

MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Preparações semissólidas cutâneas contendo colagénio para a regeneração da pele

Filipa Leal Silva

M

2022





Filipa Leal Silva

PREPARAÇÕES SEMISSÓLIDAS CUTÂNEAS CONTENDO COLAGÉNIO PARA A REGENERAÇÃO DA PELE

Dissertação do 2º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em Tecnologia
Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação da Prof. Doutora Maria Helena dos Anjos Rodrigues
Amaral

Setembro 2022

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS
PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO
INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

A elaboração de uma tese de mestrado requer uma enorme responsabilidade e é maioritariamente um ato individual. Contudo, várias pessoas contribuíram com os seus incentivos e sabedoria tornando este processo menos solitário e mais apazível. Gostaria de agradecer a algumas pessoas em particular que me ajudaram desde o primeiro dia:

À minha orientadora, Prof. Doutora Helena Amaral, um sincero obrigada pelo voto de confiança e pelo conhecimento científico partilhado, pela sua constante disponibilidade e bondade, compreensão, críticas e toda a ajuda.

Aos meus pais, obrigada por me incentivarem a seguir os meus sonhos e a nunca desistir. Sem o vosso encorajamento e apoio não teria chegado onde me encontro neste momento.

À minha colega de mestrado e de laboratório Marta, obrigada por estares sempre presente nos bons e maus momentos e por toda a ajuda e paciência ao longo destes meses. Obrigada por tornares esta experiência ainda mais agradável.

Ao Joel, muito obrigada pela tua simpatia e ajuda prestada ao longo da execução deste projeto.

Resumo

O colagénio é a proteína mais frequentemente utilizada em medicina regenerativa, uma vez que é uma das moléculas mais abundantes na matriz extracelular e, portanto, pode ser utilizada para acelerar o processo de cicatrização e regeneração da pele. O processo de cicatrização pode ser dividido em 4 fases (hemostasia, inflamação, proliferação e maturação/remodelação) e o colagénio está envolvido em vários processos ao longo das várias fases da cicatrização.

Este trabalho consistiu no desenvolvimento e caracterização de preparações cutâneas contendo colagénio para serem utilizadas no processo de regeneração da pele. Foram preparados cremes O/A, cremes A/O/A e um gele hidrófilo. O trabalho foi dividido em 3 fases: na primeira fase foram preparados os cremes O/A e o gele; na segunda fase foram preparados os cremes A/O/A contendo colagénio nativo e na terceira fase foi preparado um creme A/O/A com 5% (m/m) de colagénio hidrolisado em pó (C5_1), cujas características físico-químicas e estabilidade foram avaliadas ao longo de 21 semanas de armazenamento à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos demonstraram que o creme C5_1 apresentou boas características organoléticas, bem como firmeza, adesividade, espalhabilidade, pH e comportamento reológico adequados para aplicação na pele. Além disso, este creme apresentou boa estabilidade durante o período de armazenamento, podendo ser potencialmente utilizado em estudos posteriores para avaliação da regeneração da pele danificada.

Palavras-chave: Colagénio, creme O/A, creme A/O/A, hidrogele, regeneração da pele

Abstract

Collagen is the most frequently used protein in regenerative medicine, as it is one of the most abundant molecules in the extracellular matrix and therefore can be used to accelerate the healing and regeneration process of the skin. The healing process can be divided into 4 phases (hemostasis, inflammation, proliferation, and maturation/remodeling) and collagen is involved in several processes throughout the various phases of healing.

This work consisted in the development and characterization of skin preparations containing collagen to be used in the skin regeneration process. O/W creams, W/O/W creams and a hydrophilic gel were prepared. The work was divided into 3 phases: in the first phase, the O/W creams and the gel were prepared; in the second phase W/O/W creams containing native collagen were prepared and in the third phase a W/O/W cream with 5% (m/m) of hydrolyzed collagen powder (C5_1) was prepared, whose physicochemical characteristics and stability were evaluated over 21 weeks of storage at room temperature.

The results obtained showed that the C5_1 cream showed good organoleptic characteristics, as well as firmness, adhesiveness, spreadability, pH and rheological behavior suitable for application on the skin. In addition, this cream showed good stability during the storage period, and could potentially be used in further studies to assess the regeneration of damaged skin.

Keywords: Collagen, O/W cream, W/O/W cream, hydrogel, skin regeneration

Índice

Agradecimentos.....	VI
Resumo.....	VIII
Abstract.....	IX
Índice.....	X
Índice de Figuras.....	XII
Índice de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Pele Humana.....	1
1.2. Colagénio	4
1.3. Regeneração da Pele.....	8
1.4. Preparações semissólidas para aplicação cutânea.....	11
1.4.1. Cremes.....	12
1.4.2. Geles	13
1.5. Objetivos	14
2. PARTE EXPERIMENTAL	15
2.1. Matérias-primas e Equipamento	15
2.1.1. Matérias-primas	15
2.1.2. Equipamento	16
2.2. Métodos	17
2.2.1. Preparação dos cremes O/A e A/O/A e do gele hidrófilo.....	17
2.2.2. Caracterização das formulações.....	20
2.2.2.1. Análise Organolética.....	20
2.2.2.2. Análise da Cor.....	20
2.2.2.3. Avaliação do pH.....	22
2.2.2.4. Ensaio de Estabilidade Acelerada por Centrifugação	23

2.2.2.5.	Teste de Oclusão	24
2.2.2.6.	Ensaio Reológico.....	25
2.2.2.7.	Análise da Textura	27
2.2.2.8.	Análise da Espalhabilidade	29
2.2.2.9.	Quantificação do colagénio.....	30
2.2.2.10.	Ensaio de Libertação <i>in vitro</i>	32
2.2.2.11.	Análise Estatística	33
2.3.	Resultados e Discussão	33
2.3.1.	Análise Organolética.....	33
2.3.2.	Análise da Cor.....	34
2.3.3.	Avaliação do pH.....	37
2.3.4.	Ensaio de Estabilidade Acelerada por Centrifugação	39
2.3.5.	Teste de Oclusão	39
2.3.6.	Ensaio Reológicos.....	41
2.3.7.	Análise da Textura	45
2.3.8.	Análise da Espalhabilidade	50
2.3.9.	Quantificação do colagénio.....	51
2.3.10.	Ensaio de Libertação <i>in vitro</i>	52
3.	CONCLUSÕES.....	54
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

Índice de Figuras

Figura 1- As camadas da pele e os anexos associados. Adaptado de (6)	1
Figura 2- Os estratos da epiderme e algumas células que constituem esta camada da pele. Adaptado de (4)	2
Figura 3- Estrutura em tripla hélice do colagénio. Adaptado de (20).....	4
Figura 4- Artigos sobre colagénio publicados ao longo dos últimos 21 anos (século 21). Os dados foram recolhidos através de uma pesquisa na ISI Web of Knowledge™ utilizando o termo “collagen”.	6
Figura 5- As diferentes fases da cicatrização. (A) Hemostasia; (B) Inflamação; (C) Proliferação; (D) Maturação/Remodelação. Cada fase da cicatrização é caracterizada por eventos celulares e moleculares importantes, que são coordenados por vários fatores reconhecidos e libertados pelas células envolvidas na resposta a um ferimento. Alguns desses fatores estão representados nesta imagem. PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- Fator de transformação do crescimento; FGFs- Fator de crescimento de fibroblastos; IL-1- Interleucina-1; TNF-Fator de necrose tumoral; IGF- Fator de crescimento semelhante à insulina; IFN- Interferão; VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular; HGF- Fator de crescimento de hepatócitos; MMPs- Metaloproteinases da matriz; TIMPs- Inibidores teciduais de metaloproteinases. Adaptado de (53)	9
Figura 6- Representação do espaço cromático $L^*a^*b^*$. Adaptado de (69)	21
Figura 7- Colorímetro Konica Minolta Chroma Meter 400 (Japão).	22
Figura 8- Potenciómetro Hanna Instruments 2211 (Roménia).	23
Figura 9- Centrífuga Eppendorf 5804 (Alemanha).	24
Figura 10- Representação gráfica tensão de corte (τ) em função da velocidade de corte ($\dot{\gamma}$) de alguns comportamentos reológicos. Adaptado de (79)	26
Figura 11- Viscosímetro Thermo Haake VT-550 (Alemanha) com a respetiva sonda utilizada neste ensaio.....	27
Figura 12- Gráfico da Força (N) versus Distância (mm). A Força máxima corresponde à firmeza e a área negativa (verde) corresponde à adesividade.	28
Figura 13- Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i (Reino Unido) com a sonda utilizada no ensaio da análise da textura.....	29
Figura 14- Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i com a sonda TTC Spreadability Rig (HDP/SR).....	30
Figura 15- Representação das reações que ocorrem no ensaio da proteína BCA. Adaptado de (88).....	31
Figura 16- Espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-650 (Japão).	32

Figura 17- Aparelho de dissolução Sotax AG AT7 com pás agitadoras e recipientes com as amostras.....	33
Figura 18- Aspeto dos cremes C5_1 (esquerda) e C5_1B (direita) ao fim de 15 semanas de armazenamento à temperatura ambiente.	34
Figura 19- Representação gráfica da variação da luminosidade do creme C5_1 e C5_1B em função do tempo (semanas).	35
Figura 20- Representação gráfica da variação do parâmetro Chroma (C*) relativo aos cremes C5_1 e C5_1B em função do tempo (semanas).	36
Figura 21- Representação gráfica da variação do pH do creme C5_1 e do creme base em função do tempo.	38
Figura 22- Aspeto dos cremes C5_1 (A) e C5_1B (B) após serem submetidos ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.	39
Figura 23- Reogramas das preparações C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1, analisados à temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$	41
Figura 24- Reogramas das preparações C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1, analisados à temperatura de $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$	42
Figura 25- Reogramas do creme C5_1 analisado a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$	43
Figura 26- Reogramas do creme C5_1 analisado a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$	43
Figura 27- Reogramas do creme C5_1B analisado a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$	44
Figura 28- Reogramas do creme C5_1B analisado a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$	44
Figura 29- Firmeza das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 à temperatura ambiente ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$).	45
Figura 30- Adesividade das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 à temperatura ambiente ($20 \pm 1^{\circ}\text{C}$).	46
Figura 31- Firmeza das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$	46
Figura 32- Adesividade das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 a $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$	47
Figura 33- Comparação da Força Máxima (N) do creme C5_1 a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.	47
Figura 34- Comparação da Força Máxima (N) do creme C5_1B a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.	48
Figura 35- Comparação da Área Negativa (N.mm) do creme C5_1 a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.	49
Figura 36- Comparação da Área Negativa (N.mm) do creme C5_1B a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.	50
Figura 37- Comparação da Área Positiva (N.mm) dos cremes C5_1 e C5_1B a 32°C ao fim de 1 e 21 semanas de armazenamento.	51

Figura 38- Curva de calibração das soluções padrão de colagénio.	52
Figura 39- Perfis de libertação in vitro dos cremes C5_1 e C3_2.	53

Índice de Tabelas

Tabela 1- Algumas vantagens e desvantagens das diferentes fontes de colagénios. Adaptado de (31, 34, 35).....	7
Tabela 2- Vantagens e Desvantagens das emulsões múltiplas como veículos utilizados na administração tópica de fármacos. Adaptado de (59-61).....	13
Tabela 3- Vantagens e desvantagens dos hidrogéis como veículos utilizados na administração tópica de fármacos. Adaptado de (63).....	14
Tabela 4- Lista de matérias-primas utilizadas no trabalho experimental.	15
Tabela 5- Lista de equipamentos utilizados no trabalho experimental.....	16
Tabela 6- Composição dos cremes O/A contendo colagénio.	18
Tabela 7- Composição do gele hidrófilo contendo colagénio.	19
Tabela 8- Composição do creme A/O/A contendo colagénio.	19
Tabela 9- Luminosidade das preparações C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas. Os resultados correspondem ao valor médio de 4 medições $\pm$ desvio padrão.34	
Tabela 10- Variação do parâmetro Chroma das preparações semissólidas C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas.	36
Tabela 11- Valores de pH das formulações C1, C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de 3 medições $\pm$ desvio padrão. ...	37
Tabela 12- Resultados do teste de oclusão das formulações C3, C3_1,C4,C4_1,C4_2,C5_1, C5_1B e G1.	40

Lista de Abreviaturas e Símbolos

aa	Aminoácidos
A/O	Água/Óleo
A/O/A	Água/Óleo/Água
BCA	Ácido Bicinconínico
ECM	Matriz extracelular (do inglês <i>Extracellular Matrix</i>)
kDa	Kilodaltons
kg	Quilogramas
m/m	Massa/Massa
mg	Miligramas
ml	Mililitros
mm	Milímetros
N	Newton
nm	Nanómetros
O/A	Óleo/Água
O/A/O	Óleo/Água/Óleo
Pa	Pascal
q.b.p	Quanto baste para
rpm	Rotações por minuto
TEA	Trietanolamina
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micrómetro

1. INTRODUÇÃO

1.1. Pele Humana

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a cerca de 15% do peso corporal total de um adulto (1). Este órgão desempenha várias funções vitais, atuando como uma barreira protetora contra agressões externas químicas, físicas e biológicas, devido a uma estrutura elaborada que reúne tecidos de várias origens (nervoso, muscular, vascular, conjuntivo e epitelial) (1, 2). Além de atuar como uma barreira protetora, a pele é também capaz de manter a homeostasia do corpo, prevenindo a perda de água e de eletrólitos e regulando a temperatura corporal (3-5).

A pele humana está dividida em três camadas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Ao longo das várias camadas da pele é ainda possível encontrar vários anexos associados, tais como as glândulas sudoríparas e sebáceas e os folículos pilossebáceos (1-3, 6). A estrutura da pele e alguns dos seus anexos estão representados na **Figura 1**.

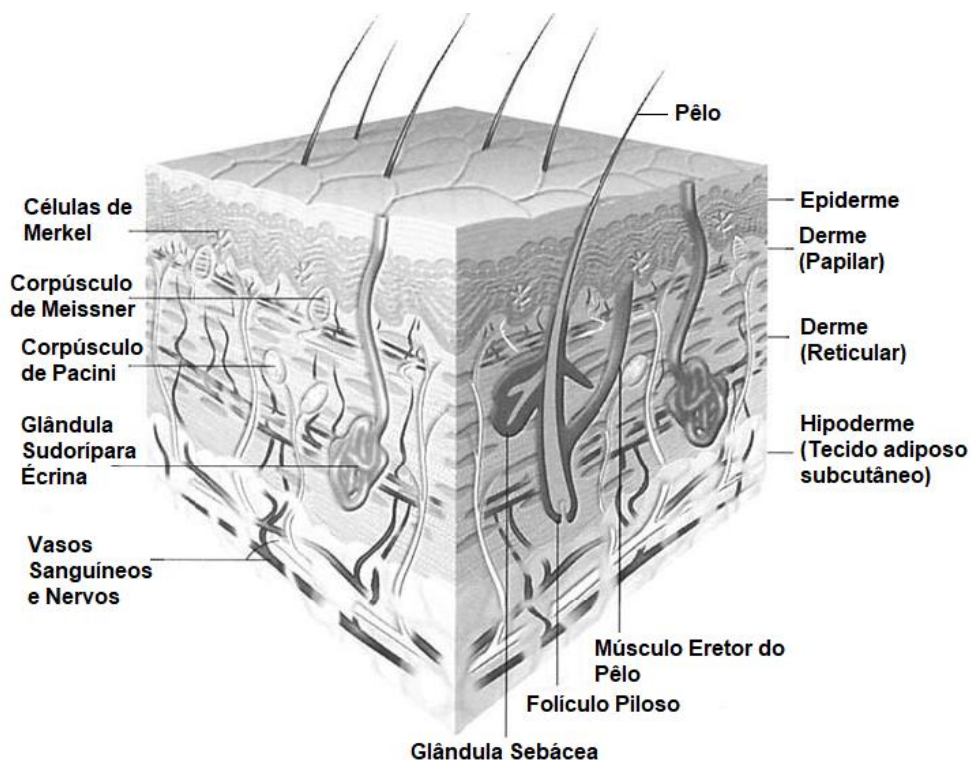


Figura 1- As camadas da pele e os anexos associados. Adaptado de (6)

A epiderme é a camada mais superficial da pele e encontra-se organizada em diferentes estratos de células epiteliais queratinizadas, renovando-se constantemente. Esta camada subdivide-se em 5 estratos (do mais interno para o mais externo): estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (apenas presente em zonas de pele mais espessa) e estrato córneo (1, 7, 8) (**Figura 2**).

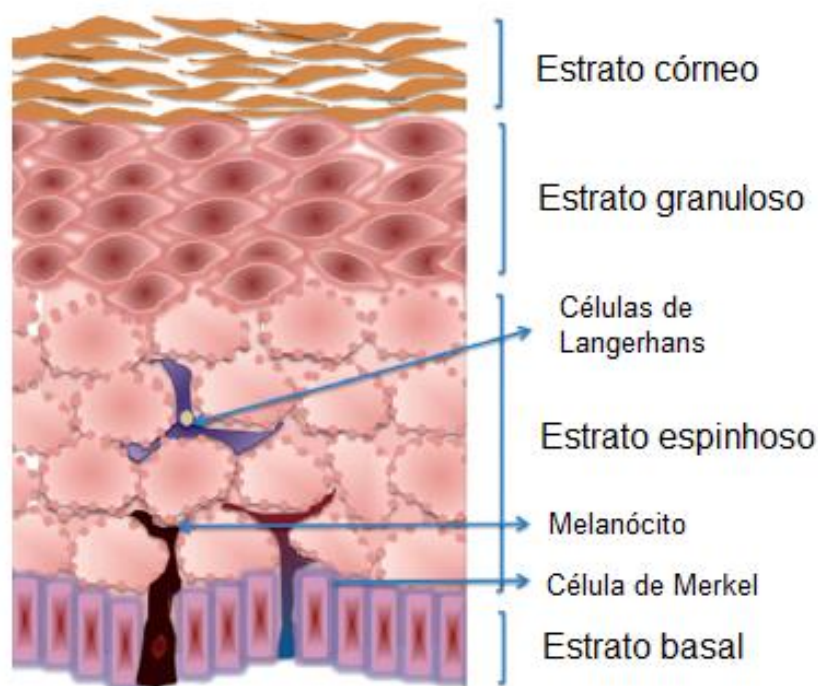


Figura 2- Os estratos da epiderme e algumas células que constituem esta camada da pele. Adaptado de (4)

O principal tipo de células presente nesta camada são os queratinócitos (90-95%). Estas células epiteliais são formadas no estrato basal e, à medida que avançam através dos vários estratos da epiderme vão sofrendo um processo de diferenciação, resultando na formação de células achatadas e anucleadas, os corneócitos (1, 7). As restantes células que constituem a epiderme são: células de Langerhans, melanócitos e células de Merkel (1). As células de Langerhans são formadas na medula óssea e encontram-se distribuídas pelos estratos intermédios da epiderme, onde irão participar na ativação do sistema imunitário. Os melanócitos estão presentes no estrato basal e são responsáveis pela produção do pigmento melanina, que irá proteger a pele dos raios ultravioleta. Por último, as células de Merkel, também presentes no estrato basal, estão associadas a terminações nervosas e podem funcionar como mecanorreceptores de tipo I (1-3, 6-8).

A derme está ligada à epiderme através da junção dermoepidérmica e a sua espessura varia entre 1 mm, nas pálpebras dos olhos e 5 mm nas costas e nas coxas (1, 9). Esta

camada é formada por várias células, fibras elásticas, nervos, vasos sanguíneos e proteoglicanos (1, 3). A derme é constituída por tecido conjuntivo denso e subdivide-se em 2 regiões distintas, a derme papilar e a derme reticular (10, 11). A derme papilar é a subcamada mais superficial da derme e está conectada à epiderme através de projeções cónicas, também denominadas papilas dérmicas. Esta subcamada é mais fina do que a derme reticular, mas apresenta uma maior quantidade de fibroblastos (12). A derme papilar é composta por fibras de colagénio e de elastina dispostas numa rede frouxa e orientadas verticalmente, várias células (fibroblastos, fibrócitos, dendrócitos, mastócitos), vasos sanguíneos e terminações nervosas (1, 3, 13). A derme reticular é mais espessa do que a papilar e tanto as fibras de colagénio como de elastina encontram-se dispostas paralelamente à epiderme e com um maior nível de organização. Para além disso, também estão presentes fibrócitos e fibroblastos, em menor quantidade, assim como nervos e vasos sanguíneos (3, 8, 13).

