

MESTRADO EM TECNOLOGIA FARMACÊUTICA

Desenvolvimento de formulações contendo ácido hialurónico e colagénio para regeneração cutânea

Ana Sofia da Silva Soares

M

2024





Ana Sofia da Silva Soares

Desenvolvimento de formulações contendo ácido hialurónico e colagénio para regeneração cutânea

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

Trabalho realizado sob a orientação da Prof.^a Doutora Helena Amaral e
coorientação do Prof. Doutor Delfim Santos

Julho 2024

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

Agradecimentos

A realização desta dissertação foi um percurso repleto de desafios e aprendizagens, que não teria sido possível sem o apoio e colaboração de várias pessoas, às quais gostaria de fazer um agradecimento especial:

Em primeiro lugar, gostaria de expressar a minha sincera gratidão à minha orientadora, Prof.^a Doutora Helena Amaral, por toda a disponibilidade, dedicação, bondade, ajuda e partilha de conhecimentos.

Ao meu coorientador Prof. Doutor Delfim Santos, agradeço por todo o incentivo e confiança depositada para a realização deste trabalho.

Agradeço ainda a todos os outros professores que me transmitiram os seus conhecimentos e contribuíram para a minha formação neste Mestrado em Tecnologia Farmacêutica.

Aos meus pais e familiares, obrigada por todo o carinho, apoio incondicional, confiança e paciência ao longo deste percurso académico.

A todos os meus amigos, muito obrigada pelas palavras de incentivo e pelas distrações necessárias que me ajudaram a aliviar o *stress* ao longo deste ano.

Ao Joel, agradeço por toda a disponibilidade, simpatia e ajuda dispensada ao longo da realização prática deste trabalho.

O meu sincero agradecimento e reconhecimento a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a execução deste trabalho, que agora concluo com imenso orgulho e gratidão.

Resumo

O ácido hialurônico (AH) e o colagénio (COL) são dois polímeros presentes na matriz extracelular da derme, bastante utilizados na indústria farmacêutica e cosmética.

Na cicatrização de feridas estes componentes têm um papel fundamental, fornecendo suporte estrutural, facilitando a regeneração celular e promovendo um ambiente húmido que conduz a uma recuperação eficaz da pele. No entanto, ainda existem poucas formulações que combinam estes dois polímeros.

O objetivo principal deste trabalho foi preparar e caracterizar diferentes formulações contendo AH e COL, destinadas à regeneração da pele. Assim, este trabalho foi dividido em 3 partes: na primeira parte desenvolveram-se cremes hidrófilos com quantidades diferentes de AH e COL e avaliaram-se as respetivas características físico-químicas e mecânicas ao longo de 90 dias; na segunda parte desenvolveram-se emulsões múltiplas (A/O/A) com COL na fase aquosa mais interna e gelificadas com o AH (2,5% e 5%), cujas características também foram avaliadas durante 90 dias; na terceira etapa prepararam-se películas com AH e COL separadamente e em combinação, tendo sido também avaliadas as propriedades físico-químicas e mecânicas das mesmas.

Neste trabalho foi demonstrado que os dois polímeros em combinação permitiram obter diferentes formulações com características físicas, químicas e mecânicas adequadas para aplicação em pele lesionada. No entanto, para comprovar a capacidade de regeneração cutânea seria necessário prosseguir com ensaios em linhas celulares e, posteriormente, com testes clínicos para comprovar a eficácia dos produtos desenvolvidos.

Palavras-chave: Ácido hialurónico, colagénio, regeneração cutânea, formulações tópicas

Abstract

Hyaluronic acid (HA) and collagen (COL) are two polymers present in the extracellular matrix of the dermis, widely used in the pharmaceutical and cosmetic industries.

These components play a fundamental role in wound healing, providing structural support, facilitating cell regeneration, and promoting a moist environment that leads to effective skin recovery. However, few formulations still combine these two polymers.

The significance of this research lies in the preparation and characterization of different formulations containing HA and COL, specifically designed for skin regeneration. This work was divided into 3 parts: the first part focused on the development of hydrophilic creams with varying amounts of HA and COL, with their respective physicochemical and mechanical characteristics evaluated over 90 days; the second part involved the development of multiple emulsions (W/O/W) gelled with HA (2.5% and 5%) and with COL in the innermost aqueous phase, also evaluated for 90 days; and the third part was dedicated to the preparation and evaluation of films with HA and COL, both separately and in combination.

This research has demonstrated the potential of the combination of HA and COL in creating formulations with physical, chemical, and mechanical characteristics suitable for application in damage skin. However, to fully demonstrate the potential of these formulations in skin regeneration, further tests on cell lines and subsequent clinical trials will be necessary to prove their effectiveness.

Key words: Hyaluronic acid, collagen, skin regeneration, topical formulations

Índice

1. Introdução	1
1.1 A pele humana.....	1
1.2 Colagénio.....	3
1.2.1 Tipos de colagénio	3
1.2.2 Caracterização do colagénio	4
1.2.3 Obtenção do colagénio.....	6
1.3 Ácido Hialurónico	7
1.3.1 Tipos de ácido hialurónico	8
1.3.2 Caracterização do ácido hialurónico	9
1.3.3 Obtenção do ácido hialurónico	9
1.4 Regeneração cutânea	10
1.5 Objetivos.....	13
2. Material e Métodos	14
2.1 Matérias-primas e Equipamento	14
2.2 Cremes	16
2.2.1 Preparação dos cremes	17
2.2.2 Caracterização dos cremes.....	18
2.2.2.1 Determinação do pH.....	18
2.2.2.2 Análise da cor	19
2.2.2.3 Ensaio reológico	21
2.2.2.4 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação	24
2.2.2.5 Avaliação da textura	25
2.2.2.6 Análise da espalhabilidade	27
2.2.2.7 Análise estatística	28
2.3 Emulsões gelificadas	28
2.3.1 Preparação das emulsões gelificadas	29
2.3.2 Caracterização das emulsões múltiplas gelificadas	31
2.3.2.1 Medição do tamanho das gotículas	31
2.3.2.2 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação	32
2.3.2.3 Determinação do pH.....	32
2.3.2.4 Análise da cor	33
2.3.2.5 Ensaio reológico	33

