Information Summaries* [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.
7. *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. *Cosmetic Formulation of Skin Care Products*. 2005.
8. Sofowora A, Ogunbodede E, Onayade A, Dentistry C. The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. 2013;10:210–29.
9. Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Vol. 33, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000. p. 179–89.
10. Saikia AP, Ryakala VK, Sharma P, Goswami P, Bora U. Ethnobotany of medicinal plants used by Assamese people for various skin ailments and cosmetics. *J Ethnopharmacol.* 2006;106(2):149–57.
11. Allemann IB, Baumann L. Botanicals in skin care products. Vol. 48, *International Journal of Dermatology*. 2009. p. 923–34.
12. Jamshidi-Kia F, Lorigooini Z, Amini-Khoei H. Medicinal plants: Past history and future perspective. Vol. 7, *Journal of HerbMed Pharmacology*. 2018. p. 1–7.
13. Ferreira VF, Pinto AC. A fitoterapia no mundo atual. Vol. 33, *Quimica Nova*. 2010. p. 1829.
14. Wink, Michael; Van Wyk BE. *Medicinal Plants Of the World*. 2017. 520 p.
15. Dar RA, Shahnawaz M, Qazi PH, Qazi H. General overview of medicinal plants: A review [Internet]. Vol. 6, *The Journal of Phytopharmacology*. 2017.
16. Inamdar N, Edalat S, Kotwal V, Pawar S. Herbal drugs in milieu of modern drugs. *Int J Green Pharm.*

- 2008;2(1):2.
17. Shakya AK. Medicinal plants : Future source of new drugs. *Int J Herb Med.* 2020;4(4):59–64.
 18. World Health Organization. WHO Global report on traditional and complementary medicine 2019 [Internet]. World Health Organization. 2019. 1–228 p.
 19. Kurmukov AG. Phytochemistry of medicinal plants. In: *Medicinal Plants of Central Asia: Uzbekistan and Kyrgyzstan.* 2013. p. 13–4.
 20. Zambrano, Erika, Carolina, Kotog A. Plant phenolics and phenolic-enriched extracts as antimicrobial agents against. 2020;5(11):78–89.
 21. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines.* 2018;5(3):93.
 22. Xu DP, Li Y, Meng X, Zhou T, Zhou Y, Zheng J, et al. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences.* 2017. p. 20–31.
 23. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. Vol. 4, *International Journal of Biomedical Science.* 2008. p. 89–96.
 24. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. Vol. 63, *Journal of Natural Products.* 2000. p. 1035–42.
 25. União Europeia. Regulamento (CE) N°1223/2009 Do Parlamento Europeu e do Conselho. *J Of da União Eur.* 2009;151.
 26. Barata EAF. *Cosméticos. A Cosmética, Inovações E Enquadramento.* 2018. 328 p.
 27. Aburjai T, Natsheh FM. Plants Used in Cosmetics. Vol. 17, *Phytotherapy Research.* 2003. p. 987–1000.
 28. Antignac E, Nohynek GJ, Re T, Clouzeau J, Toutain H. Safety of botanical ingredients in personal care products/cosmetics. Vol. 49, *Food and Chemical Toxicology.* Elsevier Ltd; 2011. p. 324–41.
 29. Chen G, Tao D. An experimental study of stability of oil-water emulsion. *Fuel Process Technol.* 2005;86(5):499–508.
 30. Allen L V., Popovich NG, Ansel HC. *Ansel's pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems: Ninth edition.* Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems: Ninth Edition. 2012. 1–710 p.
 31. Megdiche-Ksouri W, Trabelsi N, Mkadmini K, Bourgou S, Noumi A, Snoussi M, et al. *Artemisia campestris* phenolic compounds have antioxidant and antimicrobial activity. *Ind Crops Prod.* 2015;63:104–13.
 32. Karabegović I, Nikolova M, Veličković D, Stojičević S, Veljković V, Lazić M. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of methanolic extracts of the artemisia sp. recovered by different extraction techniques. *Chinese J Chem Eng.* 2011;19(3):504–11.