A hipoderme é a camada mais profunda da pele e é composta por tecido adiposo. As principais células da hipoderme são os adipócitos, células grandes e arredondadas, que se encontram organizados em lóbulos primários e secundários divididos por septos fibrosos constituídos por células, colagénio, vasos sanguíneos e nervos (1, 13). Esta camada desempenha várias funções, nomeadamente termorregulação, isolamento, reserva nutricional (fornece energia) e proteção contra lesões mecânicas (1, 3).

Por último, é importante referir os diferentes tipos de anexos cutâneos que se encontram distribuídos pelas várias camadas da pele, estando mais concentrados na derme e na hipoderme (1). As glândulas sudoríparas podem ser classificadas como glândulas sudoríparas écrinas ou apócrinas. As glândulas sudoríparas écrinas estão relacionadas com a termorregulação enquanto as glândulas apócrinas fazem parte da unidade pilossebácea e produzem um suor inodoro, que adquire um odor desagradável quando entra em contacto com bactérias da superfície (1, 3, 13). A unidade pilossebácea é constituída pelo folículo piloso, pelo, glândula sebácea e músculo eretor do pelo. Estas unidades encontram-se distribuídas por toda a superfície da pele, exceto nas solas dos pés, palmas das mãos e partes genitais (1, 3, 8, 13). Esta unidade está relacionada com a manutenção da pele, regulação da temperatura e função sensorial (8).

1.2. Colagénio

A matriz extracelular (ECM) dos tecidos conjuntivos é composta por elementos de diversas famílias de proteínas, sendo a maioria pertencente à família dos colagénios (14). Todas as proteínas da família dos colagénios são estruturalmente constituídas por uma tripla hélice com três cadeias de polipeptídeos, denominadas cadeias α , que são formadas na matriz extracelular, no entanto, o seu tamanho, função e distribuição tecidual varia consideravelmente (14-19) (**Figura 3**). As três cadeias α podem ser idênticas para formar homotrímeros, ou diferentes, formando heterotrímeros. As sequências das cadeias polipeptídicas podem ser expressas como $(\text{Gli-X-Y})_n$, onde X e Y representam outros aminoácidos (aa) para além da glicina e n varia consoante o tipo de colagénio e o domínio. A presença da glicina, o mais pequeno dos 20 aa que constituem as proteínas, a cada terceira posição é essencial, uma vez que um aminoácido (aa) maior não iria caber no espaço restrito no centro da hélice tripla. As posições X e Y costumam estar ocupadas com prolina e hidroxiprolina, respetivamente, que são dois aa que conferem estabilidade à hélice tripla (14, 16, 20).

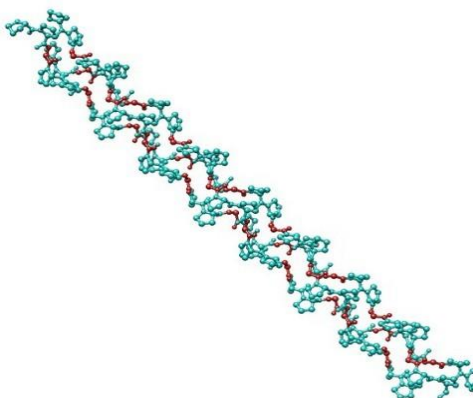


Figura 3- Estrutura em tripla hélice do colagénio. Adaptado de (20)

Na literatura é possível encontrar vários artigos que mencionam as diversas aplicações do colagénio como biomaterial. Na área da medicina, o colagénio é bastante utilizado na engenharia de tecidos, uma vez que apresenta uma excelente biocompatibilidade, e também na cicatrização de feridas, promovendo a proliferação de fibroblastos e acelerando o processo de cicatrização, exercendo influência em todas as fases do processo. Por outro lado, recentemente tem sido demonstrado que o colagénio poderá ser uma boa opção para a distribuição de fármacos, sendo utilizado na forma de filmes, esponjas, geles, *pellets* e nanopartículas (21, 22). Na área da medicina estética é possível encontrar o colagénio em preenchimentos dérmicos e na área da cosmética tem sido utilizado em *scaffolds* para

substituir a pele, hidrogeles e cremes e até pode ser utilizado como agente espessante (23, 24).

Danila et al (25) formularam e caracterizaram várias emulsões O/A com colagénio hidrolisado e misturas de óleos vegetais. A percentagem de colagénio em todas as formulações era 1%, a fase hidrófoba consistia em misturas de óleos de coco, amêndoa, jojoba e abacate (em razões diferentes) e a fase aquosa era composta por água de lavanda. Para além disso, adicionaram um emulsionante (monoestearato de glicerol e estearato de potássio) em concentrações que variavam entre 4-5%, um agente espessante (goma xantana, gama de concentrações 0,2-1%), e como conservantes duas misturas diferentes, uma de óleos essenciais (limão e lavanda) e outra denominada *Cosgard* (álcool benzílico, ácido salicílico, glicerol e ácido ascórbico). Após análise das propriedades físico-químicas destas formulações chegaram à conclusão de que estas emulsões apresentavam um comportamento reológico pseudoplástico e tixotrópico, o pH encontrava-se dentro do intervalo de pH da pele e durante 6 meses não demonstraram qualquer tipo de separação, sendo adequadas para formulações utilizadas em produtos cosméticos para a pele.

Danila et al (26) prepararam e caracterizaram emulsões O/A com colagénio hidrolisado (1%) e diferentes concentrações de óleos vegetais e manteigas, cafeína, extrato de folha de hera e óleo essencial de pimenta rosa. Um dos objetivos deste estudo era avaliar o potencial anti-celulítico destas preparações. Todas as emulsões que eles obtiveram demonstraram ser estáveis, o pH correspondia ao pH natural da pele e apresentaram propriedades reológicas adequadas, tornando estas emulsões apropriadas para serem aplicadas na pele e poderem ser usadas para combater a celulite.

Com o intuito de avaliar se o colagénio poderá ser usado para acelerar a proliferação de fibroblastos, Udhayakumar et al (27) desenvolveram cremes com colagénio e Quitosano, 0,3% de goma xantana, 2% de glicerol e 16% de lanolina. Após vários ensaios *in vitro* e *in vivo* chegaram à conclusão de que o creme possuía um bom comportamento reológico, boa espalhabilidade e estabilidade, e promovia a re-epitelização, deposição de colagénio e contração da ferida quando aplicado em feridas de espessura total e excisão aberta.

O elevado potencial do colagénio como biomaterial tem levado a um aumento da sua investigação e da sua utilização na indústria cosmética e farmacêutica. Na **Figura 4**, é possível observar o crescimento do número de artigos sobre colagénio publicados durante o século 21, passando de 5273 artigos em 2000 para 12707 artigos em 2021 (os dados

utilizados foram obtidos a partir de uma pesquisa na *ISI Web of Knowledge™* utilizando o termo “collagen”).

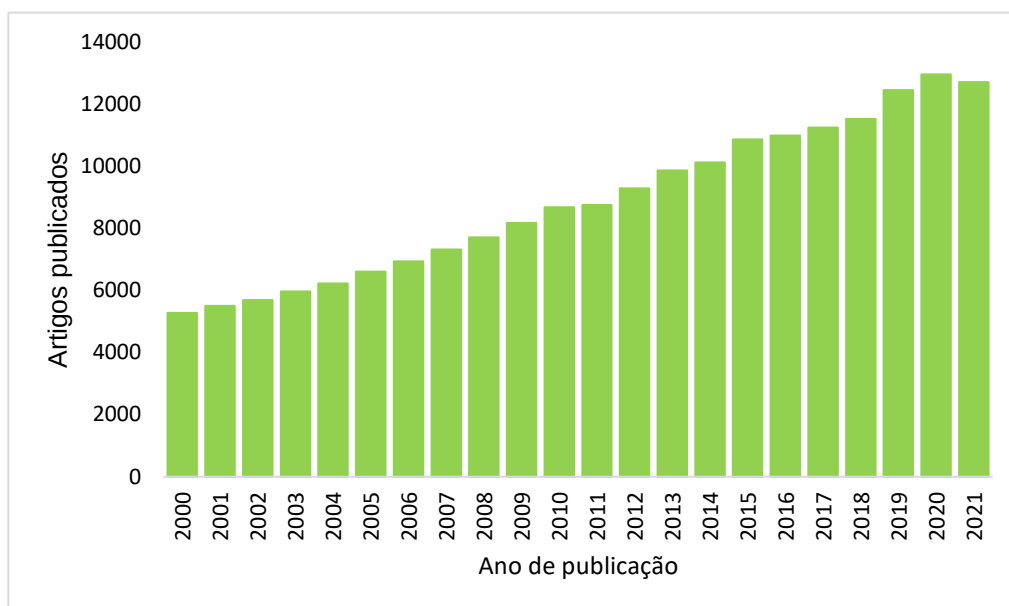


Figura 4- Artigos sobre colágeno publicados ao longo dos últimos 21 anos (século 21). Os dados foram recolhidos através de uma pesquisa na *ISI Web of Knowledge™* utilizando o termo “collagen”.

O colágeno pode ser obtido através de fontes animais, como bovinos e suínos, seres humanos ou organismos marinhos, como peixes, esponjas e medusas (28-32). Este tipo de proteínas também pode ser obtido através de fontes sintéticas. O’Leary *et al* (33) desenvolveram um colágeno sintético, comercialmente conhecido como KOD, cuja sequência peptídica é (Pro-Lys-Gly)₄(Pro-Hyp-Gly)₄(Asp-Hyp-Gly)₄. Esta proteína sintética é composta por 36 aa e é capaz de se auto-organizar em nanofibras com tripla hélice e hidrogéis, tendo sido descoberto para evitar problemas imunológicos. Outra fonte sintética de colágeno tem sido desenvolvida através de tecnologia recombinante, a fim de produzir colágeno sem contaminantes, com elevada qualidade e derivado de animais (31). Algumas vantagens e desvantagens das diferentes fontes de colágeno encontram-se descritas na **Tabela 1**.

Tabela 1- Algumas vantagens e desvantagens das diferentes fontes de colagénios. Adaptado de (31, 34, 35)

FONTE	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Fontes Naturais		
Animais Terrestres	Biocompatibilidade	Após uso prolongado, podem tornar-se alergénicos
	Baixo custo	
	Facilidade de acesso	Existe variabilidade entre lotes Possível transfeção de doenças
Animais Marinhos	Não há risco de transmissão de doenças	A extração do colagénio é complexa, demorada e cara
	Considerado como GRAS* pela FDA**	O rendimento obtido é mais baixo do que outras fontes
	Matéria-prima barata	
	Metabolicamente compatível	
	Baixa resposta inflamatória	
	Maior absorção devido a baixo peso molecular	
Fontes Sintéticas		
Tecnologia Recombinante	Não causa inflamação	Elevado custo
	Possibilidade de obtenção de tipos de colagénios menos comuns	Baixo rendimento
		Falta de cofatores e enzimas no sistema dificulta a formação estável de colagénios biofuncionais e bioativos
GRAS* - Generally recognized as safe		
FDA** - Food and Drug Administration		

O colagénio também pode ser utilizado na sua forma hidrolisada, que consiste em pequenos péptidos com baixo peso molecular (0,3 a 8 kDa) produzidos através do colagénio nativo presente nos ossos, pele e tecido conectivo de vários animais (por exemplo, bovinos, porcos e peixes) ou pode ser obtido industrialmente, através de gelatina. Devido ao seu baixo peso molecular, o colagénio hidrolisado é facilmente digerido, absorvido e distribuído no corpo humano (36, 37). Quando é administrado oralmente, o

colagénio hidrolisado, sob a forma de péptidos de colagénio ou aa livres, é absorvido para a corrente sanguínea e distribuído pelo corpo humano, principalmente pela derme, onde permanece até 14 dias. Na derme, esta proteína atua por um mecanismo de dupla ação: a) os aa livres servem de suporte para a formação de colagénio e fibras de elastina; b) os oligopeptídeos de colagénio estimulam a produção de novo colagénio, elastina e ácido hialurónico (38).

1.3. Regeneração da Pele

Os ferimentos cutâneos representam um grande problema de saúde devido a um número crescente de condições fisiopatológicas e traumas (39). De acordo com a *US Wound Healing Society*, uma ferida pode ser descrita como o resultado de uma perturbação da função e estrutura anatômica normal da pele, resultante de danos físicos ou térmicos ou como consequência da presença de uma condição médica ou fisiológica (40, 41). Tendo em conta a duração do processo de reparação, uma ferida pode ser classificada como aguda ou crónica.

As feridas agudas são caracterizadas pela sua capacidade de cicatrizar completamente, com a mínima formação de cicatrizes, dentro do período previsto, normalmente de 8 a 12 semanas. Estes tipos de feridas resultam de ferimentos mecânicos, devido a fatores externos, como abrasões e rasgões, ou ferimentos perfurantes e procedimentos cirúrgicos. Neste tipo de feridas também estão incluídos os ferimentos químicos e queimaduras, que resultam da exposição à radiação, eletricidade, produtos químicos corrosivos e fontes térmicas (40).

As feridas crónicas, contrariamente às feridas agudas, não cicatrizam ao fim de 12 semanas e podem ocorrer novamente. Estas feridas são incapazes de cicatrizar devido a danos frequentes nos tecidos ou condições fisiológicas inerentes, tais como diabetes e doenças malignas, tratamento primário inadequado, infeções persistentes e outros fatores relacionados com o paciente (40).

As feridas também podem ser classificadas consoante o número de camadas e área da pele afetadas. Se o ferimento atingir apenas a superfície da epiderme, estamos perante uma ferida superficial, enquanto se o ferimento abranger tanto a epiderme como as camadas mais profundas da derme, incluindo os vasos sanguíneos, glândulas sudoríparas e folículos pilosos, denomina-se ferida de espessura parcial. Por último, feridas de espessura total atingem tecidos mais profundos e a hipoderme (40, 42, 43).

A cicatrização é, portanto, um processo importante, porém complicado, que se divide em 4 fases sequenciais e sobreponíveis (**Figura 5**). As fases da cicatrização são a hemostasia, a inflamação, a proliferação e a maturação/remodelação (44). Qualquer interrupção durante o processo de cicatrização pode resultar em cicatrização anormal, feridas crônicas e eventuais cicatrizes (45).

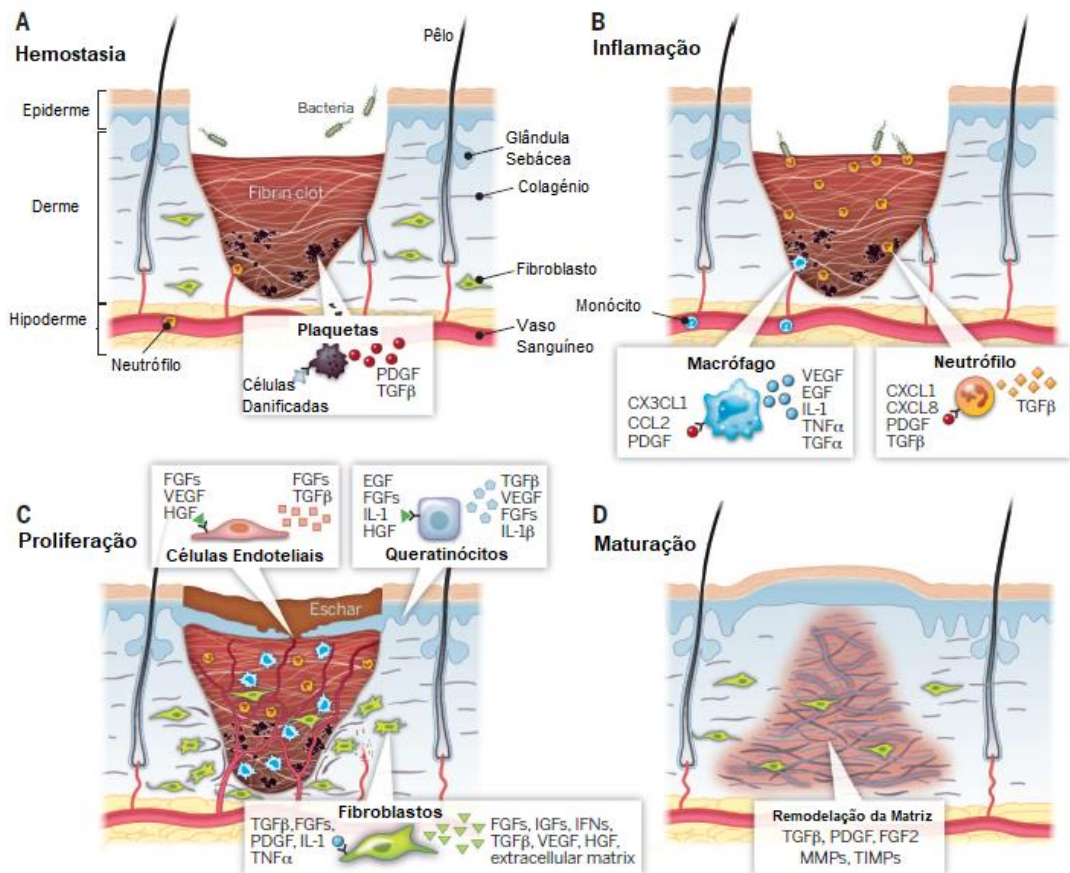


Figura 5- As diferentes fases da cicatrização. **(A)** Hemostasia; **(B)** Inflamação; **(C)** Proliferação; **(D)** Maturação/Remodelação. Cada fase da cicatrização é caracterizada por eventos celulares e moleculares importantes, que são coordenados por vários fatores reconhecidos e libertados pelas células envolvidas na resposta a um ferimento. Alguns desses fatores estão representados nesta imagem. PDGF- Fator de crescimento derivado de plaquetas; TGF- Fator de transformação do crescimento; FGFs- Fator de crescimento de fibroblastos; IL-1- Interleucina-1; TNF-Fator de necrose tumoral; IGF- Fator de crescimento semelhante à insulina; IFN- Interferão; VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular; HGF- Fator de crescimento de hepatócitos; MMPs- Metaloproteinases da matriz; TIMPs- Inibidores teciduais de metaloproteinases. Adaptado de (53)

1.3.1. Hemostasia

A hemostasia é a primeira fase da cicatrização, que ocorre alguns segundos após a lesão. Inicia-se com uma hemorragia que permitirá expulsar bactérias e/ou antígenos do local da ferida (40). De seguida, verifica-se uma agregação de plaquetas que irão participar

na formação do coágulo e irão induzir a libertação de várias citocinas, hormonas e quimiocinas (46-48). Ao mesmo tempo, ocorre vasoconstricção dos vasos sanguíneos afetados, de modo a reduzir a perda excessiva de sangue, seguida de vasodilatação de outros vasos sanguíneos mais pequenos que irão permitir o afluxo de leucócitos, glóbulos vermelhos e proteínas plasmáticas (48-50). Por fim, as plaquetas interagem com recetores do colagénio para formar o coágulo inicial e atraem células inflamatórias (como neutrófilos, macrófagos e leucócitos) que iniciarão o processo de inflamação (48, 50).

1.3.2. Inflamação

A inflamação ocorre quase em simultâneo com a hemostasia (40) e pode ser dividida em 2 fases distintas. A primeira fase corresponde ao recrutamento de neutrófilos e a segunda fase envolve o aparecimento e transformação dos monócitos (50). Os neutrófilos estão presentes no local da ferida durante 2 a 5 dias e removem micróbios invasores e tecido necrótico, devido à sua capacidade fagocítica e de secreção de proteases (40, 50, 51). Os monócitos aparecem 24 horas depois do ferimento ter ocorrido e transformam-se em macrófagos, de maneira a poderem eliminar microrganismos, removem restos de tecidos, destroem os neutrófilos restantes e podem ativar a próxima fase da cicatrização, estimulando a angiogénese e a granulação tecidual (52-54).

1.3.3. Proliferação

Na fase proliferativa inicia-se a re-epitelização, na qual ocorre proliferação e influxo de queratinócitos dos limites da ferida, protegendo o local da infeção e dessecação. Durante esta fase há movimentação de fibroblastos para o local do ferimento, os quais irão participar na formação da matriz extracelular, através da produção de colagénio, glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Para além disso, os fibroblastos também estão envolvidos na formação do tecido de granulação, do qual também fará parte novos vasos sanguíneos e colagénio do tipo III. Alguns fibroblastos diferenciam-se em miofibroblastos, cuja função é juntar as bordas da ferida aberta. Por fim, ocorre também a formação de novos vasos sanguíneos, processo denominado por angiogénese. Esta fase pode prolongar-se durante várias semanas (40, 48, 50, 51, 53, 54).