2.3.2.6	Análise da textura	33
2.3.2.7	Análise da espalhabilidade	34
2.3.2.8	Análise estatística	34
2.4	Películas	34
2.4.1	Preparação das películas	36
2.4.2	Caracterização das películas	39
2.4.2.1	Determinação do pH.....	39
2.4.2.2	Ensaio reológico	39
2.4.2.3	Avaliação da extensibilidade	39
2.4.2.4	Determinação da uniformidade de massa	40
2.4.2.5	Determinação da espessura	41
2.4.2.6	Determinação do teor de humidade	41
2.4.2.7	Determinação da resistência à dobragem	42
2.4.2.8	Determinação da perda de água por evaporação	42
2.4.2.9	Análise estatística	43
3.	Resultados e discussão.....	44
3.1	Caracterização dos cremes	44
3.1.1	Determinação do pH.....	44
3.1.2	Análise da cor	45
3.1.3	Ensaio reológico	47
3.1.4	Ensaio estabilidade acelerada por centrifugação	49
3.1.5	Avaliação da textura	49
3.1.6	Análise da espalhabilidade	52
3.2	Preparação das emulsões múltiplas gelificadas	54
3.3	Caracterização das emulsões múltiplas gelificadas	55
3.3.1	Medição do tamanho das gotículas	55
3.3.2	Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação	55
3.3.3	Determinação do pH.....	56
3.3.4	Análise da cor	57
3.3.5	Ensaio reológico	59
3.3.6	Análise da textura	60
3.3.7	Análise da espalhabilidade	62
3.4	Preparação das películas	64
3.5	Caracterização das películas	66
3.5.1	Determinação do pH.....	66

3.5.2 Ensaio reológico	67
3.5.3 Avaliação da extensibilidade	67
3.5.4 Ensaio de uniformidade de massa	69
3.5.5 Avaliação da espessura.....	70
3.5.6 Medição do teor de humidade	70
3.5.7 Ensaio resistência à dobragem	71
3.5.8 Perda de água por evaporação.....	72
4. Conclusão.....	73
5. Bibliografia	74
6. Anexos	81

Índice de Figuras

Figura 1. Camadas da pele.	1
Figura 2. Sequência de aminoácidos, moléculas e fibras de colagénio.	5
Figura 3. Formação de colagénio hidrolisado.	6
Figura 4. Estrutura química do ácido hialurónico.	7
Figura 5. Presença de ácido hialurónico, elastina e colagénio na pele jovem e envelhecida.	8
Figura 6. Fases da cicatrização de feridas.	11
Figura 7. Representação do método utilizado para a produção dos cremes.	18
Figura 8. Potenciómetro HANNA instruments 2211.	19
Figura 9. Espaço cromático $L^* a^* b^*$	20
Figura 10. Colorímetro Konica Minolta Chroma Meter 400 e software SpectraMagic NX.	21
Figura 11. Representação gráfica da tensão de corte (τ) em função da velocidade de corte ($\dot{\gamma}$) para alguns comportamentos reológicos.	22
Figura 12. Fluidos tixotrópicos e reopéticos.	23
Figura 13. Viscosímetro Thermo Kaake VT-550.	24
Figura 14. Centrífuga Eppendorf AG 5804.	25
Figura 15. Representação do gráfico da força versus tempo.	26
Figura 16. Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i e sonda Lap Perspex 25 mm.	27
Figura 17. Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i e sonda TTC Spreadability Rig (HDP/SR).	28
Figura 18. Representação de emulsões simples e emulsões múltiplas.	29
Figura 19. Representação do método utilizado para produzir a emulsão múltipla gelificada.	31
Figura 20. Mastersizer 3000, Malvern.	32
Figura 21. Representação do método de evaporação do solvente utilizado na preparação das películas de HPMC.	38
Figura 22. Texturómetro Stable Micro Systems TA-XT2i e software Texture Exponent.	40
Figura 23. Balança analítica Mettler Toledo.	40
Figura 24. Craveira digital Parkside ®.	41
Figura 25. Balança de determinação do teor da humidade Gravimetra AD-4713.	42
Figura 26. Tewameter TM 210.	43
Figura 27. Resultados do pH das formulações 4A e 5A ao longo de 90 dias.	44
Figura 28. Gráfico da variação do parâmetro Chroma em função do tempo para as formulações 4A e 5A.	46