33. Abdulmageed Yarboa L. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of Menthe *Piperita*, *Artemisa campestris* L and *Pelargonium adoraitissimum* Leaves Extracts from North Libya. Biomed Stat Informatics. 2018;3(3):49.
34. Al-Snafi AE. The Pharmacological Importance of Aloe Vera- A Review. Int J Phytopharm Res. 2015;6(1):28–33.
35. Akrouf A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. Food Chem Toxicol. 2011;49(2):342–7.
36. Sefi M, Fetoui H, Makni M, Zeghal N. Mitigating effects of antioxidant properties of *Artemisia campestris* leaf extract on hyperlipidemia, advanced glycation end products and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. Food Chem Toxicol. 2010;48(7):1986–93.
37. Ghilissi Z, Sayari N, Kallel R, Bougateg A, Sahnoun Z. Antioxidant, antibacterial, anti-inflammatory and wound healing effects of *Artemisia campestris* aqueous extract in rat. Biomed Pharmacother. 2016;84:115–22.
38. Dib I, Angenot L, Mihamou A, Ziyat A, Tits M. *Artemisia campestris* L.: Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological review. Vol. 7, Journal of Herbal Medicine. Elsevier GmbH; 2017. p. 1–10.
39. JDavid. Mrzezyno *Artemisia campestris* littoral sprout 2010 [Internet]. 2010.
40. Olszewska MA, Michel P. Antioxidant activity of inflorescences, leaves and fruits of three sorbus species in relation to their polyphenolic composition. Nat Prod Res. 2009;23(16):1507–21.
41. Zheng W, Wang SY. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries, and lingonberries. J Agric Food Chem. 2003;51(2):502–9.
42. Al Jahid A, Essabaq S, Elamrani A, Blaghen M, Jamal Eddine J. Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oil and the Hydro-alcoholic Extract of *Artemisia campestris* L. Leaves from Southeastern Morocco. J Biol Act Prod from Nat. 2016;6(5–6):393–405.
43. Naili MB, Alghazeer RO, Saleh NA, Al-Najjar AY. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). Arab J Chem. 2010;3(2):79–84.
44. Bakchiche B, Gherib A, Bronze MR, Ghareeb MA. Identification, quantification, and antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Artemisia campestris* from Algeria. Turkish J Pharm Sci. 2019;16(2):234–9.
45. Saoudi M, Allagui MS, Abdelmouleh A, Jamoussi K, El Feki A. Protective effects of aqueous extract of *Artemisia campestris* against puffer fish *Lagocephalus lagocephalus* extract-induced oxidative damage in rats. Exp Toxicol Pathol. 2010;62(6):601–5.
46. Aniya Y, Shimabukuro M, Shimoji M, Kohatsu M, Gyamfi MA, et al. Antioxidant and

- hepatoprotective actions of the medicinal herb *Artemisia campestris* from the Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull.* 2000;23(309–312):2091.
47. Rodrigues IMC, Souza Filho APS, Ferreira FA. Estudo fitoquímico de *Senna alata* por duas metodologias. *Planta Daninha.* 2009;27(3):507–13.
 48. Kushwaha U. Evaluation of qualitative phytochemical analysis of water extract of *Achyranthes aspera* and *Achyranthes aspera* 30. *Indian J Res Homoeopath.* 2019;13(1):37–40.
 49. Georgé S, Brat P, Alter P, Amiot MJ. Rapid Determination of Polyphenols and Vitamin C in Plant-Derived Products. *J Agric Food Chem.* 2005 Mar;53(5):1370–3.
 50. Joshi A, Bhoje M, Sattarkar A. Phytochemical investigation of the roots of *Grewia microcosm* Linn. *J Chem Pharm Res.* 2013;5(7):80–7.
 51. Aziz MA. Qualitative phytochemical screening and evaluation of anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of *Microcos paniculata* barks and fruits. *J Integr Med.* 2015 May;13(3):173–84.
 52. Yadav R, Khare RK, Singhal A. Qualitative Phytochemical Screening of Some Selected Medicinal Plants of Shivpuri District (M.P.). *Int J Life-Sciences Sci Res.* 2017;3(1):844–7.
 53. Yadav M, Chatterji S, Gupta SK, Watal G. Preliminary phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2014;6(5):539–42.
 54. Ahn JH, Jo YH, Kim SB, Turk A, Oh K-E, Hwang BY, et al. Identification of antioxidant constituents of the aerial part of *Plantago asiatica* using LC–MS/MS coupled DPPH assay. *Phytochem Lett.* 2018 Aug;26:20–4.
 55. Canabady-Rochelle LLS, Harscoat-Schiavo C, Kessler V, Aymes A, Fournier F, Girardet J-M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. *Food Chem.* 2015 Sep;183:129–35.
 56. Xie M, Hu B, Wang Y, Zeng X. Grafting of Gallic Acid onto Chitosan Enhances Antioxidant Activities and Alters Rheological Properties of the Copolymer. *J Agric Food Chem.* 2014 Sep;62(37):9128–36.
 57. Kupina S, Fields C, Roman MC, Brunelle SL. Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, First Action 2017.13. *J AOAC Int.* 2018 Sep;101(5):1466–72.
 58. LGC standards, Primary Dermal Fibroblast; Normal, Human, Adult (HDFa) (ATCC® PCS-201-012™) [Internet]. Disponível em: <https://www.lgcstandards-atcc.org/>. Consultado a 29/12/2020.
 59. Oliveira AI, Pinho C, Fonte P, Sarmiento B, Dias ACP. Development, characterization, antioxidant and hepatoprotective properties of poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles loaded with a neuroprotective fraction of *Hypericum perforatum*. *Int J Biol Macromol.* 2018;110:185–96.
 60. Tadros TF. Rheology of Dispersions: Principles and Applications. *Rheol Dispersions Princ Appl.*

- 2004;
61. Isaac VLB, Cefali LC, Chiari BG, Oliveira CCLG, Salgado HRN, Corrêa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2008;29(1):81–96.
 62. Cosmetic Toiletry and Fragrance Association and The European Cosmetic Toiletry and Perfumery. Guidelines on Stability Testing of Cosmetic Products. *Cosmet Toilet Fragr Assoc Eur Cosmet Toilet Perfum Assoc.* 2004;(March):1–8.
 63. Prista, L. N, Alves, A. C, Morgado R, *Tecnologia Farmacêutica Vol. I.* 8th ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2011.
 64. Oliveira-Júnior RG, Souza GR, Ferraz CAA, Oliveira AP, Araújo CS et al. Development and evaluation of photoprotective O/W emulsions containing hydroalcoholic extract of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *Sci World J.* 2017.