1.3.4. Maturação/Remodelação

A última fase da cicatrização é denominada maturação ou remodelação. Esta fase pode durar vários anos até estar concluída. Primeiramente, a maior parte das células endoteliais, macrófagos e miofibroblastos sofrem apoptose ou abandonam o local da ferida. Enquanto a ferida sofre maturação, alguns componentes da matriz sofrem alterações, nomeadamente o colagénio tipo III formado na fase proliferativa é agora alterado para colagénio tipo I, aumentando a resistência à tração. Passado algum tempo, os miofibroblastos restantes irão promover a contração da ferida e, finalmente, a angiogénese e o fluxo sanguíneo diminuem e a atividade metabólica abrandam ou para completamente (40, 47, 48, 53, 54).

1.4. Preparações semissólidas para aplicação cutânea

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9 (55), as preparações semissólidas cutâneas são formuladas com o intuito de promoverem a libertação local ou transdérmica das substâncias ativas (s.a.), sendo também utilizadas devido à sua ação emoliente ou protetora. Estas preparações apresentam aspeto homogéneo e são constituídas por um excipiente, simples ou composto, no qual são dissolvidos ou dispersos um ou vários fármacos.

Os excipientes utilizados podem ser obtidos de fonte natural ou sintética e podem ser monofásicos ou multifásicos. Dependendo da natureza do excipiente, a preparação pode ter propriedades hidrófobas ou hidrófilas. A preparação pode ainda ser constituída por outros excipientes apropriados, tais como agentes antimicrobianos, estabilizantes, emulsificantes, antioxidantes, espessantes e promotores de absorção.

A administração cutânea é uma via utilizada quando se pretende obter uma ação tópica, mais ou menos profunda, e apenas em casos muito particulares se recorre a esta via para se obter uma absorção sistémica da substância ativa (56).

Podem distinguir-se diferentes tipos de preparações semissólidas cutâneas:

- Pomadas,
- **Crems,**
- **Geles,**
- Pastas,
- Cataplasmas,

- Emplastros Medicamentosos.

Consoante a sua estrutura, as pomadas, os cremes e os geles apresentam geralmente um comportamento viscoelástico e as propriedades dos fluidos não newtonianos, por exemplo, de tipo plástico, pseudoplástico ou tixotrópico (55). Os cremes e os geles são os sistemas semissólidos mais utilizados como produtos cosméticos, devido às suas características, como viscosidade, textura e compatibilidade com os tecidos cutâneos.

1.4.1. Cremes

Os cremes são emulsões semissólidas que contêm substâncias medicamentosas dissolvidas ou suspensas nas suas fases aquosa ou oleosa (56). As emulsões são, atualmente, um dos veículos mais utilizados na elaboração de produtos cosméticos, uma vez que são bastante compatíveis com a pele e têm um custo relativamente baixo (57).

As emulsões simples são sistemas heterogêneos compostos por duas fases, sendo uma designada como interna, dispersa ou descontínua e a outra como externa, dispersante ou contínua. Ainda existe um terceiro componente designado agente emulsivo, o qual tornará a emulsão mais estável. Considerando a hidrofília ou lipofília da fase externa, estes sistemas podem ser classificados como hidrófilos (óleo em água (O/A)) ou lipófilos (água em óleo (A/O)). As emulsões múltiplas são sistemas heterogêneos mais complexos, nos quais ambos os tipos de emulsões simples coexistem simultaneamente, na presença de dois agentes emulsivos, um hidrófilo e outro lipófilo. As emulsões múltiplas podem ser do tipo A/O/A ou O/A/O (56, 58). Na **Tabela 2** estão representadas algumas vantagens e desvantagens das emulsões múltiplas.

Tabela 2- Vantagens e Desvantagens das emulsões múltiplas como veículos utilizados na administração tópica de fármacos. Adaptado de (59-61)

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Excelente capacidade de libertação controlada da s.a.	Instabilidade intrínseca
Notável biocompatibilidade	Estrutura complexa
Totalmente biodegradável e baixa produção de compostos tóxicos derivados da degradação do veículo	Formulação complexa
Diminuição de resposta imune indesejada à s.a. encapsulada	Predispostas a várias vias de degradação física
Capacidade de incorporar tanto s.a. hidrófilas como hidrófobas	
Proteção do composto veiculado da degradação ou inativação provocada por fatores endógenos	
Possibilidade de direcionamento de fármacos	
Podem ser utilizadas para disfarçar características organoléticas dos fármacos	

1.4.2. Geles

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9 (55), os geles são constituídos por líquidos gelificados com agentes gelificantes apropriados, que formam uma rede tridimensional (56). Os geles lipófilos (oleogeles) são preparações cujo excipiente é geralmente constituído por parafina líquida adicionada de compostos polietilénicos, ou óleos gordos gelificados pela sílica coloidal ou sabões de alumínio ou de zinco. Os geles hidrófilos (hidrogeles) são preparações cujos excipientes são habitualmente a água, a glicerina e o propilenoglicol gelificados com agentes gelificantes apropriados, como o amido, os derivados da celulose, os carbómeros ou os silicatos de magnésio-alumínio (55).

Os hidrogeles correspondem a redes tridimensionais de polímeros hidrófilos (62). Este tipo de geles têm vindo a ser bastante utilizados como veículo para diferentes fármacos devido à facilidade de fabrico e de aplicação (22). Os hidrogeles têm a capacidade de reter diferentes percentagens de água, mas eles próprios são insolúveis. Por este motivo, mantêm-se à superfície da ferida e não se dissolvem. Estes geles estão indicados para o tratamento de feridas com pouca produção de exsudado e o seu uso é contraindicado em

feridas infectadas e em úlceras de origem arterial (62). Na **Tabela 3** estão representadas algumas vantagens e desvantagens dos hidrogeles.

Tabela 3- Vantagens e desvantagens dos hidrogeles como veículos utilizados na administração tópica de fármacos. Adaptado de (63)

VANTAGENS	DESVANTAGENS
Baixo potencial de toxicidade	Baixa resistência mecânica
Biocompatibilidade e elevada quantidade de água, permitem imitar propriedades naturais dos tecidos	Alguns hidrogeles não são biodegradáveis
Boa capacidade de hidratação	Incompatibilidade com alguns fármacos
Proteção dos fármacos contra condições ambientais severas	

1.5. Objetivos

Este trabalho teve os seguintes objetivos:

- Desenvolvimento de preparações cutâneas, nomeadamente cremes e geles, contendo colagénio para serem utilizadas na regeneração da pele.
- Caracterização físico-química e posterior comparação das formulações desenvolvidas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Matérias-primas e Equipamento

2.1.1. Matérias-primas

As matérias-primas utilizadas durante a realização deste trabalho experimental estão presentes na **Tabela 4**.

Tabela 4- Lista de matérias-primas utilizadas no trabalho experimental.

MATÉRIA-PRIMA	LOTE	ORIGEM
COLAGÊNIO NATIVO (SOLUÇÃO)	101429 D-5	Acofarma
COLAGÊNIO HIDROLISADO (PÓ)	R2111494	FARMALABOR
AGENTE GELIFICANTE PFC®	8754000017	Guinama
BASE PFC® O/W	9127700011	Guinama
TRIETANOLAMINA	L20060137-OF-241716	Fagron
KATHON® CG	0065778	Guinama
SPAN® 80	131982	Acofarma
VASELINA SÓLIDA	181337-P-1	Acofarma
ÁGUA PURIFICADA	-	Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

2.1.2. Equipamento

Os equipamentos utilizados durante a realização deste trabalho experimental estão presentes na **Tabela 5**.

Tabela 5- Lista de equipamentos utilizados no trabalho experimental.

EQUIPAMENTO	FABRICANTE	MODELO	ORIGEM
BALANÇA ANALÍTICA	Mettler Toledo	ME104	Suíça
BALANÇA SEMI-ANALÍTICA	Adventurer™ Ohaus®	ARC120	China
PLACA DE AGITAÇÃO MAGNÉTICA	Stuart Scientific	Magnetic Stirrer Hotplate SM26	Reino Unido
PLACA DE AGITAÇÃO MAGNÉTICA	Heidolph	MR Hei-Tec	Alemanha
PLACA DE AGITAÇÃO MAGNÉTICA	IKA	C-MAG HS 7	Alemanha
AGITADOR MECÂNICO	Gako	Gako Unguator Basic	Alemanha
POTENCIÓMETRO	Hanna Instruments	HI 2211 pH/ORP Meter	Roménia
POTENCIÓMETRO	Crison®	Basic 20	Espanha
CENTRÍFUGA	Eppendorf	5804	Alemanha
VISCOSÍMETRO	Thermo Haake	ViscoTester 550	Alemanha
TEXTURÓMETRO	Stable Micro Systems	TA-XT2i	Reino Unido
COLORÍMETRO	Konica Minolta Sensing, Inc.	Chroma Meter Cr-400	Japão
BANHO DE ÁGUA	AuxiLab S. L.	Banho de água Nahita	Espanha
ESTUFA	Memmert	-	Alemanha
APARELHO DE DISSOLUÇÃO	Sotax AG	AT7	Suíça
ESPECTROFOTÓMETRO	Jasco	V-650	Japão
BOMBA DE VÁCUO	Vacuubrand®	ME 1C	Alemanha

2.2. Métodos

2.2.1. Preparação dos cremes O/A e A/O/A e do gele hidrófilo

Este trabalho foi dividido em 3 fases. Numa fase inicial foram preparados cremes simples O/A, cujas fórmulas se encontram descritas na **Tabela 6**, fundindo a base PFC® em banho de água a 70°C, enquanto se aquecia a água com o Kathon® CG à mesma temperatura. De seguida, adicionou-se a fase aquosa à fase oleosa, agitando continuamente, posteriormente retirou-se a cápsula do aquecimento, continuando a agitar manualmente até completo arrefecimento. Por fim, adicionou-se 5% (m/m) de colagénio e agitou-se até aspeto homogéneo, tendo esta formulação sido designada de C1. Foi também preparado, nas mesmas condições, um creme base sem colagénio. Os cremes foram acondicionados num recipiente de plástico. O colagénio utilizado na fase inicial do trabalho encontrava-se na forma de solução.

Na fórmula C2 foi adicionado 1,24% (m/m) de trietanolamina (TEA) para ajustar o pH, uma vez que a fórmula C1 apresentou um baixo valor de pH (os resultados encontram-se na secção **2.3.3.**). Na fórmula C3 a quantidade de TEA foi reduzida para 0,6% (m/m). Posteriormente, à formulação C3 foi adicionado 0,2% (m/m) de gelificante PFC® na tentativa de melhorar a respetiva consistência, tendo esta formulação sido designada como C3_1.

Tabela 6- Composição dos cremes O/A contendo colagénio.

	MATÉRIA-PRIMA	QUANTIDADE (%)
	C1	
FASE OLEOSA	Base PFC®	20,0
FASE AQUOSA	Kathon® CG	0,2
	Colagénio	5,0
	Água Purificada	q.b.p. 100,0
	C2	
FASE OLEOSA	Base PFC®	20,0
FASE AQUOSA	Kathon® CG	0,2
	Colagénio	5,0
	TEA	1,24
	Água Purificada	q.b.p. 100,0
	C3	
FASE OLEOSA	Base PFC®	20,0
FASE AQUOSA	Kathon® CG	0,2
	Colagénio	5,0
	TEA	0,6
	Água Purificada	q.b.p. 100,0

O gele hidrófilo, cuja fórmula está descrita na **Tabela 7**, foi preparado por dispersão do gelificante PFC® na água, onde previamente foi dissolvido o colagénio e o Kathon® CG, à temperatura ambiente. De seguida, foi adicionada, agitando continuamente, a TEA gota a gota até pH neutro. Por fim, acondicionou-se o gele num recipiente de plástico. É importante mencionar que inicialmente foi adicionado 0,5% (m/m) de gelificante PFC®, no entanto, verificou-se que não ocorreu gelificação, nem após a adição de TEA nem ao fim de 48h de repouso, por isso, decidiu-se aumentar a quantidade de gelificante PFC® para 1% (m/m).

Tabela 7- Composição do gele hidrófilo contendo colagénio.

MATÉRIA-PRIMA	FUNÇÃO	QUANTIDADE (%)
G1		
COLAGÉNIO	Ingrediente Ativo	5,0
GELIFICANTE PFC®	Agente Gelificante	1,0
KATHON® CG	Conservante	0,2
TEA	Agente Neutralizante	q.b.p. pH 7,0
ÁGUA PURIFICADA	Solvente/dispersante	q.b.p. 100%

Numa segunda fase, foram preparados cremes A/O/A através do método da dupla emulsificação. Inicialmente procedeu-se à fusão da base PFC® juntamente com o SPAN® 80 em banho de água a 50°C. Ao mesmo tempo, aqueceu-se uma parte da água com o colagénio à mesma temperatura. A fase aquosa foi adicionada à fase oleosa, agitando continuamente. Entretanto, a fase aquosa externa, na qual estava presente o Kathon® CG e a TEA, foi também colocada em banho de água a 50°C. Por fim, adicionou-se esta fase aquosa externa à emulsão simples A/O formada previamente, agitando manualmente até completo arrefecimento. O creme preparado foi acondicionado num recipiente de plástico. A fórmula do creme A/O/A está representada na **Tabela 8**. O colagénio utilizado encontrava-se sob a forma de solução. Neste caso, também foi adicionado 0,2% e 0,5% (m/m) de gelificante PFC® à fórmula C4 para tentar obter preparações com uma melhor consistência, sendo referidas ao longo do trabalho como fórmulas C4_1 e C4_2, respetivamente.

Tabela 8- Composição do creme A/O/A contendo colagénio.

	MATÉRIA-PRIMA	FUNÇÃO	QUANTIDADE (%)
	C4		
FASE AQUOSA	Colagénio	Ingrediente Ativo	5,0
	Água Purificada	Solvente/Fase interna	12,5
FASE OLEOSA	Base PFC®	Fase Oleosa e Agente Emulsivo O/A	20,0
	SPAN® 80	Agente Emulsivo A/O	2,5
FASE AQUOSA EXTERNA	Kathon® CG	Conservante	0,2
	TEA	Agente Neutralizante	0,6
	Água Purificada	Fase externa	q.b.p. 100,0

Numa fase posterior, foram preparados 2 cremes A/O/A semelhantes à formulação C4_2, no entanto, um foi preparado sem a adição de colagénio (C5_1B) e o outro foi preparado com colagénio hidrolisado em pó (C5_1). A formulação C5_1 foi ainda homogeneizada no agitador mecânico Unguator, pois após a dispersão do gelificante no creme verificou-se a presença de uns grumos e, portanto, foi necessário misturar o creme durante 2 minutos a 1200 rpm.

2.2.2. Caracterização das formulações

2.2.2.1. Análise Organolética

A análise das características organoléticas permite ao consumidor obter uma noção inicial da qualidade da preparação. Se a preparação tiver características organoléticas favoráveis, isso pode levar, por parte do consumidor, a uma maior adesão ao tratamento ou à escolha de um determinado produto cosmético em detrimento de outro (64). Qualquer indivíduo, após aplicação de uma formulação semissólida na pele, irá submetê-la, involuntariamente, a uma análise visual, olfativa e tátil (65).

Apesar de ser uma análise bastante simples, quaisquer problemas detetados na homogeneidade e/ou no aspeto da preparação são indicativos imediatos, acessíveis e quase sempre seguros de problemas que podem ter ocorrido durante o processo de produção das formulações ou problemas nas matérias-primas utilizadas (66). Assim, é importante avaliar as características organoléticas das formulações ao longo do tempo para assegurar que não sofreram alterações que possam afetar a estabilidade e a qualidade da preparação final (64).

Esta avaliação foi realizada imediatamente após a preparação dos cremes e do gele G1, sendo que no caso dos cremes C5_1 e C5_1B a mesma análise foi também realizada ao fim de 15 semanas de armazenamento à temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

2.2.2.2. Análise da Cor

A cor é um fenómeno de percepção visual, possibilitado pelo facto de a luz ser refletida ou refratada da superfície de objetos. Tendo em conta que este parâmetro pode ser interpretado de maneira diferente por cada pessoa, foram estabelecidos padrões que eliminam estas variações e diferentes interpretações (67).

Uma vez que o propósito deste método espectrofotométrico é definir as características cromáticas das preparações semissólidas, foram analisados dois parâmetros: a luminosidade e o parâmetro Chroma. Para tal foi utilizada uma escala definida pela representação Cartesiana de 3 eixos ortogonais: L^* , representa a luminosidade ($L^* = 0$ – preto; $L^* = 100$ – branco); a^* , representa uma escala cromática entre o verde e o vermelho ($a^* < 0$ – verde; $a^* > 0$ – vermelho); b^* , representa uma escala cromática entre o azul e o amarelo ($b^* < 0$ – azul; $b^* > 0$ – amarelo) (**Figura 6**) (68, 69) .

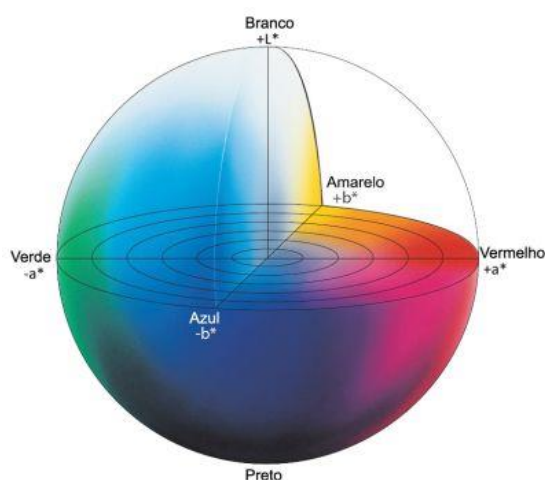


Figura 6- Representação do espaço cromático $L^*a^*b^*$. Adaptado de (69)

O parâmetro Chroma, C^* , que representa a intensidade da cor é calculado através da equação 1 (68).

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})} \quad \text{Equação 1}$$

A determinação da cor das amostras C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas e das amostras C5_1 e C5_1B foi realizada ao longo de 15 semanas com o auxílio do colorímetro *Konica Minolta Chroma Meter 400* (Japão) (**Figura 7**) e do *software SpectraMagic NX*. Duas amostras de cada formulação foram colocadas numa placa de Petri, sendo a cor lida duas vezes, perfazendo um total de quatro medições para cada preparação (C5_1 e C5_1B).



Figura 7- Colorímetro Konica Minolta Chroma Meter 400 (Japão).

2.2.2.3. Avaliação do pH

A determinação do pH das preparações para aplicação cutânea é bastante importante, uma vez que estas deverão apresentar um valor compatível com a zona do corpo onde serão aplicadas (65). O pH cutâneo pode oscilar entre 5,5-7 e é estabelecido por um sistema tampão de ácido láctico/lactato, pelos ácidos gordos das glândulas sebáceas, pelos elementos ácidos da queratina e pelos ácidos dicarboxílicos do suor (56). O pH da pele poderá variar ligeiramente devido à influência de fatores endógenos, como a idade, o sexo, o local anatómico e a predisposição genética, ou fatores exógenos, como produtos cosméticos ou tópicos (70-72).

As alterações nos valores de pH durante o processo de cicatrização têm sido descritas na literatura. Consoante a progressão da cicatrização, o pH começa a diminuir de alcalino para neutro ou até ácido. Na literatura tem sido descrito que um ambiente mais ácido tem vários benefícios para o processo de cicatrização, induzindo a uma maior proliferação de fibroblastos, promovendo a re-epitelização e a angiogénese e controla a colonização de bactérias (73). Na literatura está comprovado que a estabilidade do colagénio diminui em ambientes muito ácido ou muito básicos (74). Portanto, neste caso, é necessário assegurar que o pH das preparações desenvolvidas neste trabalho se encontra dentro do intervalo de valores adequados para a pele.

O pH das formulações foi medido, em triplicado, com o auxílio do potenciómetro *Hanna Instruments 2211* (**Figura 8**). O pH das formulações provisórias C1, C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1 foi analisado 1 semana após a preparação e o das formulações C5_1 e

C5_1B ao fim de 1 e 15 semanas de armazenamento para avaliar a estabilidade destes cremes.



Figura 8- Potenciômetro *Hanna Instruments 2211* (Roménia).

2.2.2.4. Ensaio de Estabilidade Acelerada por Centrifugação

A estabilidade de uma preparação é estabelecida pela sua capacidade de resistir a alterações químicas e/ou físicas (75). As formulações desenvolvidas para aplicação tópica poderão apresentar problemas específicos de estabilidade, devido a vários fatores como a composição da formulação, a viscosidade, as condições ambientais, entre outros (76). Assim, é necessário realizar ensaios de estabilidade adaptados ao tipo de amostra que estamos a analisar, de modo a detetar quaisquer alterações nas características da preparação (75, 77).