Figura 29. Aspeto das formulações 4A e 5A.	46
Figura 30. Reogramas das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura de 20°C.....	47
Figura 31. Reogramas da formulação 4A ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.	48
Figura 32. Reogramas da formulação 5A ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.	48
Figura 33. Estabilidade acelerada por centrifugação das formulações 4A e 5A.	49
Figura 34. Gráfico da força máxima em função da distância para a formulação 5A.	49
Figura 35. Firmeza das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura ambiente.....	50
Figura 36. Adesividade das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura ambiente.	50
Figura 37. Firmeza das formulações 4A e 5A, ao longo de 90 dias, à temperatura ambiente.	51
Figura 38. Adesividade das formulações 4A e 5A, ao longo de 90 dias, à temperatura ambiente.	51
Figura 39. Representação gráfica da espalhabilidade da formulação 5A.	52
Figura 40. Espalhabilidade das formulações 4A e 5A, à temperatura ambiente.	53
Figura 41. Estabilidade acelerada por centrifugação das formulações 8B e 9B.	56
Figura 42. Resultados do pH das emulsões gelificadas 8B e 9B, ao longo de 90 dias.	56
Figura 43. Gráfico da variação do parâmetro Chroma em função do tempo para as formulações 8B e 9B.	58
Figura 44. Aspeto das formulações 8B e 9B.	58
Figura 45. Reogramas da formulação 8B ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.	59
Figura 46. Reogramas da formulação 9B ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.	59
Figura 47. Gráfico da força máxima em função da distância para a formulação 9B.	60
Figura 48. Adesividade da formulação 9B.....	61
Figura 49. Firmeza das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.	61
Figura 50. Adesividade das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.	61
Figura 51. Espalhabilidade das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.	63
Figura 52. Película obtida a partir da dispersão do colagénio em água e glicerina.	64
Figura 53. Películas de COL disperso em solução de alginato de sódio.	64
Figura 54. Películas de HEC.	65
Figura 55. Películas de HPMC (3F), HPMC+AH (6F), HPMC + COL (7F), HPMC + COL + AH (8F) e dupla camada (9F).....	65
Figura 56. Resultados do pH das dispersões de HPMC.	66
Figura 57. Reogramas das dispersões de HPMC.....	67
Figura 58. Extensibilidade das películas.	68
Figura 59. Extensibilidade das películas.	68
Figura 60. Massa das películas.	69
Figura 61. Espessura das películas.	70

Figura 62. Teor de humidade das películas.	71
Figura 63. Películas 6F após teste de resistência à dobragem.	71
Figura 64. Perda de água por evaporação ao longo do tempo, à temperatura ambiente.	72
Figura 65. Diferença entre a PAE final e inicial das películas.	72

Índice de Tabelas

Tabela 1. Tipos de colagénio e descrição (8).	4
Tabela 2. Matérias-primas utilizadas no trabalho experimental.	14
Tabela 3. Equipamentos utilizados no trabalho experimental.	15
Tabela 4. Composição dos cremes (% , m/m).	17
Tabela 5. Composição das emulsões múltiplas (% , m/m).	30
Tabela 6. Composição das películas de colagénio (% , m/m).	36
Tabela 7. Composição das películas de alginato de sódio, colagénio e ácido hialurónico (% , m/m).	36
Tabela 8. Composição das películas com HEC e colagénio (% , m/m).	37
Tabela 9. Composição das películas com HPMC, colagénio e ácido hialurónico (% , m/m).	37
Tabela 10. Composição da película dupla com HPMC, colagénio e ácido hialurónico (% , m/m).	38
Tabela 11. Resultados de pH para as formulações 1A, 2A e 3A.	44
Tabela 12. Luminosidade das formulações 4A e 5A ao longo de 3 meses. Os resultados dizem respeito à média de 3 medições $\pm$ desvio padrão.	45
Tabela 13. Tamanho das gotículas das formulações 8B e 9B (apresentados sob a forma de percentis médios e dos respetivos coeficientes de variação) e valor de Span.	55
Tabela 14. Luminosidade das formulações 8B e 9B. Os resultados correspondem à média de três medições $\pm$ desvio padrão.	57

Lista de Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

AGE- Ácidos gordos essenciais
A/O – Água / Óleo
A/O/A – Água / Óleo / Água
AH – Ácido hialurónico
CH – Colagénio hidrolisado
CIE – *Commission internationale de l'Eclairage*
COL – Colagénio
CV – Coeficiente de variação
Da – Dalton
FA – Fase aquosa
FO – Fase oleosa
FDA – *Food and Drug Administration*
GRAS – *Generally recognized as safe*
h – Hora
HEC - Hidroxietilcelulose
HPMC – Hidroxipropilmetilcelulose
kDa – KiloDalton
min - Minuto
mm – Milímetro
N - Newton
nm - Nanómetro
O/A – Óleo / Água
O/A/O – Óleo / Água/ Óleo
Pa - Pascal
PAE – Perda de água por evaporação
pH – Potencial hidrogeniónico
q.b.p - Quanto baste para
rpm – Rotação por minuto
s - Segundo
TEA - Trietanolamina
 α - Alfa
°C – Graus Celsius
 μm - Micrómetros
% (m/m) – Percentagem em massa

1. Introdução

1.1 A pele humana

A pele constitui o maior e mais complexo órgão do corpo humano, possuindo uma área entre 1,5-2 m² a qual corresponde a aproximadamente 16% do peso total do corpo de um adulto (1). A espessura da pele varia, principalmente, com a região do corpo. As plantas dos pés e as palmas das mãos apresentam cerca de 4 mm de espessura, enquanto nas pálpebras e na região pós-auricular a espessura é mais fina sendo, aproximadamente, 0,5 mm (2).

No estado normal, a pele possui um pH (potencial hidrogeniônico) entre 4 e 6,5, o qual permite garantir a coesão e integralidade tecidual. É neste intervalo de pH que a pele é menos permeável à água e a outros produtos polares, tornando-se menos propensa à ação de microrganismos patogênicos (3).

A pele apresenta diversas funções, sendo a mais importante a função de barreira contra agentes do meio ambiente como, por exemplo, microrganismos, substâncias químicas e radiação ultravioleta. Além da função de barreira, a pele desempenha um papel essencial como órgão sensorial (a pele contém diversos recetores da temperatura, dor, toque e pressão), na termorregulação (as glândulas sudoríparas permitem regular a temperatura do corpo e manter a homeostasia) e no metabolismo (na hipoderme está presente tecido adiposo que produz vitamina D e armazena os lípidos) (4).

A pele é constituída por três camadas, a epiderme, a derme e a hipoderme representadas na Figura 1.

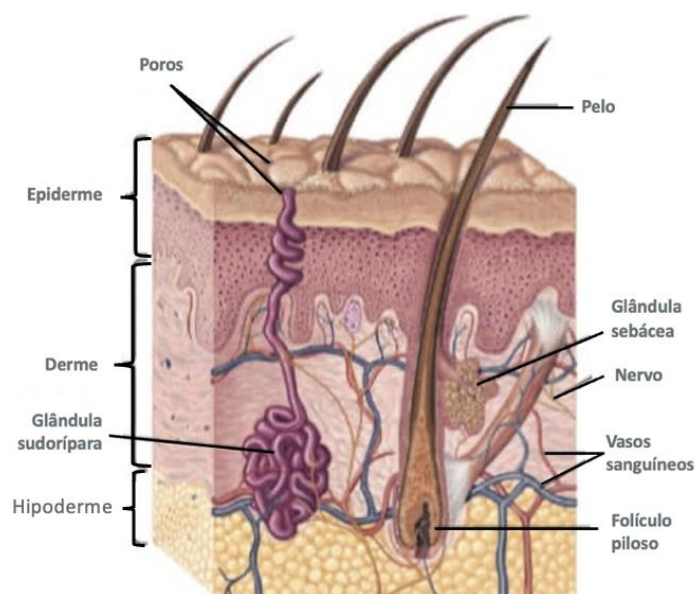


Figura 1. Camadas da pele.
Adaptada de (5)

Na epiderme, camada mais fina e superficial, encontram-se, maioritariamente, queratinócitos que são as células responsáveis pela produção da queratina, uma proteína insolúvel em água que confere rigidez à camada. Para além dos queratinócitos existem outras células presentes nesta camada: os melanócitos, responsáveis por produzir e distribuir a melanina (pigmento principal da pele que absorve a radiação ultravioleta); as células de *Langerhans*, importantes para ativar o sistema imunitário e as células de *Merkel* que apresentam uma função sensorial. A epiderme é constituída por cinco estratos (basal, espinhoso, granuloso, lúcido e córneo) dos quais se deve realçar o estrato córneo, que é considerado a maior barreira protetora física e química da pele, sendo o estrato mais exterior, composto por células mortas, corneócitos, que são constantemente renovadas por células presentes nas camadas inferiores. Na parte superior do estrato córneo existe o filme hidrolipídico que devido à sua acidez protege a pele de microrganismos externos. O estrato córneo é uma camada importante na hidratação da pele uma vez que tem uma elevada capacidade de retenção de água devido aos lípidos nele presentes e que regulam a perda transepidérmica da água (6).

A derme, que se encontra logo abaixo da epiderme, é composta essencialmente por fibroblastos, células responsáveis por produzir grandes quantidades de colagénio, ácido hialurónico e elastina que formam a matriz extracelular (6). O colagénio é responsável por manter a resistência da pele, o ácido hialurónico proporciona hidratação e viscosidade e a elastina elasticidade e flexibilidade (2). É nesta camada que também se encontram os vasos sanguíneos, as terminações nervosas e os anexos cutâneos. A derme divide-se em duas camadas de tecido conjuntivo, a camada papilar e a reticular. A camada superior e mais fina é a papilar, sendo composta por tecido conjuntivo laxo e regiões que permitem o contacto com a epiderme. A camada reticular é a mais profunda e espessa e apresenta na sua constituição tecido conjuntivo denso de fibras de colagénio (6). Enquanto a principal função da epiderme é a proteção contra agentes externos, a da derme é conferir elasticidade.

Abaixo da derme encontra-se a hipoderme que é responsável por unir a derme aos órgãos subjacentes, por exemplo aos tendões. É constituída por tecido adiposo (gordura) e tecido conjuntivo e tem como principais funções armazenar energia, regular a temperatura corporal e proteger os órgãos vitais (6).

Apesar da pele constituir uma barreira, vários medicamentos são aplicados por via cutânea para exercerem efeitos locais ou sistémicos. A ação local destina-se geralmente ao tratamento de distúrbios superficiais (eczemas, psoríase etc.), infeções, pele seca e lesionada, entre outros (7). Os fármacos administrados por esta via poderão ser veiculados sob a forma de cremes, soluções, géis, pós, etc. (7).

Sendo o objetivo deste trabalho o desenvolvimento de preparações para administração cutânea contendo colagénio e ácido hialurónico para a regeneração da pele, a seguir serão descritos em detalhe estes dois componentes da matriz dérmica.

1.2 Colagénio

O colagénio (COL) é uma proteína fibrosa e estrutural que compõe grande parte do tecido conjuntivo, especialmente tendões, ossos, articulações e pele (8). É encontrado também nos dentes, vasos sanguíneos e na córnea (8). A pele humana contém, na derme, cerca de 70% de colagénio (2). No reino animal o colagénio é a principal proteína estrutural, constituindo cerca de 30% do teor proteico total, nomeadamente em mamíferos (9).

A característica mais importante do colagénio consiste na formação de fibras insolúveis, com força elástica elevada, antigenicidade reduzida e capacidade de hidratação e reabsorção (10).

O colagénio, com o aumento da idade, torna-se mais rígido e ocorre perda de moléculas de água, o que dificulta a difusão de nutrientes para os tecidos, diminuindo a capacidade de regeneração celular (11). Devido à sua biodegradabilidade, elevada biocompatibilidade e ausência de toxicidade, é bastante utilizado na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (10).

1.2.1 Tipos de colagénio

Existem 29 tipos de colagénio que se diferenciam, por exemplo, na composição de aminoácidos, na estrutura molecular e no comprimento. As diferenças na expressão de genes envolvidos na biossíntese do colagénio e as alterações pós-tradução também influenciam a diversidade de colagénios (10).

Os colagénios dos tipos I, II e III são os mais abundantes, estando envolvidos, maioritariamente, na elasticidade, resistência tecidual, capacidade de retenção de água e integridade mecânica (10).

Na pele, estão presentes colagénios dos tipos I, III, IV, V, VI e VII descritos na Tabela 1.