Neste trabalho recorreu-se ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação, no qual é aplicada uma força gravítica extrema sobre o produto. A centrifugação irá gerar stress na amostra, simulando um aumento da força de gravidade e consequente aumento da movimentação das partículas, tornando possível antecipar problemas de instabilidade da amostra em estudo. Esta instabilidade pode manifestar-se sob a forma de precipitação, formação de sedimento compacto (*caking*), separação de fases, coalescência, entre outros (77).

Neste ensaio, as formulações foram submetidas a dois ciclos de centrifugação de 30 minutos a 3000 rpm e, para o efeito, foi utilizada a Centrífuga *Eppendorf* 5804 (**Figura 9**). No fim as amostras foram submetidas a uma avaliação visual para verificar se existiam problemas de instabilidade. O ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação foi efetuado após terem sido preparadas as formulações.



Figura 9- Centrífuga *Eppendorf* 5804 (Alemanha).

2.2.2.5. Teste de Oclusão

Existem vários fatores que contribuem para o estado de hidratação do estrato córneo, como a quantidade de água presente nesta camada, a velocidade de evaporação, a queratinização, o transporte de água das camadas inferiores e a composição e quantidade das preparações dermofarmacêuticas e cosméticas que são aplicadas na pele. Assim, para evitar a desidratação, a integridade da barreira cutânea deverá ser mantida através de diferentes mecanismos de hidratação, tais como a humectação, a hidratação ativa e a oclusão (78).

O mecanismo de oclusão consiste na utilização de substâncias emolientes e hidrófobas que, ao formarem uma película protetora sobre a pele irão impedir a perda de água por evaporação (79). De modo a avaliar o efeito oclusivo e, indiretamente, o poder hidratante e emoliente das preparações desenvolvidas neste trabalho foi efetuado o teste de oclusão. Pesaram-se cerca de 5g de água purificada em gobelés de 50 ml que foram convenientemente tapados com papel de filtro. De seguida, foi espalhado 1g das preparações em estudo no papel de filtro. Os gobelés foram depois colocados na estufa a 40°C durante 48h, sendo pesados após arrefecimento depois de serem retirados da estufa. A percentagem de perda de água por evaporação nos gobelés após o período de 48h na

estufa foi calculada. O mesmo procedimento foi adotado para avaliação do poder oclusivo da vaselina, que é considerada o excipiente oclusivo de referência.

2.2.2.6. Ensaio Reológico

A *Reologia* corresponde ao capítulo da Física que estuda as condições de fluidez e de deformação da matéria, as quais dependem de vários fatores (56). A avaliação das características reológicas das formulações semissólidas é bastante importante, pois irá permitir estudar parâmetros importantes relativos à aceitabilidade das mesmas, tais como a estabilidade e a qualidade (66).

A viscosidade de uma preparação traduz a sua resistência ao escoamento ou fluxo. Assim, quanto maior a viscosidade, menor a velocidade com que o fluido se movimenta. A viscosidade pode ser determinada, segundo a equação:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma} \quad \text{Equação 2}$$

em que η corresponde à viscosidade (Pa.s), τ à tensão de corte ou de cisalhamento (Pa) e γ à velocidade de corte (s^{-1}).

Os materiais podem ter um comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano. Materiais com comportamento Newtoniano apresentam viscosidade constante, a uma dada temperatura, independentemente da força aplicada. Materiais com comportamento não-Newtoniano demonstram uma alteração da viscosidade quando se altera a força aplicada.

Os materiais com comportamento não-Newtoniano podem ainda ser divididos em plásticos, pseudoplásticos (ou reofluidificantes) e dilatantes (ou reoespessantes), consoante o seu comportamento reológico perante a aplicação de uma força externa (**Figura 10**) (80).

Um material plástico necessita de uma tensão de corte mínima – tensão de cedência – para iniciar o escoamento, o que é possível observar em vários cremes. Os materiais reofluidificantes caracterizam-se pela diminuição da viscosidade aparente com o aumento da tensão de corte, a uma temperatura constante (comportamento das dispersões, emulsões e suspensões). Por fim, os materiais reoespessantes demonstram um aumento da viscosidade aparente com o aumento da tensão de corte. Este tipo de materiais fluem a baixas tensões de corte, contudo quando submetidos a tensões de corte mais elevadas

tornam-se menos fluidos (é o caso de pastas e composições com elevada concentração de pigmentos) (65).

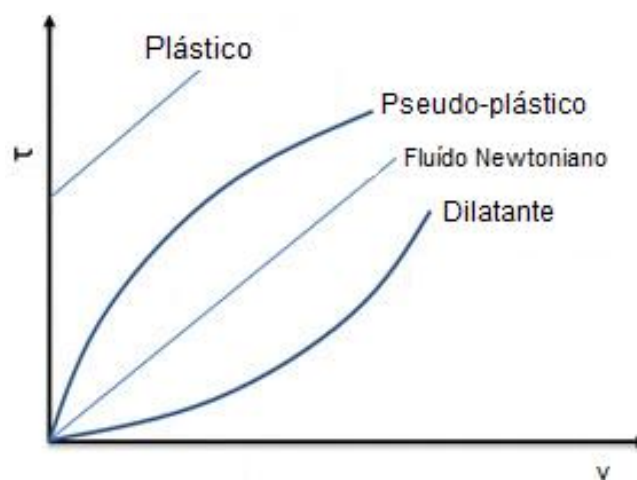


Figura 10- Representação gráfica tensão de corte (τ) em função da velocidade de corte (γ) de alguns comportamentos reológicos. Adaptado de (79)

Se considerarmos a aplicação de uma tensão de corte constante, os materiais podem ainda ser classificados pelas suas alterações reológicas ao longo do tempo. Assim, existem fluidos com tixotropia ou fluidos com reopexia (ou anti-tixotropia). Se a viscosidade aparente diminuir com o passar do tempo, para uma tensão de corte constante, então o material apresenta um comportamento tixotrópico. Contrariamente, um comportamento anti-tixotrópico caracteriza-se pelo aumento da viscosidade aparente ao longo do tempo, para uma tensão de corte constante (81, 82). Num reograma, é possível medir a tixotropia observando a área de histerese, ou seja, a área entre as curvas ascendente e descendente do reograma.

Em preparações semissólidas é importante avaliar o comportamento tixotrópico, uma vez que nos permite avaliar como será o desempenho do produto quando for aplicado na pele. Isto é, uma preparação com comportamento tixotrópico tende a ser mais estável fisicamente, uma vez que é mais consistente, logo os constituintes da preparação não se irão separar facilmente. No entanto, no momento da aplicação do produto na pele, uma vez que está a ser aplicada uma tensão, este ficará mais fluido, facilitando o processo de espalhamento. Após terminar a aplicação, a preparação recupera a sua viscosidade inicial, evitando o derrame do produto para outras áreas do corpo (65, 75).

Neste trabalho, a determinação da viscosidade foi realizada recorrendo a um viscosímetro de cilindros concêntricos Thermo Haake VT-550 (**Figura 11**). O ensaio foi realizado a duas temperaturas diferentes, $20 \pm 1^\circ\text{C}$ para simular a temperatura ambiente

de armazenamento e $32 \pm 1^\circ\text{C}$ para simular a temperatura aquando da aplicação do produto na pele (83), com leituras sistemáticas de velocidades de corte de 1 s^{-1} até 100 s^{-1} , com 10 etapas ascendentes e 10 etapas descendentes, com um tempo de estabilização da temperatura de 900 segundos. As preparações semissólidas foram analisadas ao fim de 1,5 e 15 semanas.

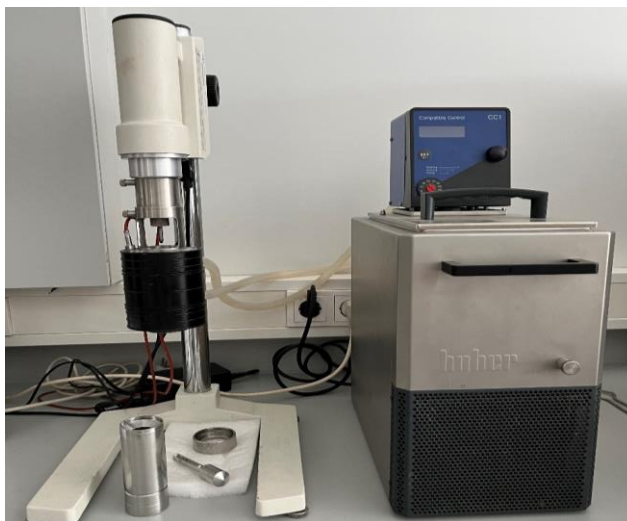


Figura 11- Viscosímetro *Thermo Haake VT-550* (Alemanha) com a respetiva sonda utilizada neste ensaio.

2.2.2.7. Análise da Textura

A textura compreende todas as características físicas que é possível percecionar pelo sentido do tato, que estão relacionadas com a deformação provocada por uma força e que podem ser medidas em termos de tempo, força e distância. Estes parâmetros são importantes para a aceitabilidade do produto final por parte do consumidor (84).

A determinação da textura pode ser feita por avaliação sensorial, recorrendo a um painel de peritos, ou por avaliação instrumental (85). A avaliação instrumental, recorrendo a um texturómetro, consiste em ensaios mecânicos que permitem avaliar a adesividade e a firmeza da preparação, sendo utilizada uma sonda que irá penetrar na amostra a uma velocidade e distância pré-definidas, regressando à posição inicial acima da superfície da amostra (75).

Num gráfico *Força versus Distância* (**Figura 12**), a força máxima corresponde à firmeza da preparação, sendo que, quanto maior for o valor da força máxima, mais consistente é a preparação. Já a adesividade pode ser determinada pelo cálculo da área negativa, uma vez que esta área corresponde à energia necessária para fazer com que a sonda regresse à posição inicial.

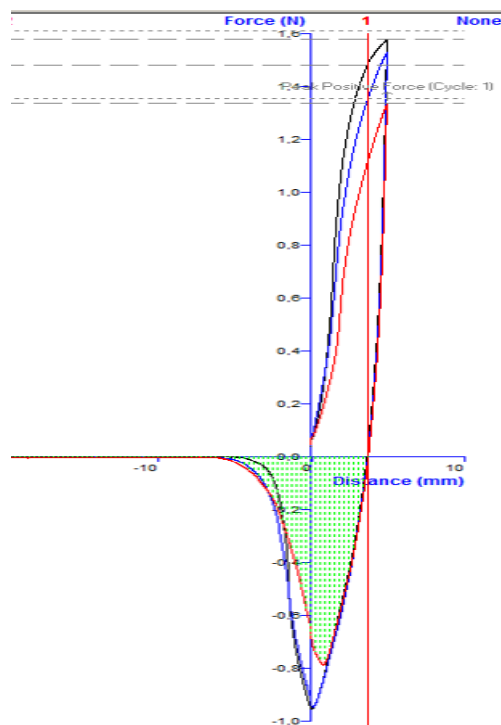


Figura 12- Gráfico da Força (N) versus Distância (mm). A Força máxima corresponde à firmeza e a área negativa (verde) corresponde à adesividade.

Neste trabalho foi utilizado o texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (**Figura 13**) e o ensaio foi realizado em modo de compressão com as seguintes condições:

- Velocidade de teste: 3 mm.s^{-1}
- Distância de penetração: 5 mm
- Célula de carga: 5 kg
- *Trigger Force*: 0,049 N
- Sonda: Sonda cilíndrica *Lap Perspex* 25 mm diâmetro

Este ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, ao fim de 1, 5 e 21 semanas, com o intuito de estudar o efeito do tempo de armazenamento na textura e estabilidade das preparações em estudo.



Figura 13- Texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (Reino Unido) com a sonda utilizada no ensaio da análise da textura.

2.2.2.8. Análise da Espalhabilidade

A espalhabilidade refere-se à extensão da área em que uma formulação semissólida se espalha quando é aplicada na pele ou noutras superfícies, determinando várias propriedades como a facilidade de aplicação, a facilidade de remoção da embalagem, a transferência da dosagem correta para o local alvo e a preferência do consumidor (86, 87).

O ensaio da espalhabilidade foi realizado utilizando o texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* com a sonda *TTC Spreadability Rig (HDP/SR)* (**Figura 14**), composta por um cone masculino e feminino. O cone feminino é preenchido com a preparação em estudo e o ensaio é executado no modo de compressão com uma velocidade de 3 mm.s^{-1} e uma distância de penetração de 23 mm. A análise foi feita em duplicado, a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ para as formulações em estudo, ao fim de 1 e 21 semanas. Através deste ensaio foi possível analisar a consistência dos cremes C5_1 e C5_1B.

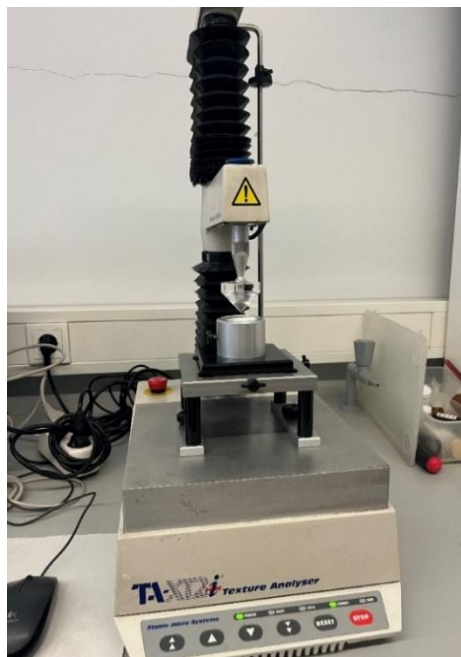


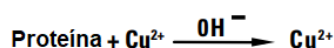
Figura 14- Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i com a sonda TTC Spreadability Rig (HDP/SR).

2.2.2.9. Quantificação do colagénio

Uma vez que o colagénio é uma proteína, foi necessário utilizar o *Thermo Scientific Pierce™ BCA Protein Assay Kit* para realizar o ensaio de doseamento do mesmo.

O ensaio da proteína BCA baseia-se no ácido bicinconínico (BCA) para a deteção colorimétrica e quantificação das proteínas totais presentes na amostra. O primeiro passo da reação é conhecido como reação de biureto, na qual a proteína reduz o cobre de Cu^{2+} para Cu^{1+} em condições alcalinas. No segundo passo, duas moléculas de BCA reagem com um ião cobre (I) formando um complexo roxo que irá absorver a 562 nm (**Figura 15**) (88, 89).

Passo nº1.



Passo nº2.

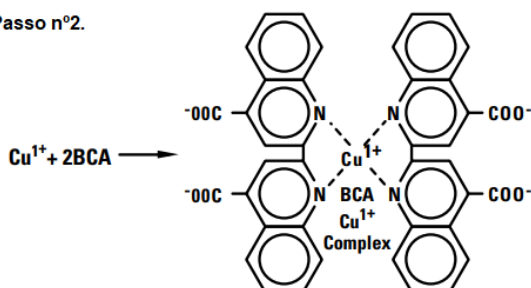


Figura 15- Representação das reações que ocorrem no ensaio da proteína BCA. Adaptado de (88)

A intensidade da cor produzida é proporcional ao número de ligações peptídicas que participam na reação. A velocidade com que a cor se forma depende da temperatura de incubação, do tipo de proteínas presentes na amostra e da quantidade de aminoácidos (aa) reativos que as proteínas contêm. Este ensaio tem a capacidade de detetar concentrações de proteínas desde 20 até 2000 µg/ml .

Para quantificar o colagénio, neste trabalho foram preparadas soluções padrão de colagénio com 6 concentrações diferentes: 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mg/ml.

Para a quantificação do colagénio presente nos cremes as amostras foram preparadas em 2 passos: duas diluições sucessivas, uma com fator de diluição 1:20 e a seguinte com fator de diluição 1:5. De seguida, utilizou-se uma bomba de vácuo e membranas de 0,45 µm para filtrar a dispersão, recolhendo-se o filtrado. Foram retirados 100 µl de filtrado para diferentes tubos e adicionados 2000 µl de reagente BCA, sendo estes colocados posteriormente num banho de água a 37°C durante 30 minutos. Após os 30 minutos, os tubos de ensaio foram retirados do banho, aguardaram-se 5 minutos e procedeu-se à leitura da Absorvância a 562 nm do branco (água e reagente) e das amostras, recorrendo ao Espectrofotómetro UV-Vis Jasco V-650 (Japão) (**Figura 16**).



Figura 16- Espectrofotômetro UV-Vis Jasco V-650 (Japão).

2.2.2.10. Ensaio de Liberação *in vitro*

O ensaio de liberação *in vitro* permite prever o comportamento da formulação em relação à liberação da substância ativa, ou seja, é possível prever se todo o composto será libertado ou não, e o tempo que demorará a ocorrer a liberação.

Este ensaio foi realizado no aparelho de dissolução Sotax AG AT7 (**Figura 17**), com pá agitadora, a $37,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e a 50 rpm. Cada vaso foi preenchido com 250 ml de água purificada, onde foram mergulhados recipientes com 5g do creme A/O/A com e sem colagénio, C5_1 e C5_1B, respetivamente. Neste ensaio foi também utilizado o creme O/A com 0,5% (m/m) de gelificante PFC[®] contendo 5% de colagénio hidrolisado (referido como fórmula C3_2), para comparação.

O ensaio foi realizado ao longo de 120 minutos, tendo sido recolhidas alíquotas de 5 ml para balões de 50 ml a cada 15, 30, 45, 60 e 120 minutos. Posteriormente, os balões foram preenchidos com água até perfazer 50 ml. De seguida, as amostras foram analisadas por espectrofotometria a 562 nm, conforme descrito na secção anterior.



Figura 17- Aparelho de dissolução Sotax AG AT7 com pás agitadoras e recipientes com as amostras.

2.2.2.11. Análise Estatística

A análise estatística dos ensaios do pH, textura e espalhabilidade foi efetuada no Microsoft® Excel, recorrendo aos testes F (comparação de variâncias), seguido do teste t-Student (bicaudal), para avaliar a significância estatística de quaisquer diferenças nos resultados obtidos nos ensaios mencionados. As amostras foram analisadas utilizando um nível de significância de 95% ($\alpha=0,05$). Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Análise Organolética

A análise das características organoléticas efetuada imediatamente após a preparação das formulações permitiu verificar que, de um modo geral, os cremes apresentaram aspeto homogéneo, cor branca opaca e ausência de odor. O creme C5_1 apresentou cor ligeiramente mais amarelada e o odor característico do colagénio hidrolisado. O gele G1 apresentou aspeto homogéneo, translúcido e inodoro. Neste trabalho, é apenas apresentado na **Figura 18** o resultado da análise organolética dos cremes C5_1 e C5_1B (Base), ao fim de 15 semanas de armazenamento uma vez que estes corresponderam às formulações finais e com as quais se prosseguiram os estudos de estabilidade. No caso

destes cremes verificou-se que as características organoléticas se mantiveram ao longo do tempo.



Figura 18- Aspeto dos cremes C5_1 (esquerda) e C5_1B (direita) ao fim de 15 semanas de armazenamento à temperatura ambiente.

2.3.2. Análise da Cor

As características cromáticas das formulações semissólidas foram determinadas conforme descrito previamente e os resultados obtidos estão representados nas tabelas seguintes, no caso das formulações provisórias (C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2), e nos gráficos das **Figuras 19 e 20**, no caso da formulação definitiva (C5_1) e da respetiva base (C5_1B). No caso do gele G1 não foi possível avaliar a cor por este ser translúcido.

Tabela 9- Luminosidade das preparações C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas. Os resultados correspondem ao valor médio de 4 medições $\pm$ desvio padrão.

FORMULAÇÃO	1 SEMANA	2 SEMANAS	3 SEMANAS	4 SEMANAS
C3	83,823 $\pm$ 1,749	84,525 $\pm$ 1,779	84,145 $\pm$ 1,955	82,478 $\pm$ 2,407
C3_1	85,570 $\pm$ 0,577	85,305 $\pm$ 0,366	83,275 $\pm$ 0,081	74,805 $\pm$ 0,872
C4	87,113 $\pm$ 0,177	87,315 $\pm$ 0,006	87,495 $\pm$ 0,029	87,495 $\pm$ 0,179
C4_1	85,968 $\pm$ 0,295	86,435 $\pm$ 0,006	85,553 $\pm$ 0,153	82,040 $\pm$ 0,069
C4_2	87,080 $\pm$ 0,508	86,485 $\pm$ 0,618	86,198 $\pm$ 0,609	85,680 $\pm$ 0,404

Como é possível verificar na **Tabela 9**, com exceção da formulação C4, todas as formulações apresentaram uma diminuição da luminosidade ao longo de 4 semanas. Nas formulações C3_1 e C4_1, com 0,2% (m/m) de gelificante PFC[®], verificou-se uma diminuição mais acentuada da luminosidade na última semana. Uma vez que os valores de luminosidade se encontram próximos de 100, é possível concluir que as formulações apresentam uma coloração próxima da cor branca.