As formas de colagénio ainda se podem subdividir em subfamílias tendo em consideração a sua estrutura supramolecular. Assim podemos ter: colagénio formador de fibrila (por exemplo, tipos I, II, III e V); colagénio da membrana basal (por exemplo, tipos IV e VII); colagénio microfibrilar (por exemplo, tipo VI); colagénio formador de rede (por exemplo, tipo X); colagénio associado à fibrila (por exemplo, tipos IX e XII) e colagénio transmembrana (por exemplo, tipos XIII e XVII) (9).

Tabela 1. Tipos de colagénio e respetiva descrição (8).

Tipo de colagénio	Localização	Descrição
I	Derme Cartilagens Ossos Dentes	Colagénio mais abundante na pele e mais importante em termos de estrutura para a derme por ser o mais resistente à tensão. É sintetizado pelos fibroblastos e apresenta estrutura fibrilar que possui duas cadeias α -1 idênticas e uma cadeia α -2 diferente.
III	Derme (ao redor dos nervos e vasos sanguíneos)	Apresenta estrutura fibrilar constituída por três cadeias α -1 idênticas e é rico em hidroxiprolina e cistina, incomum nos outros tipos de colagénio.
IV e VII	Membrana basal	Mantêm a integridade da membrana basal garantindo a sua funcionalidade e a adequada nutrição das células dessa camada. Possuem uma cadeia estendida e interrompida.
V	Pele	Apresenta estrutura fibrilar sendo necessário para a fibrilação do colágeno tipo I e III e, conseqüentemente, para a formação fibrilar ideal e qualidade do tecido.
VI	Regiões próximas à membrana basal, aos nervos e aos folículos.	Estrutura ramificada e cadeias curtas. Compõe uma rede fina dispersa nos interstícios das fibras grandes de colagénio.

1.2.2 Caracterização do colagénio

A molécula de colagénio consiste numa tripla hélice (estrutura terciária) formada por três cadeias polipeptídicas alfa (α) paralelas (estrutura secundária). As cadeias α podem ser idênticas formando homotrímeros, ou diferentes, originando heterotrímeros. Cada cadeia α possui, aproximadamente, 1000 aminoácidos principalmente prolina, glicina e hidroxiprolina (Figura 2) (10). A sequência de aminoácidos repetida (estrutura primária) é expressa como Gly-X-Y, sendo Gly a glicina, que ocupa o eixo central, e X e Y a prolina e hidroxiprolina, respetivamente. A cadeia lateral de glicina apresenta um átomo de hidrogénio que minimiza o impedimento estérico dentro das cadeias α . A tripla hélice é estabilizada pelas ligações intramoleculares de hidrogénio que se estabelecem entre o grupo amina secundário (-NH) de uma glicina e o grupo carbonilo (C=O) da glicina da

cadeia polipeptídica adjacente (9). Também a prolina e a hidroxiprolina, por serem de natureza alicíclica, estabilizam a molécula de colagénio e endurecem a cadeia α , impedindo a rotação em torno da ligação C-N (12).

A tripla hélice possui uma massa molecular de, aproximadamente, 300 kDa, um comprimento de 280 nm e um diâmetro de 1,4 nm (12).

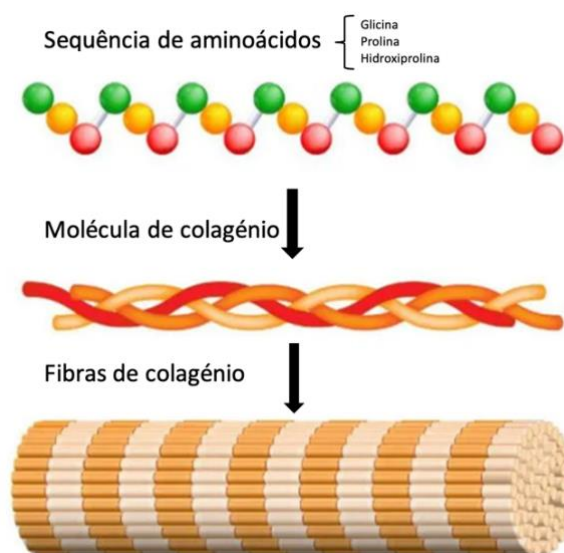


Figura 2. Sequência de aminoácidos, moléculas e fibras de colagénio.

Adaptada de (13)

Uma vez que o colagénio possui uma massa molecular muito elevada, na indústria cosmética é comum recorrer-se ao colagénio hidrolisado (CH).

O CH consiste em peptídeos de baixa massa molecular (entre 3 e 6 kDa) obtidos através de hidrólise química ou enzimática (por ação de enzimas proteolíticas), em meio alcalino ou ácido e a temperatura adequada (14).

Após a desnaturação (Figura 3), a tripla hélice do colágeno nativo altera-se para uma forma de bobina aleatória uma vez que as ligações de hidrogénio se dissociam quando o colagénio sofre hidrólise. As características do colagénio nativo e do CH são diferentes. A viscosidade do CH devido à baixa massa molecular dos peptídeos, é muito mais baixa do que a do colagénio nativo que possui maior viscosidade devido à repulsão eletrostática entre as cadeias moleculares. O CH é muito solúvel em água, mas não forma filmes por si, sendo necessário combiná-lo com outros biopolímeros, enquanto o colagénio nativo tem elevada versatilidade para formar filmes (14). Devido à baixa massa molecular os peptídeos provenientes do CH são facilmente absorvido para a corrente sanguínea e distribuídos no corpo humano, sobretudo pela derme, onde se mantêm por 14 dias (15).

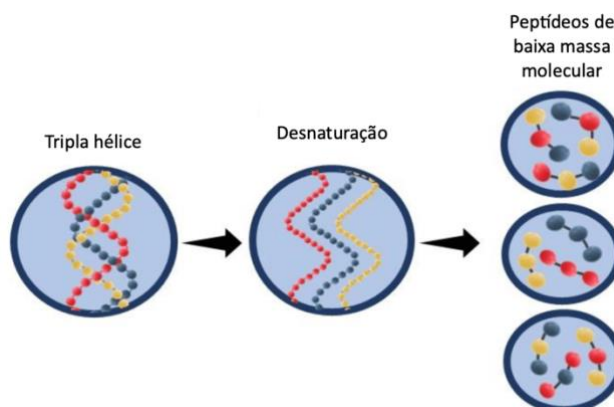


Figura 3. Formação de colagénio hidrolisado.

Adaptada de (11)

1.2.3 Obtenção do colagénio

Os produtos baseados em colagénio e o colagénio disponível atualmente, derivam de animais terrestres como bovinos e suínos e de animais marinhos como medusas, esponjas e peixes. Contudo, têm sido exploradas diferentes alternativas como o colagénio recombinante devido a problemas na origem (como contaminação patogénica) e na aceitação do colagénio proveniente de animais (9).

O colagénio derivado de animais terrestres possui baixo custo, é de fácil acesso e biocompatível, no entanto, como desvantagens existe a possibilidade de transmissão de doenças, variabilidade entre lotes e o seu uso prolongado pode gerar reações alérgicas (16). O colagénio que provém de animais marinhos é uma matéria-prima considerada como GRAS (*Generally recognized as safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), é de baixo custo, não apresenta risco de transmissão de doenças e a resposta inflamatória é reduzida (16). Além disso, é compatível metabolicamente e devido à sua massa molecular reduzida tem maior absorção (16). Como desvantagens temos o rendimento que se obtém que, comparado com outras origens, é mais baixo, o processo de extração demorado, complexo e de elevado custo e a baixa estabilidade térmica (16).

De origem sintética temos a tecnologia recombinante que permite obter colagénio de tipos menos comuns e não causa inflamação (17). Contudo, o rendimento é baixo, o custo é elevado e a falta de cofatores e enzimas no sistema complica a formação estável de colagénio bioativo e biofuncional (16).

1.3 Ácido Hialurónico

O ácido hialurónico (AH), cuja fórmula molecular é $(C_{14}H_{21}NO_{11})_n$, é um polissacarídeo linear não ramificado, de cadeia longa e de elevada massa molecular. É formado por dois açúcares alternados e ligados por uma ligação glicosídica: o ácido D-glucurónico e a N-acetilglucosamina (Figura 4) (18).

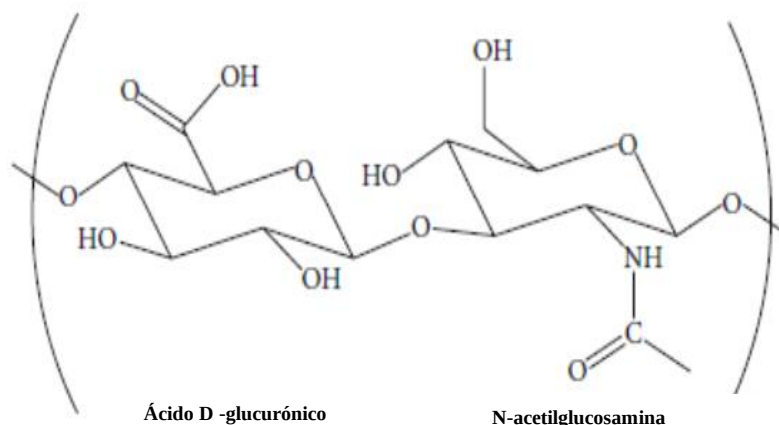


Figura 4. Estrutura química do ácido hialurónico.

O AH pertence à família dos glicosaminoglicanos sendo o único não sulfatado, isto é, não forma ligação covalente com proteínas (18).

É produzido de forma natural no organismo humano, especialmente no líquido sinovial que abrange as articulações, cartilagens e tecidos da pele e do olho (18). A pele humana contém cerca de 7-8 g de ácido hialurónico, o qual se encontra maioritariamente na derme (19).

O AH ajuda na retenção de colagénio e elastina uma vez que é encontrado na periferia e nas interfaces das fibras de colagénio e elastina. Assim, quando a pele é jovem contém muito AH que ao preencher os espaços entre as células e ao atrair água vai torná-la lisa, elástica e hidratada (20).

No entanto, à medida que vamos envelhecendo, as ligações com o AH não estão presentes, o que pode contribuir para a desorganização das fibras de colagénio e elastina e assim, a quantidade de ácido hialurónico, produzida naturalmente, vai diminuindo bem como a hidratação e a elasticidade da pele, levando ao aparecimento de rugas (Figura 5) (20).

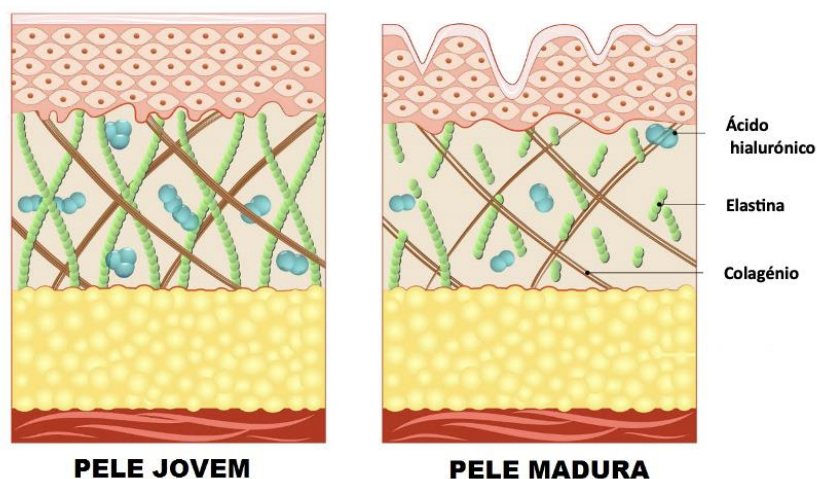


Figura 5. Presença de ácido hialurônico, elastina e colagénio na pele jovem e envelhecida.