No caso dos cremes C5_1 e C5_1B a variação da luminosidade foi avaliada durante 15 semanas. A variação da luminosidade destes cremes encontra-se representada na **Figura 19**.

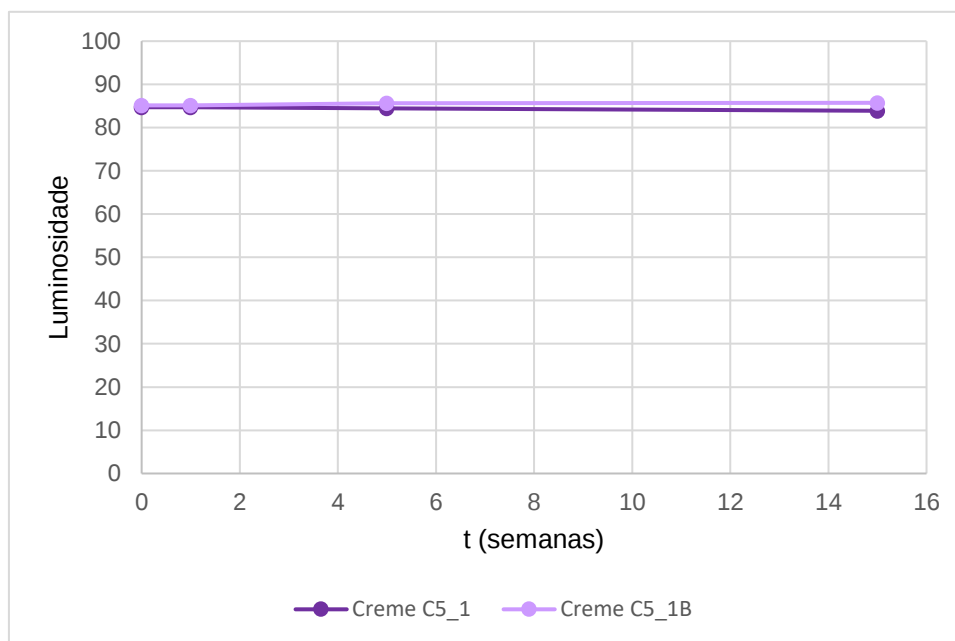


Figura 19- Representação gráfica da variação da luminosidade do creme C5_1 e C5_1B em função do tempo (semanas).

É possível concluir que as formulações são principalmente brancas, uma vez que os valores de luminosidade estão próximos de 100. É possível observar que o creme C5_1 apresenta valores de luminosidade ligeiramente inferiores aos do creme base C5_1B (sem colagénio), o que poderá ser devido ao facto de o colagénio em pó apresentar uma cor característica, com uma ligeira tonalidade amarela.

Ao fim de 15 semanas o creme C5_1 apresentou uma pequena diminuição da luminosidade, passando de $84,715 \pm 0,040$ (1 semana) para $83,895 \pm 0,040$ (15 semanas). Já o creme base exibiu um comportamento contrário, verificando-se um ligeiro aumento da luminosidade de $85,148 \pm 0,557$ (1 semana) para $85,743 \pm 0,113$ (15 semanas).

O parâmetro Chroma (C^*), descrito na **secção 2.2.2.2.**, permite avaliar a intensidade da cor das formulações semissólidas em estudo. Na **Tabela 10** estão representados os valores do parâmetro Chroma das formulações C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas.

Tabela 10- Variação do parâmetro Chroma das preparações semissólidas C3, C3_1, C4, C4_1 e C4_2 ao longo de 4 semanas.

FORMULAÇÃO	1 SEMANA	2 SEMANAS	3 SEMANAS	4 SEMANAS
C3	1,749	1,779	1,955	2,407
C3_1	1,737	1,836	2,373	3,318
C4	1,237	1,115	1,150	1,029
C4_1	1,397	1,208	1,050	1,679
C4_2	1,346	1,221	1,036	0,932

As formulações C3, C3_1 e C4_1 demonstraram um aumento do valor do parâmetro Chroma, logo a intensidade da cor das formulações aumentou, indicando que nestes cremes poderia estar a ocorrer algum processo de oxidação. Contrariamente, o parâmetro Chroma das formulações C4 e C4_2 diminuiu com o passar do tempo, logo a intensidade da cor das formulações diminuiu ao longo de 4 semanas.

Na **Figura 20** está representada a variação do parâmetro Chroma dos cremes C5_1 e C5_1B ao longo de 15 semanas. O creme C5_1 apresentou uma diminuição bastante mais acentuada do que o creme C5_1B, porque os parâmetros a^* e b^* sofreram alterações em direção à zona azul/verde.

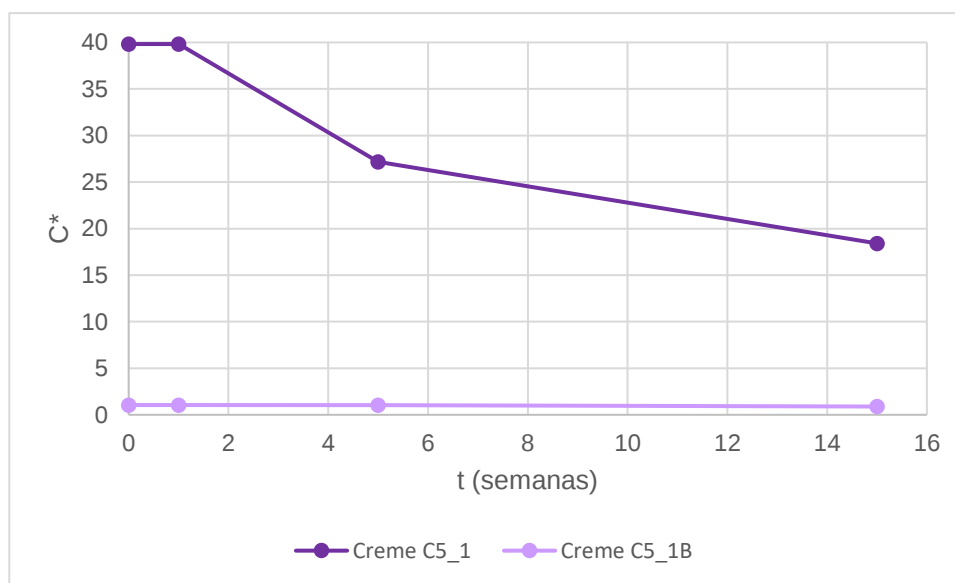


Figura 20- Representação gráfica da variação do parâmetro Chroma (C^*) relativo aos cremes C5_1 e C5_1B em função do tempo (semanas).

2.3.3. Avaliação do pH

O pH das formulações consideradas provisórias C1, C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1 foi analisado 1 semana após a preparação de cada formulação e os resultados encontram-se descritos na **Tabela 11**.

Tabela 11- Valores de pH das formulações C1, C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de 3 medições $\pm$ desvio padrão.

FORMULAÇÃO	pH
C1	4,63 $\pm$ 0,47
C2	8,07 $\pm$ 0,02
C3	7,60 $\pm$ 0,06
C3_1	7,02 $\pm$ 0,14
C4	7,58 $\pm$ 0,02
C4_1	7,13 $\pm$ 0,16
C4_2	6,31 $\pm$ 0,25
G1	5,92 $\pm$ 0,04

O creme C1 apresentou o menor valor de pH das formulações em estudo, devido ao facto de ser o único creme sem trietanolamina na sua composição. Contrariamente, o creme C2 apresentou o maior valor de pH, porque continha o dobro da trietanolamina utilizada nos cremes C3 a C4_2. O gele G1 apresentou um valor de pH de 5,92 $\pm$ 0,04 ao fim de 1 semana. Num estudo sobre o desenvolvimento de formulações de hidrogéis à base de colagénio, foi demonstrado que formulações com 1% e 3% de colagénio apresentavam valores de pH entre 4,77 e 5,60 ao fim de 7 dias de preparação, tendo os valores continuado a diminuir ao longo do tempo (90).

Outros estudos descritos na literatura relativos ao desenvolvimento de cremes e geles para aplicação cutânea de diferentes ingredientes ativos têm apresentado valores de pH próximos dos obtidos neste trabalho. Num estudo de Patel *et al* (91), foram preparados cremes O/A e geles hidroalcoólicos com 0,05% (m/v) de psoraleno para serem aplicados topicamente. Os geles apresentaram valores de pH entre 5,9 e 6,1 enquanto os valores de pH dos cremes foram 6,7-6,9. Resultados semelhantes foram obtidos por Rafiee-Tehrani *et al* (92) para geles hidroalcoólicos com 0,5% de piroxicam e cremes O/A

com 1% de piroxicam. Kamal *et al* (93) prepararam 15 formulações diferentes de cremes com 5% (m/m) de aciclovir e diferentes percentagens de propilenoglicol, poloxâmero 407 e laurilsulfato de sódio. Os valores de pH obtidos para estas formulações variaram desde 4,08 até 9,09.

Na **Figura 21** estão representados os valores de pH obtidos para as formulações definitivas (cremes C5_1 e C5_1B) ao fim de 1 e 15 semanas. Como é possível verificar, ambos os cremes apresentaram uma diminuição do pH ao longo do tempo. Ao fim de 15 semanas, os cremes C5_1 e C5_1B apresentaram valores de pH de $5,67 \pm 0,17$ e $5,96 \pm 0,04$, respetivamente. Estes valores não diferem muito entre si, logo é possível concluir que a presença de colagénio não exerceu uma grande influência neste parâmetro. Além disso, os valores encontram-se dentro do intervalo de pH adequado para aplicação na pele (5,5-7). Num estudo sobre emulsões O/A dermocosméticas com colagénio, o pH das emulsões analisadas variou entre 6 e 6,5 (94), enquanto num outro estudo sobre emulsões O/A com colagénio e diferentes óleos vegetais (25), o pH das formulações variou entre 5,56 e 5,81 (valor obtido após 6 meses de armazenamento), o que não difere muito dos resultados obtidos neste trabalho para o creme A/O/A.

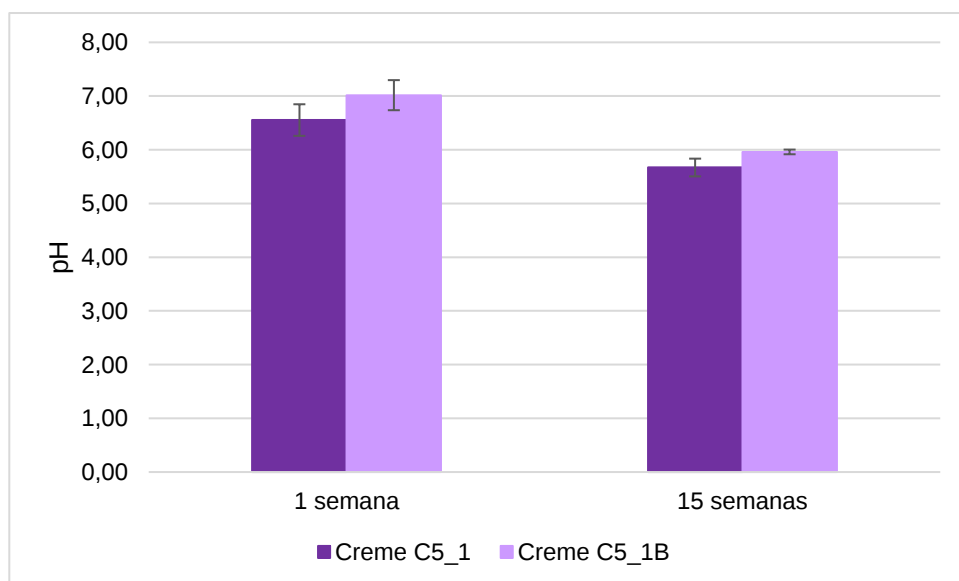


Figura 21- Representação gráfica da variação do pH do creme C5_1 e do creme base em função do tempo.

Quando comparado o pH do creme C5_1 com o do creme C5_1B, ao fim de 1 semana, verificou-se que não existiram diferenças significativas entre as duas formulações ($p=0,1193$), já ao fim de 15 semanas verificou-se o oposto.

2.3.4. Ensaio de Estabilidade Acelerada por Centrifugação

Na Figura 22 é possível observar o aspeto dos cremes C5_1 e C5_1B após serem submetidos a 2 ciclos de centrifugação a 3000 rpm.

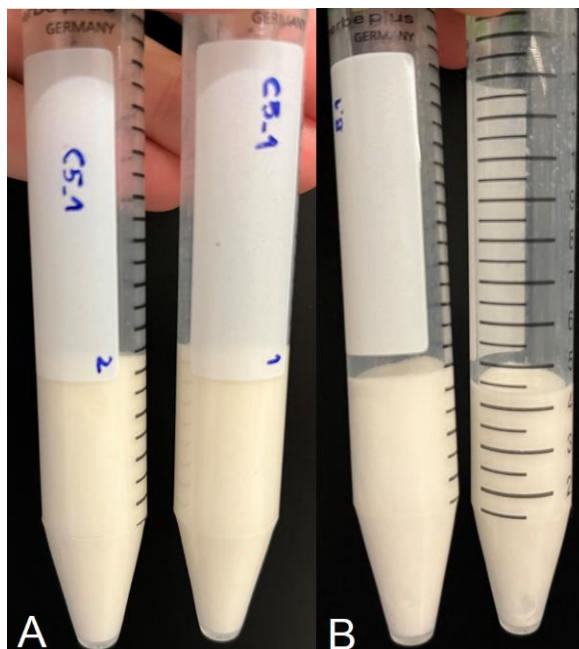


Figura 22- Aspeto dos cremes C5_1 (A) e C5_1B (B) após serem submetidos ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação.

O ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação foi realizado após a preparação das formulações C5_1 e C5_1B. Após serem submetidos a 2 ciclos de 3000 rpm com a duração de 30 minutos cada ciclo, os cremes e o gele apresentavam um aspeto homogéneo, não se verificando separação de fases, precipitação, formação de grumos ou quaisquer outros sinais de instabilidade física ou química. Gomes et al. (90) também avaliaram a estabilidade de hidrogéis com 1% e 3% de colagénio e verificaram que, após centrifugação a 3000 rpm durante 30 minutos, os géis não apresentaram qualquer instabilidade.

É possível concluir que a adição do colagénio à formulação não alterou a estabilidade do creme.

2.3.5. Teste de Oclusão

Os resultados do teste de oclusão apresentados na **Tabela 12** correspondem ao valor médio da percentagem de perda de água por evaporação de 2 medições.

É importante que a formulação em estudo tenha um elevado poder oclusivo, uma vez que está comprovado que uma ferida cura mais rapidamente num ambiente húmido (95), logo quanto maior o poder oclusivo do creme, menor será a perda de água por evaporação no local de aplicação, favorecendo o processo de cicatrização.

Tabela 12- Resultados do teste de oclusão das formulações C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2, C5_1, C5_1B e G1.

FORMULAÇÃO	PERDA DE ÁGUA POR EVAPORAÇÃO (%)
C3	73,03
C3_1	83,33
C4	95,96
C4_1	95,16
C4_2	76,60
C5_1	74,77
C5_1B	75,05
G1	99,90
VASELINA (CONTROLO)	50,05

Após 48 horas a 40°C, o creme C3 foi o que apresentou o maior poder oclusivo (menor perda de água por evaporação), no entanto, o valor de água perdida por evaporação não é muito diferente do valor obtido no caso do creme C5_1. Se compararmos o creme C4_2 e o C5_1, nos quais a única diferença é o tipo de colagénio utilizado, o valor obtido neste ensaio não é muito distinto, logo não é possível afirmar que o colagénio hidrolisado contribuiu para um poder oclusivo superior. O gele G1 apresentou o menor poder oclusivo, o que seria de esperar visto que não apresenta uma fase oleosa.

Relativamente ao creme base C5_1B, o creme C5_1 apresentou um poder oclusivo ligeiramente superior, no entanto, não é um valor suficientemente distinto para se poder afirmar que o colagénio teve influência no poder oclusivo da formulação. Ainda assim, este creme apresenta um poder oclusivo bastante menor do que a vaselina (utilizada como excipiente oclusivo de referência). Vários artigos referem que o colagénio é um humectante natural que reduz a perda transepidérmica de água através da formação de um filme (24, 96-98), logo seria de esperar que o creme C5_1 apresentasse um poder oclusivo mais elevado que o creme base.

2.3.6. Ensaios Reológicos

Inicialmente foi medida a viscosidade das preparações provisórias C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e do gele G1 a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e a $32 \pm 1^\circ\text{C}$, 1 semana após a preparação de cada formulação. Nas figuras seguintes é possível observar os dados obtidos.

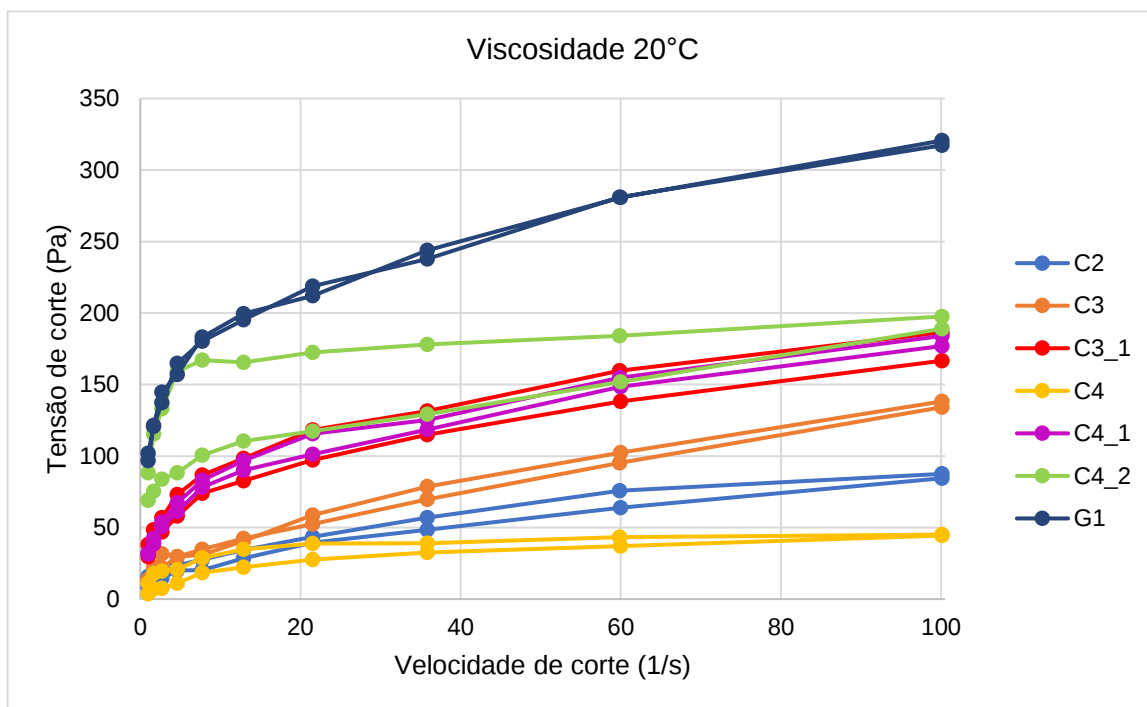


Figura 23- Reogramas das preparações C2, C3 , C3_1 , C4, C4_1 , C4_2 e G1, analisados à temperatura de $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

Como é possível verificar na Figura 23, à temperatura ambiente, o gele G1 apresentou a maior tensão de corte a 100 s^{-1} (320,6 Pa) e o creme C4 apresentou a menor tensão de corte (45,07 Pa). Todas as formulações apresentaram um comportamento reofluidificante, com tensão de cedência (à exceção da C2, C3 e C4). A esta temperatura, as formulações praticamente não apresentaram tixotropia, à exceção do creme C4_2. Ainda é possível observar que a emulsão múltipla sem gelificante (C4) apresenta uma viscosidade bastante inferior à emulsão simples sem gelificante (C3). Contudo, após adição de 0,2% (m/m) de gelificante PFC® à emulsão simples (C3_1) e à emulsão múltipla (C4_1), a viscosidade de ambas não diferiu significativamente, sendo os reogramas praticamente sobreponíveis.