Adaptada de (21)

1.3.1 Tipos de ácido hialurónico

Tendo em conta a massa molecular, podemos distinguir dois tipos de ácido hialurónico. O ácido hialurónico de alta massa molecular forma uma película protetora não oclusiva na superfície da pele, atuando apenas na epiderme. Facilita a diminuição da perda transepidérmica de água bem como a hidratação da pele (22). O elastómero de hialuronato de sódio e o hialuronato de sódio são exemplos deste tipo de AH que ajudam na proteção e hidratação da pele. O ácido hialurónico de baixa massa molecular apresenta maior poder de penetração, podendo atuar tanto na epiderme como na derme. Estimula os fibroblastos, o que promove a firmeza e a tonicidade da pele, suavizando as rugas e as linhas de expressão (22). O hialuronato de sódio hidrolisado e o ácido hialurónico hidrolisado são exemplos deste tipo de AH que garantem uma hidratação da pele mais interna.

Assim, quanto mais baixa a massa molecular, maior a profundidade com que o AH atua nas camadas da pele, ajudando a regular a rugosidade e oleosidade da pele e quanto maior a massa molecular, menor a profundidade com que atua, mas maior a hidratação e proteção da pele.

Uma vez que pode ter diferentes ações, alguns produtos têm na sua constituição diferentes tipos de ácido hialurónico (22).

1.3.2 Caracterização do ácido hialurónico

O ácido hialurónico apresenta um arranjo espacial anfifílico em dupla hélice, formado por oito grupos hidrófobos e por grupos hidrófilos (carboxilo e hidroxilo). O grupo hidroxilo (-OH) pode estabelecer pontes de hidrogénio com moléculas de água, o que faz com que o AH seja bastante hidrófilo e os tecidos sejam mais flexíveis (19).

Este arranjo espacial depende do pH, da massa molecular e da concentração no meio aquoso. Dependendo do pH pode variar entre uma forma espiral (a pH fisiológico) e uma forma helicoidal (a pH entre 2,5 e 4). A pH fisiológico, baixa massa molecular e concentrações inferiores a 1 mg/ml tendem a formar um arranjo mais rígido. Com massas moleculares intermédias ou altas, e concentrações iguais ou superiores a 1 mg/ml as cadeias sobrepõem-se e formam bobinas (19).

A estrutura do AH apresenta capacidade de reter água numa quantidade de aproximadamente mil vezes o seu peso, possuindo assim ótimas propriedades higroscópicas (20).

No líquido sinovial, a sua massa molecular média é de 3-4 milhões de Daltons (Da) alcançando, em 4 milhões de Da, mais de 10.000 unidades repetidas de dissacarídeos. Quando estendida, a molécula de ácido hialurónico pode alcançar um comprimento de aproximadamente 15 µm e um diâmetro de 0,5 nm (20).

O AH é viscoelástico, biocompatível, biodegradável e apresenta boa solubilidade em água. Para além disso, não é tóxico nem sensibilizante, o que permite o seu uso com segurança por todos os tipos de pele, pois as reações alérgicas descritas são raras (23).

É cada vez mais utilizado devido às suas propriedades anti-inflamatórias, imunomoduladoras, anticancerígenas e antiproliferativas, antienvhecimento, reparadoras da pele, cicatrizantes de feridas e regeneradoras tecidulares (20).

1.3.3 Obtenção do ácido hialurónico

Comercialmente, o ácido hialurónico pode ser isolado de fontes animais como o humor vítreo de bovino, a crista de galo, o cordão umbilical, entre outros, ou por fermentação de bactérias como o *Streptococcus equi* e o *Streptococcus zooepidemicus*, ou a partir de microrganismos geneticamente modificados como a *Escherichia coli* (23).

A primeira vez que se obteve AH com elevada pureza e massa molecular, foi a partir de uma extração de cordão umbilical e crista de galo, realizada por *Endre Balazs*, e foi muito utilizado em cirurgia oftálmica (24). Contudo, o ácido hialurónico de origem animal apesar de possuir elevada massa molecular e rendimento elevado, possui desvantagens tais como: o risco de contaminação, o que afeta a pureza; a disponibilidade do tecido

animal, que é limitada; o processo de purificação, que é extensivo; e a possibilidade de gerar impacto ambiental (25).

O ácido hialurónico obtido por fermentação de bactérias também possui elevado rendimento e massa molecular e para além disso, face ao obtido de fontes animais, apresenta outras vantagens tais como: evita o risco de infeção viral entre espécies, a purificação é mais eficaz, os custos de produção são reduzidos e os rendimentos são mais elevados (26). Relativamente às desvantagens também existe risco de contaminação durante a produção (possíveis endotoxinas bacterianas) e o uso de organismos geneticamente modificados que podem provocar alergias e poluição ambiental (25).

A produção de AH por bactérias recombinantes surge por questões de segurança quanto à patogenicidade das vias naturais. Assim, têm sido realizadas várias tentativas de obter AH com hospedeiros bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos, utilizando, por exemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis* e *Bacillus subtilis* (27).

1.4 Regeneração cutânea

A regeneração cutânea consiste no desenvolvimento embrionário da pele a fim de restabelecer a integridade de um tecido lesionado (28). A pele regenerada que cura como uma cicatriz, é mais fraca e apresenta a matriz extracelular mais desorganizada quando comparada com a pele intacta (28). A pele apresenta capacidade de se regenerar, como forma de cicatriz, de forma natural mas a sua regeneração através da engenharia de tecidos tem sido cada vez mais desenvolvida, no entanto, apesar da pele da engenharia de tecidos ser análoga da pele nativa, a falta de apêndices e nervos da pele que melhoram a cicatrização, integridade e vitalidade da pele, constituem uma desvantagem deste método não convencional de cicatrização de feridas (29).