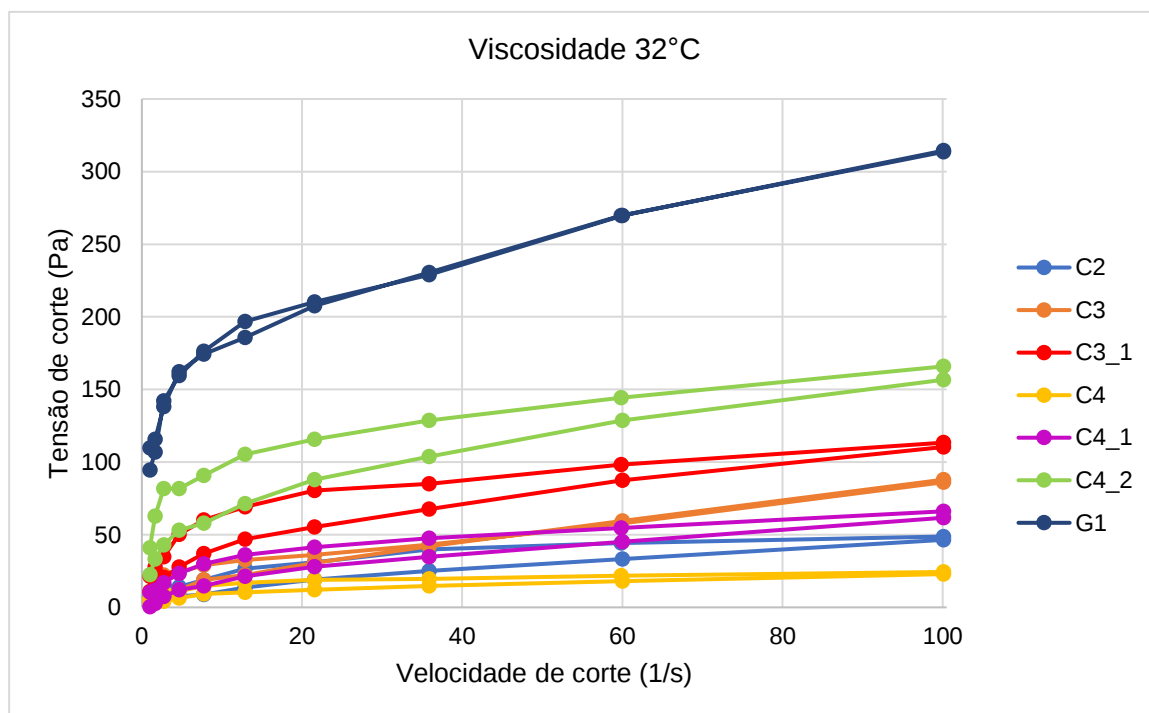


Figura 24- Reogramas das preparações C2, C3, C3_1, C4, C4_1, C4_2 e G1, analisados à temperatura de $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

A 32°C a situação é bastante semelhante à verificada a 20°C , na medida em que o gele G1 apresentou a maior tensão de corte (314,4 Pa) e o creme C4 apresentou a menor tensão de corte (24,38 Pa). Ainda assim, ambos os valores são ligeiramente inferiores aos obtidos para a temperatura de 20°C . Tal como se verificou a 20°C , também neste caso é possível observar que a emulsão múltipla sem gelificante (C4) apresentou valores de viscosidade inferiores à emulsão simples sem gelificante (C3). Contrariamente ao verificado no ensaio à temperatura ambiente, neste caso com a adição de 0,2% (m/m) de gelificante PFC® à emulsão múltipla e simples, observou-se que o creme C3_1 (resultante da emulsão simples) apresentou uma maior viscosidade que o creme C4_1 (resultante da emulsão múltipla). Tal como a 20°C , as formulações apresentaram um comportamento reofluidificante, com tensão de cedência no caso do gele G1, tendo os cremes C3_1 e C4_1 apresentado também ligeira tixotropia. É possível concluir que, quando aplicados na pele, os cremes C3_1 e C4_1 são fáceis de espalhar, retomando a sua consistência após cessar a aplicação de uma força. É de realçar que a quantidade de gelificante PFC® utilizada afeta a viscosidade das preparações, tendo-se verificado um aumento progressivo da viscosidade, a ambas as temperaturas, para as formulações C4 (sem gelificante), C4_1 (com 0,2% de gelificante) e C4_2 (com 0,5% de gelificante).

Tal como se verificou no estudo reológico das preparações desenvolvidas neste trabalho, a maioria dos trabalhos descritos na literatura têm demonstrado que, de um modo

geral, os cremes e geles apresentam comportamento pseudoplástico ou reofluidificante. Por exemplo, Jales *et al* (99) desenvolveram 4 hidrogeles diferentes com dois agentes gelificantes distintos: Carbopol® 940 e Hidroxietilcelulose. Estes hidrogeles apresentaram um comportamento reológico pseudoplástico, tendo alguns apresentado também tixotropia.

Na fase seguinte foram analisados os cremes definitivos C5_1 e C5_1B ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, de modo a determinar se estas preparações mantinham a sua estabilidade ao longo de 15 semanas.

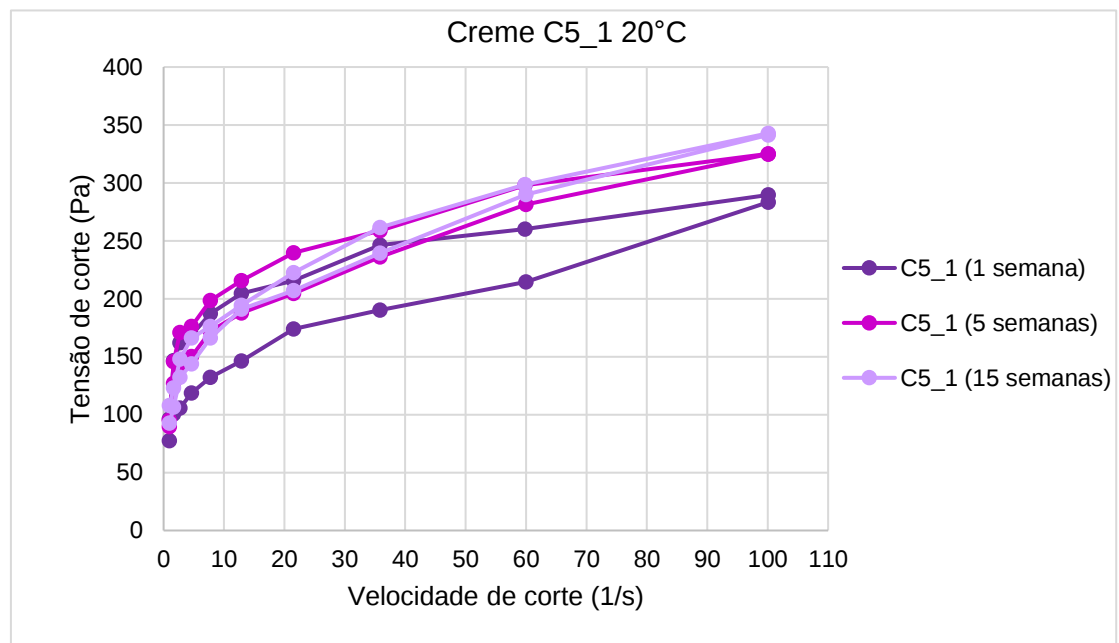


Figura 25- Reogramas do creme C5_1 analisado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

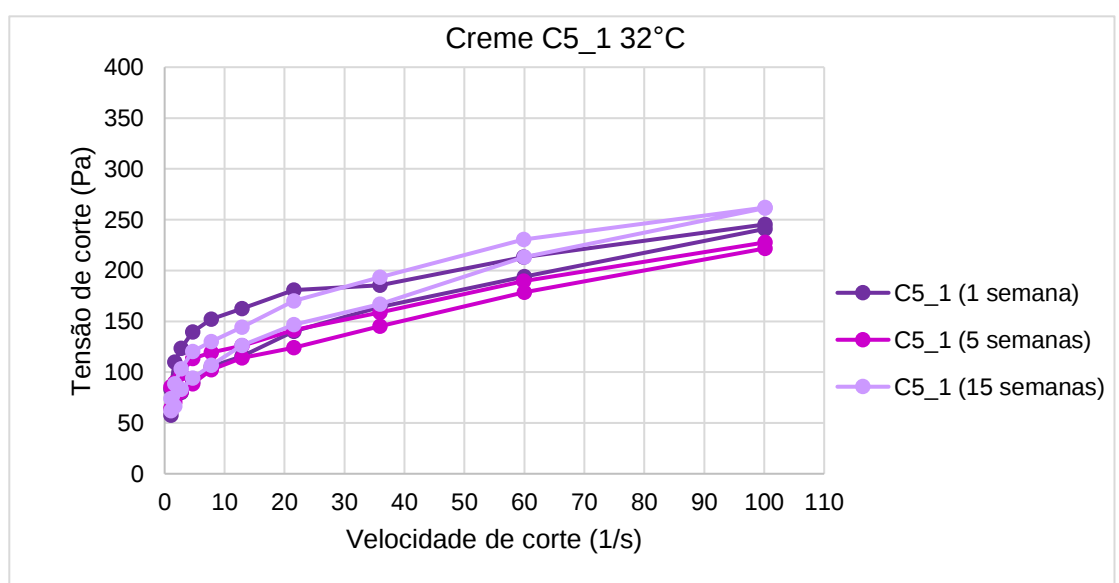


Figura 26- Reogramas do creme C5_1 analisado a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

Nas figuras anteriores é possível observar o comportamento reológico do creme C5_1 a 20°C e 32°C ao longo de 15 semanas. Este creme apresenta um comportamento reofluidificante com tensão de cedência e tixotropia, tendo esta sido mais elevada ao fim de 1 semana. Em dois estudos diferentes sobre emulsões O/A com colagénio também foi demonstrado que as preparações apresentaram um comportamento pseudoplástico ou reofluidificante e tixotrópico (25, 94). A 20°C ocorreu um ligeiro aumento da viscosidade com o decorrer das 15 semanas, enquanto a 32°C verificou-se uma sobreposição dos gráficos, indicando que, com o passar do tempo o creme manteve as suas características em termos de viscosidade quando se efetuou a medição a uma temperatura mais elevada.

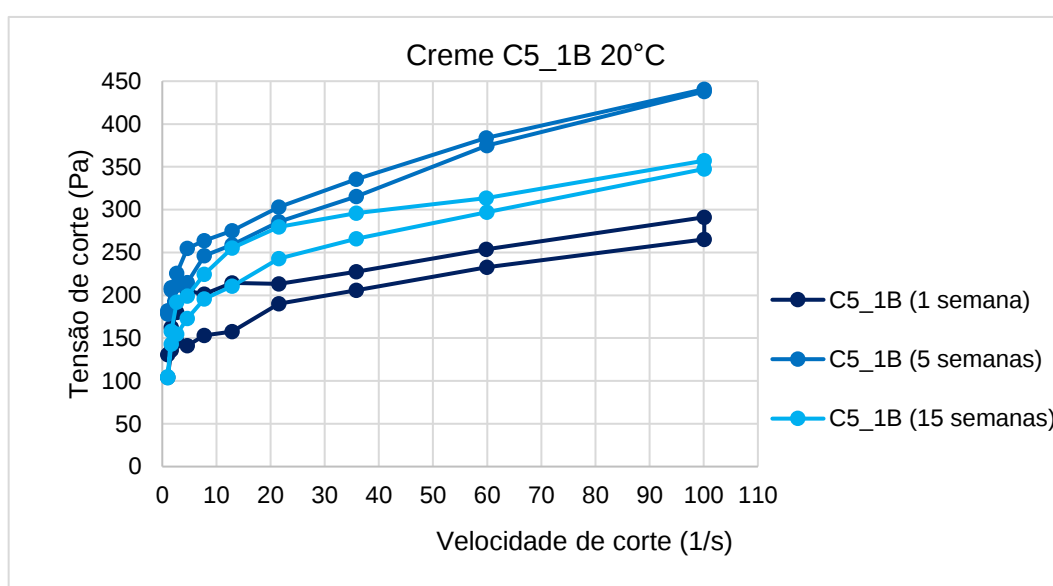


Figura 27- Reogramas do creme C5_1B analisado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$.

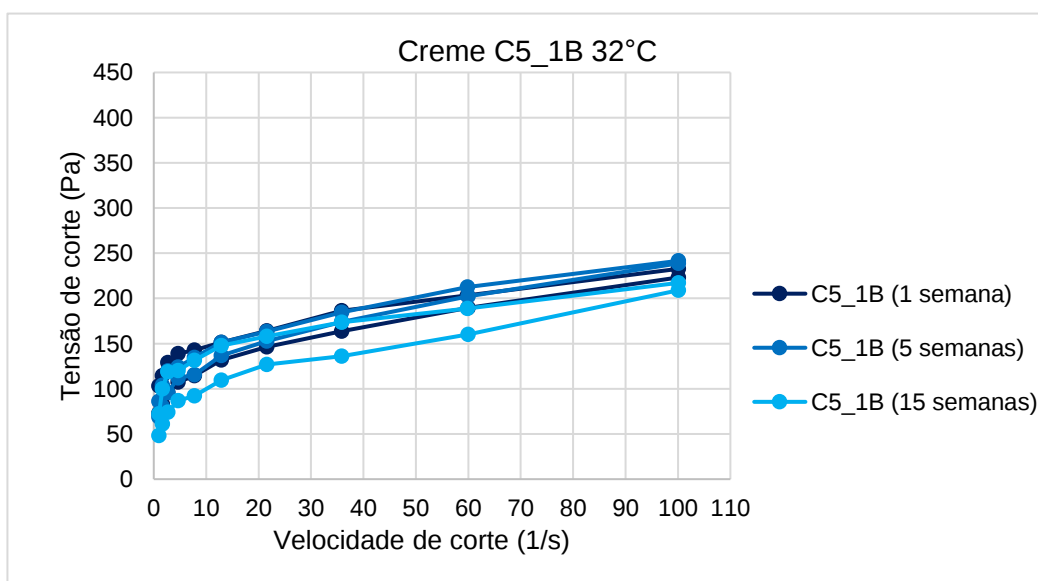


Figura 28- Reogramas do creme C5_1B analisado a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

O creme base demonstrou um comportamento reológico semelhante ao creme com colagénio, podendo concluir-se que o colagénio não afetou a viscosidade das preparações. Além disso, ao fim de 15 semanas ambos os cremes apresentam valores de tensão de corte bastante semelhantes, tanto para 20°C como para 32°C, o que corrobora a afirmação anterior de que o colagénio não altera a consistência do creme base.

2.3.7. Análise da Textura

Na primeira e segunda fase foi avaliada a firmeza e adesividade das formulações C2 até C4_2 e do gele G1, um dia após a preparação dos cremes e do gele. Os resultados obtidos estão representados nas figuras seguintes.

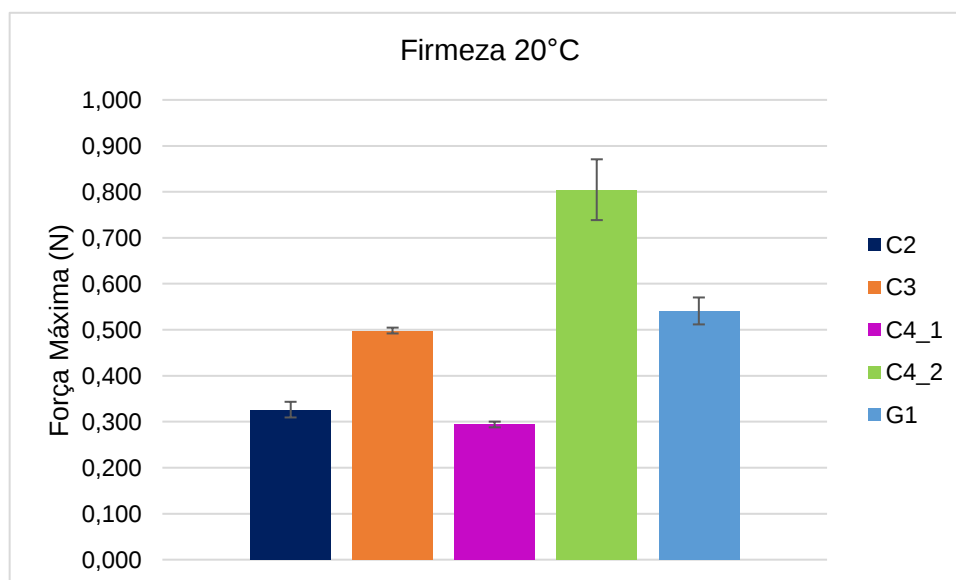


Figura 29- Firmeza das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 à temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

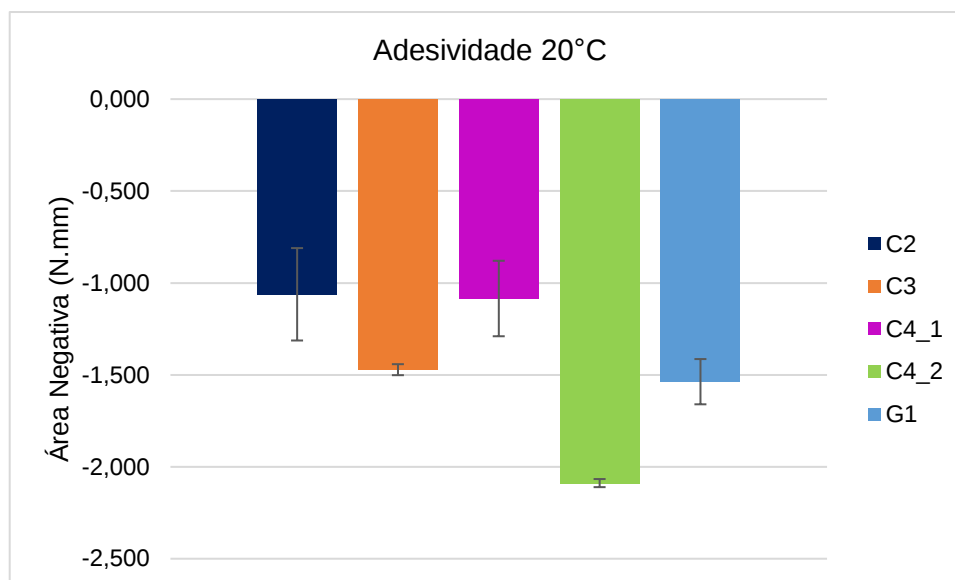


Figura 30- Adesividade das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 à temperatura ambiente ($20 \pm 1^\circ\text{C}$).

Analisando os dois gráficos apresentados previamente, é possível concluir que o creme C4_2 foi o que apresentou a maior firmeza e adesividade, o que indica que esta é a formulação mais consistente. Este resultado seria de esperar, uma vez que este creme apresenta uma maior percentagem de gelificante. Como é possível observar, não foi avaliada a textura do creme C4 uma vez que este creme não apresentava uma consistência suficiente para que fosse possível avaliar os parâmetros de textura, como foi também verificado nos ensaios reológicos descritos na secção anterior.

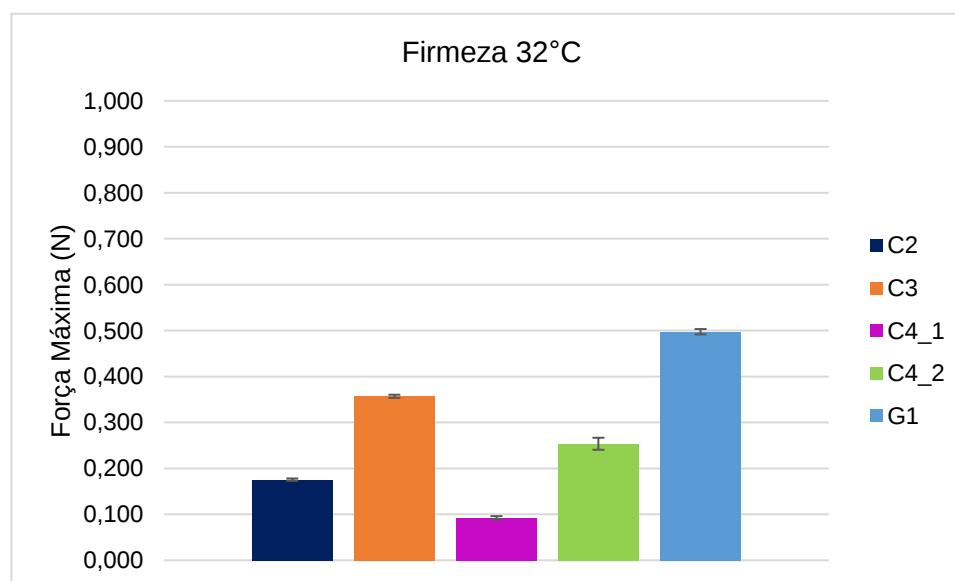


Figura 31- Firmeza das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

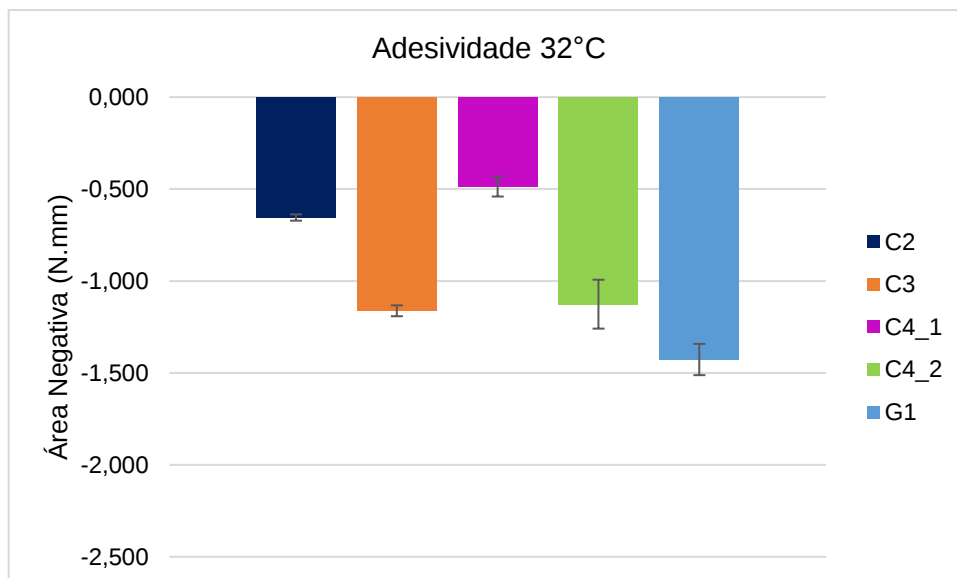


Figura 32- Adesividade das formulações C2, C3, C4_1, C4_2 e G1 a $32 \pm 1^\circ\text{C}$.

A 32°C , o gele G1 apresentou uma maior firmeza e adesividade que as outras formulações, o que indica que ao ser aplicado na pele apresentará uma maior consistência e aderência do que as outras formulações, permanecendo mais tempo em contato com a pele.

Os cremes C5_1 e C5_1B foram analisados ao fim de 1, 5 e 21 semanas (devido à impossibilidade de analisar ao fim de 15 semanas), a duas temperaturas diferentes (20°C e 32°C).

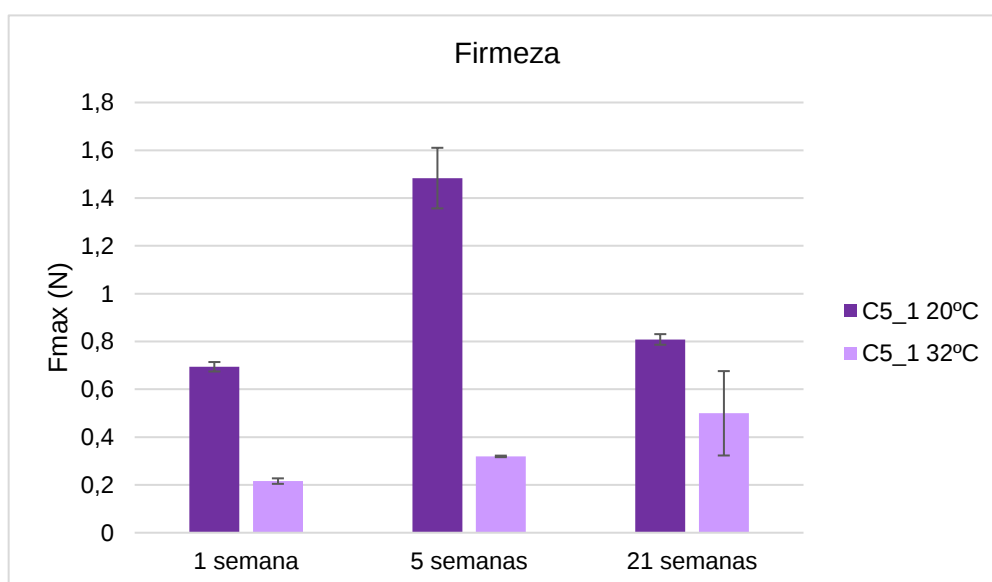


Figura 33- Comparação da Força Máxima (N) do creme C5_1 a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.

A análise da textura do creme C5_1 a 20°C e a 32°C demonstrou que em ambos os casos houve um aumento da firmeza ao fim de 21 semanas. Na análise ao fim de 5 semanas efetuada a 20°C verificou-se um aumento abrupto da força máxima (verificando-se o mesmo na adesividade), podendo este valor ter sido influenciado pela mais baixa temperatura do meio ambiente. No entanto, verificou-se que ao fim de 21 semanas, os valores da força máxima apesar de apresentarem um ligeiro aumento, são mais próximos dos iniciais. Como era expectável, foi possível observar que ao fim de 1 semana o valor da firmeza a 20°C ($0,694 \pm 0,020$ N) foi superior ao valor da firmeza a 32°C ($0,216 \pm 0,012$ N) e esta diferença diminuiu ao fim de 21 semanas, sendo que a 20°C a força máxima foi $0,809 \pm 0,022$ N e a 32°C foi $0,500 \pm 0,177$ N. A 20°C verificou-se que os valores apresentaram diferenças significativas entre a 1ª semana e a 21ª semana ($p < 0,05$). Se compararmos os valores da firmeza às duas temperaturas diferentes, existem diferenças significativas ao fim da 1ª semana ($p < 0,05$), mas ao fim de 21 semanas já não existem diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,0950$).

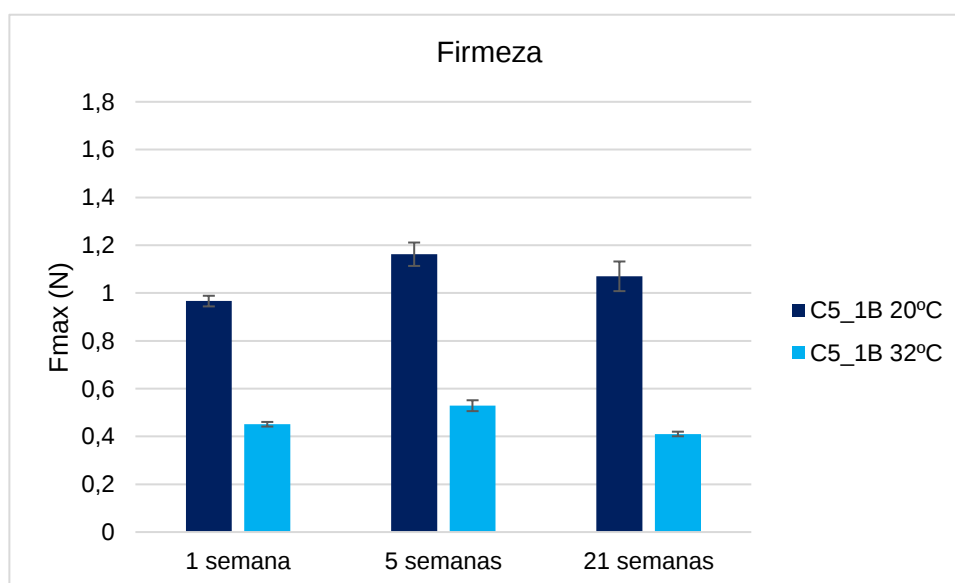


Figura 34- Comparação da Força Máxima (N) do creme C5_1B a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.

O creme base a 20°C exibiu valores de firmeza superiores ao creme C5_1. A 32°C também se verificaram valores superiores aos do creme com colagénio, exceto ao fim de 21 semanas em que ocorreu uma ligeira diminuição da força máxima. Relativamente à firmeza, comparando o creme C5_1 com o creme C5_1B, foi possível concluir que existem

diferenças significativas a 20°C ao longo do tempo e a 32°C concluiu-se que não há diferenças significativas ao fim de 21 semanas.

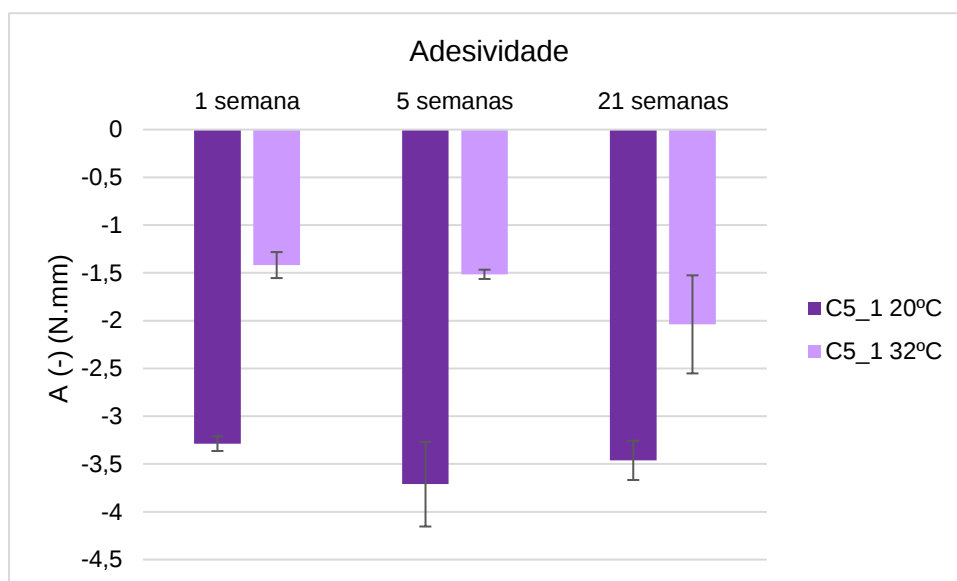


Figura 35- Comparação da Área Negativa (N.mm) do creme C5_1 a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.

Relativamente à adesividade, a 20°C verificou-se um aumento da adesividade de $-3,286 \pm 0,078$ N.mm após 1 semana para $-3,462 \pm 0,205$ N.mm ao fim de 21 semanas e a 32°C a adesividade sofreu um aumento ligeiramente superior, passando de $-1,418 \pm 0,136$ N.mm ao fim de 1 semana para $-2,039 \pm 0,513$ N.mm ao fim de 21 semanas. No entanto, é possível observar que a adesividade é superior a 20°C do que a 32°C em todas as medições. Tanto a 20°C como a 32°C os valores da adesividade da preparação não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo ($p < 0,05$), contudo, entre as duas temperaturas existiram diferenças estatisticamente significativas tanto ao fim de 1 semana como às 21 semanas.

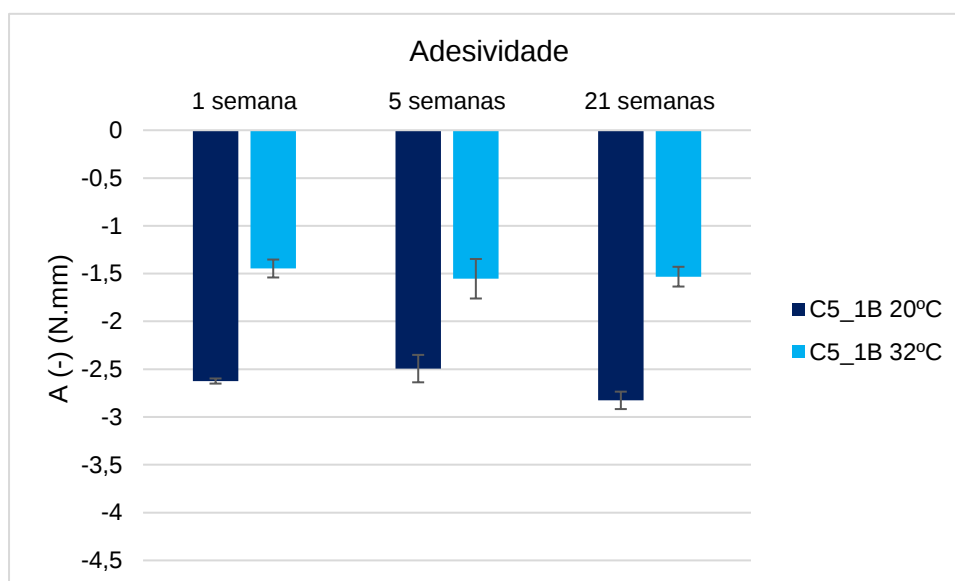


Figura 36- Comparação da Área Negativa (N.mm) do creme C5_1B a 20°C e 32°C ao fim de 1, 5 e 21 semanas de armazenamento.

O creme base apresentou um comportamento semelhante ao creme com colagénio, isto é, a adesividade aumentou ligeiramente ao fim de 21 semanas a ambas as temperaturas. O creme C5_1B apresentou diferenças significativas ao longo do tempo apenas a 20°C, relativamente ao creme C5_1 ($p < 0,05$).

O creme C5_1 demonstrou um aumento da firmeza e da adesividade ao longo do tempo, estando estes resultados em concordância com os obtidos nos ensaios reológicos, o que poderá ter ocorrido devido à eventual evaporação de água da fase externa da preparação.

2.3.8. Análise da Espalhabilidade

Conforme descrito previamente, o ensaio de espalhabilidade também permitiu analisar a consistência (Área positiva do gráfico da Força máxima *versus* deslocamento) dos cremes C5_1 e C5_1B.

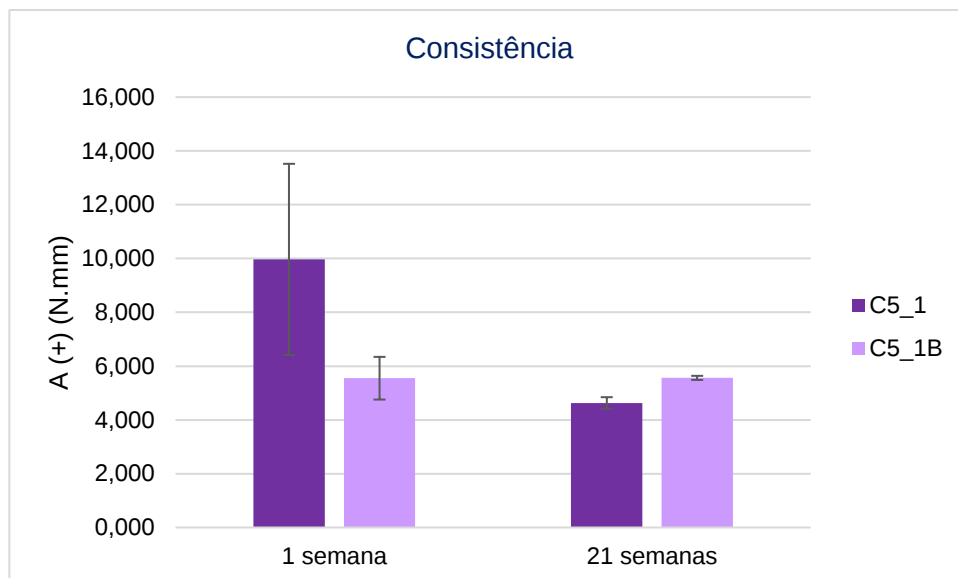


Figura 37- Comparação da Área Positiva (N.mm) dos cremes C5_1 e C5_1B a 32°C ao fim de 1 e 21 semanas de armazenamento.

Verificou-se uma diminuição da consistência do creme C5_1 ao longo do tempo, enquanto o creme C5_1B praticamente não sofreu alteração ao fim de 21 semanas de armazenamento. Na 1ª semana o creme C5_1 apresentou maior consistência que a respetiva base (C5_1B), no entanto, ao fim de 21 dias verificou-se o inverso. A análise estatística permitiu concluir que a consistência do creme C5_1B ao fim de 21 semanas ($5,562 \pm 0,076$ N.mm) foi significativamente diferente ($p=0,0285$) do creme C5_1 ($4,631 \pm 0,241$ N.mm).

Este ensaio revelou que a consistência do creme C5_1 a 32°C ao fim de 21 semanas foi inferior à obtida na 1ª semana, o que não está de acordo com os resultados obtidos no método utilizado previamente para avaliar a textura, visto que nas mesmas condições de tempo e temperatura, no método anterior verificou-se um aumento da firmeza e da adesividade deste creme. Esta diferença poderá ser devida ao facto de ter sido utilizada uma sonda distinta. No entanto, o ensaio de espalhabilidade permite simular melhor o comportamento do creme quando espalhado na pele.

2.3.9. Quantificação do colagénio

Como referido anteriormente, foi feita uma curva de calibração para posteriormente ser calculada a quantidade de colagénio presente no creme C5_1.

Na figura seguinte é possível observar a representação gráfica dos valores de absorvância em função da concentração de colagénio das soluções padrão.

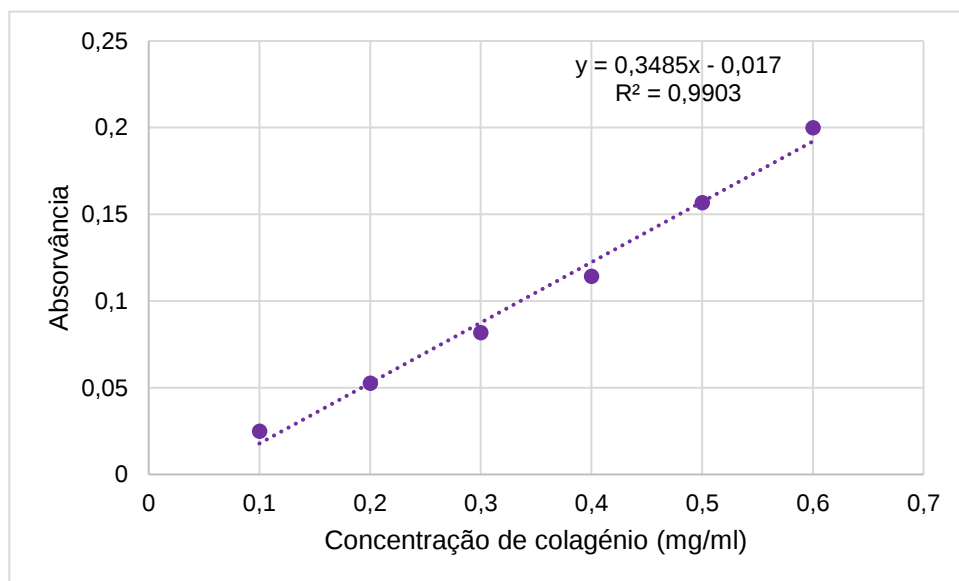


Figura 38- Curva de calibração das soluções padrão de colagénio.

O método de doseamento do colagénio por espectrofotometria UV/Vis revelou uma correlação linear para a gama de concentrações usadas, tendo sido obtido um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9903.

Após a obtenção da curva de calibração procedeu-se ao doseamento do colagénio presente nos cremes C3_2 (correspondente ao creme simples O/A contendo 5% de colagénio hidrolisado) e C5_1 (correspondente ao creme A/O/A contendo 5% de colagénio hidrolisado) após a preparação e ao fim de 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, para avaliar se haveria alguma diferença entre o creme simples e o creme A/O/A.

Nenhum dos cremes sofreu alteração na quantidade de colagénio ao fim de 30 dias de armazenamento. O creme C3_2 apresentou ao fim de 30 dias uma percentagem de colagénio de $100,6 \pm 9,4 \%$ e o creme C5_1 de $99,9 \pm 10,7\%$. Em ambos os casos, o facto de não ter ocorrido alteração na quantidade de colagénio poderá ser indicativo de que não ocorreu degradação desta proteína ao fim de 30 dias.

2.3.10. Ensaio de Libertação *in vitro*

A concentração de colagénio libertado a partir do creme O/A (C3_2) e do creme A/O/A (C5_1) ao longo de 2 horas de ensaio foi avaliada. Os valores das absorvâncias obtidos para ambos os cremes foram corrigidos, subtraindo os valores das absorvâncias obtidos para os respetivos cremes base submetidos ao ensaio nas mesmas condições. Este ensaio

permitiu eliminar eventuais interferências decorrentes de qualquer outro componente da formulação que pudesse absorver no mesmo comprimento de onda do colagénio.

Na figura seguinte é possível observar os perfis de libertação *in vitro* do colagénio a partir dos cremes C3_2 e C5_1, ao longo de 2 horas de ensaio.

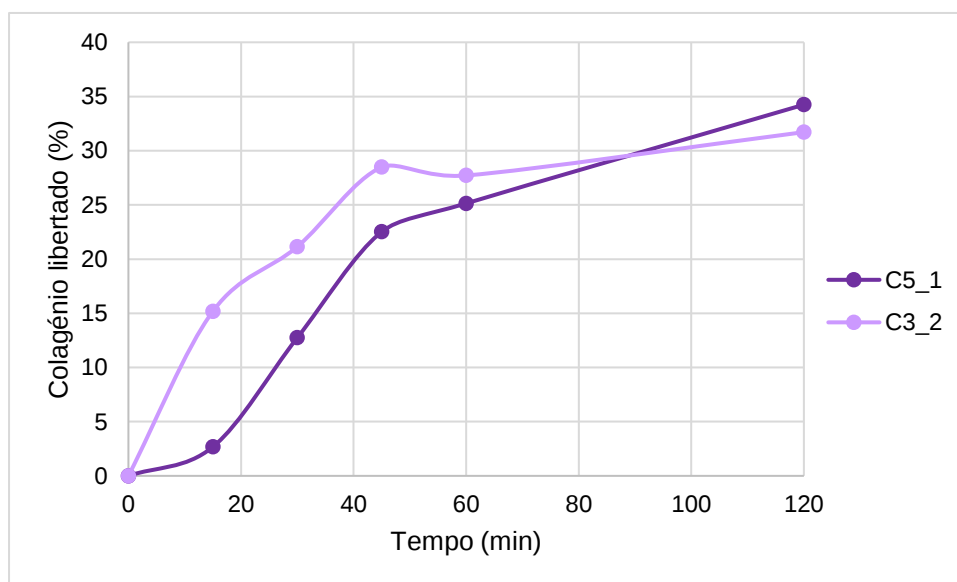


Figura 39- Perfis de libertação *in vitro* dos cremes C5_1 e C3_2.

Como é possível observar na **Figura 39**, ambos os cremes libertaram quantidades de colagénio bastante semelhantes ao fim de 2 horas de ensaio. No entanto, nos primeiros 60 minutos de ensaio o creme simples C3_2 apresentou uma maior libertação de colagénio, o que seria de esperar, uma vez que, neste caso, o colagénio se encontra na fase externa do creme, não tendo de atravessar a fase hidrófoba para se libertar, contrariamente ao que acontece no creme A/O/A. Em nenhum dos cremes se verificou uma libertação do colagénio ao fim de 2 horas superior a 35%, no entanto, estes resultados são satisfatórios uma vez que só refletem a libertação da camada superior do creme. Quando o ensaio foi prolongado durante 3 e 4h os valores de colagénio libertado diminuiram, o que pode ser indicativo de que nenhum dos sistemas permitiu a libertação completa do colagénio ou que em ensaios mais prolongados poderá ocorrer a degradação do colagénio.

3. CONCLUSÕES

O colagénio é uma das proteínas mais importantes e abundantes produzidas pelo corpo humano, desempenhando um papel importante, nomeadamente na constituição dos tecidos conjuntivos da pele. Uma vez que esta proteína é um dos componentes principais da matriz extracelular, tem vindo a ser cada vez mais utilizada em formulações para a cicatrização de feridas. O papel do colagénio na cicatrização prende-se com o facto de ser capaz de interagir com uma variedade de vias de regeneração que ocorrem na cicatrização, desde a angiogénese até à re-epitelização.

Neste trabalho foram preparados vários cremes O/A e A/O/A com colagénio nativo e hidrolisado, com o objetivo de realizar a respetiva caracterização físico-química e, posteriormente, comparar as preparações de modo a determinar qual seria a mais adequada para aplicar numa pele danificada. Foi também preparado um gele hidrófilo, o qual foi descartado por apresentar um efeito oclusivo muito baixo.

O creme A/O/A C5_1 foi o que, de um modo geral, apresentou melhores resultados. Este creme apresentou boas características organoléticas, as quais se mantiveram ao longo do tempo. Esta preparação apresentou um pH compatível com o da pele. Tanto os parâmetros de textura (firmeza e adesividade) como a viscosidade aumentaram apenas ligeiramente ao longo do tempo, tendo este creme apresentado um comportamento reológico reofluidificante com tensão de cedência, adequado para aplicação cutânea. O fator menos positivo foi o facto de a percentagem de colagénio libertado ter sido inferior a 50%.

Num trabalho futuro seria interessante realizar outros ensaios, nomeadamente o ensaio de permeação cutânea *in vitro*, recorrendo a células de difusão, a realização de estudos em culturas de células e ensaios biométricos em voluntários humanos.

Concluindo, os cremes desenvolvidos neste trabalho poderão constituir uma base para o desenvolvimento de sistemas inovadores destinados a promover a regeneração da pele danificada.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kanitakis J. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol.* 2002;12(4):390-9;.
2. Kolarsick PAJ, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and Physiology of the Skin. *J Dermat Nurses Asso.* 2011;3(4):203-15.
3. Khavkin J, Ellis DA. Aging skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(2):229-34.
4. Maibach H, Honari G. *Applied Dermatotoxicology: Clinical Aspects.* Academic Press; 2014. p. 1-10.
5. Roger M, Fullard N, Costello L, Bradbury S, Markiewicz E, O'Reilly S, et al. Bioengineering the microanatomy of human skin. *J Anat.* 2019;234(4):438-55.
6. Gaboriau HP, Murakami CS. Skin anatomy and flap physiology. *Otolaryngol Clin North Am.* 2001;34(3):555-69.
7. Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Semin Oncol Nurs.* 2013;29(3):160-9.
8. Losquadro WD. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2017;25(3):283-9.
9. McGrath JA, Eady RAJ, Pope FM. Anatomy and Organization of Human Skin. In: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editors. *Rook's Textbook of Dermatology.* Oxford: Blackwell Science Ltd Oxford; 2004. p. 1-53.
10. Mikeshe LM, Aramadhaka LR, Moskaluk C, Zigrino P, Mauch C, Fox JW. Proteomic anatomy of human skin. *J Proteomics.* 2013;84:190-200.
11. Prista LN, Alves AC, Morgado R, Lobo JS. *Tecnologia Farmacêutica.* 6ª ed. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2009.
12. Woodley DT. Distinct Fibroblasts in the Papillary and Reticular Dermis: Implications for Wound Healing. *Dermatol Clin.* 2017;35(1):95-100.
13. Cestari SdCP. Noções de Anatomia e Histologia da Pele. In: Rio EA, editor. *Dermatologia Pediátrica.* 1ª ed 2012. p. 9-16.
14. Gelse K, Poschl E, Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(12):1531-46.
15. Sato K, Yomogida K, Wada T, Yorihozi T, Nishimune Y, Hosokawa N, et al. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37678-84.
16. Myllyharju J, Kivirikko KI. Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med.* 2001;33(1):7-21.

17. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991;5(13):2814-23.
18. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol.* 1993;5(5):883-90.
19. Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(1):a004978.
20. Berisio R, Vitagliano L, Mazzarella L, Zagari A. Crystal structure of the collagen triple helix model [(Pro-Pro-Gly)(10)](3). *Protein Sci.* 2002;11(2):262-70.
21. Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm.* 1998;45(2):113-36.
22. Lee CH, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm.* 2001;221(1-2):1-22.
23. Samad N, Sikarwar A. Collagen: New Dimension in Cosmetic and Healthcare. *International Journal of Biochemistry Research & Review.* 2016;14:1-8.
24. Sionkowska A, Adamiak K, Musial K, Gadomska M. Collagen Based Materials in Cosmetic Applications: A Review. *Materials (Basel).* 2020;13(19).
25. Danila E, Moldovan Z, Kaya MGA, Ghica MV. Formulation and characterization of some oil in water cosmetic emulsions based on collagen hydrolysate and vegetable oils mixtures. *Pure Appl Chem.* 2019;91(9):1493-507.
26. Danila E, Stan R, Enache AE, Turkmen M, Kaya DA, Kaya MA, et al. Obtaining and Characterization of Some Emulsions Based on Collagen Hydrolysate and Natural Extracts with a Potential Anticellulitic Action. *Univ Politeh Buchar.* 2019;81(4):73-84.
27. Udhayakumar S, Shankar KG, Sowndarya S, Rose C. Novel fibrous collagen-based cream accelerates fibroblast growth for wound healing applications: in vitro and in vivo evaluation. *Biomater Sci-Uk.* 2017;5(9):1868-83.
28. Widdowson JP, Picton AJ, Vince V, Wright CJ, Mearns-Spragg A. In vivo comparison of jellyfish and bovine collagen sponges as prototype medical devices. *J Biomed Mater Res B.* 2018;106(4):1524-33.
29. Cheng XC, Shao ZY, Li CB, Yu LJ, Raja MA, Liu CG. Isolation, Characterization and Evaluation of Collagen from Jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for Use in Hemostatic Applications. *Plos One.* 2017;12(1).
30. Sugiura H, Yunoki S, Kondo E, Ikoma T, Tanaka J, Yasuda K. In Vivo Biological Responses and Bioresorption of Tilapia Scale Collagen as a Potential Biomaterial. *J Biomat Sci-Polym E.* 2009;20(10):1353-68.
31. Rodriguez MIA, Barroso LGR, Sanchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *J Cosmet Dermatol-US.* 2018;17(1):20-6.

32. Coppola D, Oliviero M, Vitale GA, Lauritano C, D'Ambra I, Iannace S, et al. Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications. *Mar Drugs*. 2020;18(4).
33. O'Leary LE, Fallas JA, Bakota EL, Kang MK, Hartgerink JD. Multi-hierarchical self-assembly of a collagen mimetic peptide from triple helix to nanofibre and hydrogel. *Nat Chem*. 2011;3(10):821-8.
34. Silvipriya KS, Kumar KK, Bhat AR, Kumar BD, John A, Lakshmanan P. Collagen: Animal Sources and Biomedical Application. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2015;5(3):123-7.
35. Fertala A. Three Decades of Research on Recombinant Collagens: Reinventing the Wheel or Developing New Biomedical Products? *Bioengineering (Basel)*. 2020;7(4).
36. Bianchi FM, Angelinetta C, Rizzi G, Pratico A, Villa R. Evaluation of the Efficacy of a Hydrolyzed Collagen Supplement for Improving Skin Moisturization, Smoothness, and Wrinkles. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2022;15(3):48-52.
37. Figueres Juher T, Basés Pérez E. [An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen intake on joint and bone health and on skin ageing]. *Nutricion hospitalaria*. 2015;32 Suppl 1:62-6.
38. Watanabe-Kamiyama M, Shimizu M, Kamiyama S, Taguchi Y, Sone H, Morimatsu F, et al. Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *J Agric Food Chem*. 2010;58(2):835-41.
39. Chouhan D, Dey N, Bhardwaj N, Mandal BB. Emerging and innovative approaches for wound healing and skin regeneration: Current status and advances. *Biomaterials*. 2019;216:119267.
40. Boateng JS, Matthews KH, Stevens HN, Eccleston GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892-923.
41. Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraro RE, Rodeheaver G, et al. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing. *Arch Dermatol*. 1994;130(4):489-93.
42. Krasner D, Kennedy KL, Rolstad BS, Roma AW. The ABCs of wound care dressings. *Ostomy Wound Manage*. 1993;39(8):66, 8-9, 72 passim.
43. Bolton L, van Rijswijk L. Wound dressings: meeting clinical and biological needs. *Dermatol Nurs*. 1991;3(3):146-61.
44. Lindley LE, Stojadinovic O, Pastar I, Tomic-Canic M. Biology and Biomarkers for Wound Healing. *Plast Reconstr Surg*. 2016;138(3 Suppl):18S-28S.
45. Hom D. Wound healing in relation to scarring. *FACIAL PLASTIC SURGERY CLINICS OF NORTH AMERICA*. 1998;6:111-24.

46. Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG. Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Mol Med.* 2011;17(1-2):113-25.
47. Wang PH, Huang BS, Horng HC, Yeh CC, Chen YJ. Wound healing. *J Chin Med Assoc.* 2018;81(2):94-101.
48. Gantwerker EA, Hom DB. Skin: histology and physiology of wound healing. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(3):441-53.
49. Martin P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science.* 1997;276(5309):75-81.
50. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res.* 2012;49(1):35-43.
51. Guo S, DiPietro LA. Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-29.
52. Koh TJ, DiPietro LA. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e23.
53. Sun BK, Siprashvili Z, Khavari PA. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Science.* 2014;346(6212):941-5.
54. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature.* 2008;453(7193):314-21.
55. Medicamento IINdFed. Farmacopeia portuguesa 9: edição oficial. Infarmed, editor. Lisboa: Infarmed; 2008.
56. Nogueira Prista L, Correia Alves A, Morgado R, Sousa Lobo J. Tecnologia Farmacêutica. 6ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2003.
57. Neves de Gasperi E. Cosmetologia I: UNIASSELVI; 2015.
58. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. The Theory and Practice of Industrial Pharmacy. 3ª ed: Lea & Febiger; 1987.
59. Khan AY, Talegaonkar S, Iqbal Z, Ahmed FJ, Khar RK. Multiple emulsions: an overview. *Curr Drug Deliv.* 2006;3(4):429-43.
60. Bonnet M, Cansell M, Placin F, Monteil J, Anton M, Leal-Calderon F. Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2010;78(1):44-52.
61. Bonnet M, Cansell M, Placin F, David-Briand E, Anton M, Leal-Calderon F. Influence of ionic complexation on release rate profiles from multiple water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions. *J Agric Food Chem.* 2010;58(13):7762-9.
62. Sedlarik KM, Vacik J, Wichterle O, Hajek M. [Modern dressings. Hydrogels]. *Rozhl Chir.* 1995;74(1):3-7.

63. Ghasemiyeh P, Mohammadi Samani S. Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons (Review Article). 2019;5:7-24.
64. Eiras F. Desenvolvimento, caracterização e avaliação da biocompatibilidade e do potencial irritativo de formulações cosméticas à base de nanopartículas lipídicas [Dissertação de Mestrado]: FFUP; 2016.
65. Amaral MHAR. Estudo do naproxeno em formas de aplicação cutânea [Dissertação de Mestrado]: FFUP; 1997.
66. Santos PSdS. Desenvolvimento e Caracterização de Microemulsões e Microemulgeles contendo Ibuprofeno [Dissertação de Mestrado]: FFUP; 2015.
67. Mota CIP. Preparações semissólidas cutâneas obtidas a partir de microemulsões contendo hidroquinona [Dissertação de Mestrado]: FFUP; 2018.
68. Wine IOoVa. Determination of chromatic characteristics according to CIELab. Compendium of International Analysis of Methods - OIV Chromatic Characteristics 2006.
69. Konica Minolta Sensing Americas I. Controle de cor da indústria de cuidados pessoais: Medição e Análise da cor da pele [Available from: <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/controle-de-cor-da-industria-de-cuidados-pessoais-medicao-e-analise-de-cor-da-pele/>].
70. Ali SM, Yosipovitch G. Skin pH: from basic science to basic skin care. Acta dermatovenereologica. 2013;93(3):261-7.
71. Yosipovitch G, Maibach HI. [Significance of skin surface pH]. Harefuah. 1996;130(7):478-80.
72. Schmid-Wendtner MH, Korting HC. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. Skin Pharmacol Physiol. 2006;19(6):296-302.
73. Power G, Moore Z, O'Connor T. Measurement of pH, exudate composition and temperature in wound healing: a systematic review. J Wound Care. 2017;26(7):381-97.
74. Pu SZ, Zhang WH, Shi B. EFFECT OF pH ON STRUCTURE AND STABILITY OF COLLAGEN-LIKE PEPTIDE: INSIGHT FROM MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION. J Theor Comput Chem. 2011;10(2):245-59.
75. Oliveira ÂZMd. Desenvolvimento de Formulações Cosméticas com Ácido Hialurônico [Dissertação]: FFUP; 2009.
76. Isaac V, Cefali L, Chiari B, Oliveira C, Salgado H, Corrêa M. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009;29.
77. Krambeck K. Desenvolvimento de Preparações Cosméticas contendo Vitamina C [Dissertação]: FFUP; 2009.

78. Silva JAd, Santana DPd, Bedor DGC, Borba VFdC, Lira AAM, Egito ESTd. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. *Química Nova*. 2009;32(6):1389-93.
79. Costa CK, Oliveira AB, Zanin SMW, Miguel MD. UM ESTUDO DA PELE SECA: PRODUTOS EMULSIONADOS PARA SEU TRATAMENTO E BUSCA DE SENSORIAL AGRADÁVEL. *Visão Acadêmica*. 2004.
80. Pinto F, Meo M. Design and Manufacturing of a Novel Shear Thickening Fluid Composite (STFC) with Enhanced out-of-Plane Properties and Damage Suppression. *Applied Composite Materials*. 2017;24(3):643-60.
81. Lee C, Moturi V, Lee Y. Thixotropic Property in Pharmaceutical Formulations. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2009;136:88-98.
82. Dewar RJ, Joyce MJ. The thixotropic and rheopectic behaviour of maize starch and maltodextrin thickeners used in dysphagia therapy. *Carbohydrate Polymers*. 2006;65:296-305.
83. Lee CM, Jin SP, Doh EJ, Lee DH, Chung JH. Regional Variation of Human Skin Surface Temperature. *Annals of dermatology*. 2019;31(3):349-52.
84. Jackman RL, Stanley DW. Perspectives in the Textural Evaluation of Plant Foods. *Trends Food Sci Tech*. 1995;6(6):187-94.
85. Tichota DM, Silva AC, Sousa Lobo JM, Amaral MH. Design, characterization, and clinical evaluation of argan oil nanostructured lipid carriers to improve skin hydration. *International journal of nanomedicine*. 2014;9:3855-64.
86. Garg A, Aggarwal D, Garg S, Singla AK. Spreading of semisolid formulations: An update. *Pharmaceutical Technology North America*. 2002;26:84-105.
87. Deveda P, Jain A, Vyas N, Khambete H, Jain SK, editors. GELLIFIED EMULSION FOR SUSTAIN DELIVERY OF ITRACONAZOLE FOR TOPICAL FUNGAL DISEASES2010.
88. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
89. Inc. TS. Thermo Scientific Pierce Protein Assay Technical Handbook. 2 ed2010.
90. Gomes JdP. Desenvolvimento das formulações de hidrogel à base de colágeno extraído de pele de tilápia (*Oreochromis niloticus*). Fortaleza: Universidade Federal do Ceará Faculdade de Medicina; 2021.
91. Patel NA, Patel NJ, Patel RP. Comparative development and evaluation of topical gel and cream formulations of psoralen. *Drug Discov Ther*. 2009;3(5):234-42.

92. Rafiee-Tehrani M, Mehramizi A. In vitro release studies of piroxicam from oil-in-water creams and hydroalcoholic gel topical formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000;26(4):409-14.
93. Kamal NS, Krishnaiah YSR, Xu X, Zidan AS, Raney S, Cruz CN, et al. Identification of critical formulation parameters affecting the in vitro release, permeation, and rheological properties of the acyclovir topical cream. *Int J Pharm.* 2020;590:119914.
94. Danila E, Kaya DA, Ghica MV, Kaya MGA, Negrea C, Popa L, et al. Rheological Properties and Stability of Dermatocosmetic Emulsions with Collagen and Natural Ingredients Used as Color Correcting Cream and Cream Foundation. *Rev Chim-Bucharest.* 2019;70(6):1928-33.
95. Ousey K, Cutting KF, Rogers AA, Rippon MG. The importance of hydration in wound healing: reinvigorating the clinical perspective. *J Wound Care.* 2016;25(3):122, 4-30.
96. Mathew-Steiner SS, Roy S, Sen CK. Collagen in Wound Healing. *Bioengineering (Basel).* 2021;8(5).
97. Hernández-Rangel A, Martín-Martínez ES. Collagen based electrospun materials for skin wounds treatment. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2021;109(9):1751-64.
98. Sionkowska A, Skrzynski S, Smiechowski K, Kolodziejczak A. The review of versatile application of collagen. *Polym Advan Technol.* 2017;28(1):4-9.
99. Jales STL, Barbosa RdM, de Albuquerque AC, Duarte LHV, da Silva GR, Meirelles LMA, et al. Development and Characterization of Aloe vera Mucilaginous-Based Hydrogels for Psoriasis Treatment. *Journal of Composites Science.* 2022;6(8):231.