As feridas consistem em lesões de tecido vivo que provocam uma descontinuidade do revestimento epitelial da pele ou das mucosas (30). São consideradas feridas não só as ruturas na pele, ou no tecido celular subcutâneo, mas também as lesões nos músculos, tendões e ossos, e as lesões superficiais que podem ser devido à atuação de agentes mecânicos ou térmicos, que provocam danos no tecido e na sua vascularização (31).

De acordo com o tempo de cicatrização existem dois tipos de feridas: agudas e crónicas. As feridas agudas como por exemplo as lesões decorrentes de acidentes, cortes, ou incisões cirúrgicas, ocorrem rapidamente possuindo uma cicatrização completa, sem complicações e a formação de cicatrizes é pequena. As feridas crónicas são caracterizadas por um processo de cicatrização mais lento sendo exemplos as úlceras de pressão, da perna e diabética (30). Enquanto as feridas agudas cicatrizam ao fim de 8 a 12 semanas, as feridas crónicas demoram mais tempo (29).

De acordo com a profundidade também se podem classificar as feridas em superficial e profunda. A ferida superficial é aquela que afeta a epiderme e a derme. Já a ferida profunda atinge a derme profunda, tecido adiposo, músculos, ossos e tendões (32).

A cicatrização de feridas consiste na substituição de um tecido lesado por um tecido conjuntivo vascularizado tendo início logo após uma lesão e sendo mais eficaz em ambiente húmido. Após a lesão e o sangramento ocorre de imediato a vasoconstrição que consiste na contração do músculo liso no endotélio e a agregação plaquetária, diminuindo a perda de sangue para o espaço extravascular e formando o coágulo que liberta fatores de crescimento (33). A cicatrização processa-se em três fases principais (Figura 6).

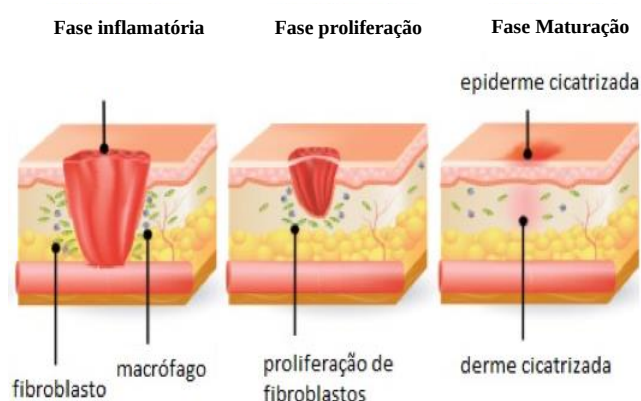


Figura 6. Fases da cicatrização de feridas.

Adaptada de (34)

A primeira fase da cicatrização é denominada fase inflamatória e é caracterizada por sintomas como calor, edema e eritema, consistindo na dilatação dos vasos, o que aumenta o fluxo sanguíneo, aumentando também a permeabilidade vascular, e na incorporação de leucócitos, nomeadamente neutrófilos e macrófagos, que têm um papel essencial no desbridamento da ferida e na promoção da incorporação e ativação de outras células importantes para as etapas seguintes. Os neutrófilos protegem a ferida de bactérias e, através da fagocitose, removem restos de bactérias e de tecido. Ao longo do tempo, os macrófagos, estimulados pela citocina excretada pelos neutrófilos, eliminam os neutrófilos por apoptose. Os macrófagos através da fagocitose e secreção de proteases também removem restos de bactérias e de tecido. Para além disso, os macrófagos produzem citocinas e fatores de crescimento que favorecem a incorporação e ativação celular, a síntese da matriz extracelular, a formação de fibroblastos, a síntese de colagénio e a neoformação de vasos sanguíneos na ferida (33).

A segunda fase é a fase proliferativa sendo caracterizada pela proliferação de fibroblastos, sob a ação de citocinas. Ao mesmo tempo, ocorre a migração de células

epiteliais (epitelização), o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogénese) e a infiltração de macrófagos, formando o tecido de granulação (35).

Por fim, na fase da maturação, a matriz de colagénio sofre, continuamente, reabsorção e deposição. A matriz inicial de colagénio da ferida é bastante frágil uma vez que possui 20% de colagénio tipo III e as fibras de colagénio são muito glicosiladas e finas. As collagenases e as proteases degradam as ligações peptídicas do colagénio e entre aminoácidos das proteínas, respetivamente, e o novo colagénio é depositado continuamente pelos fibroblastos. O novo colagénio possui fibras mais espessas, organizadas e resistentes (33).

O ácido hialurónico, por ser bastante higroscópico, contribui para um meio húmido favorável à cicatrização de feridas (31). O AH atua em todas as fases da cicatrização promovendo a proliferação de fibroblastos, a adesão ao local da ferida e a formação de colagénio e elastina (36). Assim, o AH é bastante comum em formulações tópicas para tratamento de feridas como queimaduras, abrasão, incisões pós-cirúrgicas e úlceras de pressão (37).

Silva et al. (36) verificaram os efeitos do tratamento tópico com ácido hialurónico 0,2% numa queimadura de segundo grau de um paciente de 64 anos. Primeiramente o tratamento foi feito com sulfadiazina de prata a 1%, contudo, após sete dias não houve melhoras tendo-se iniciado o tratamento então com AH. A aplicação de AH foi efetuada diariamente, tendo sido avaliado o tempo de cicatrização, a ausência ou presença de cicatrizes e o resultado estético do tratamento. Os resultados foram bastante positivos ocorrendo reepitelização completa depois de 14 dias de aplicação de AH e após 27 dias a cicatriz melhorou a nível de hiperpigmentação e não houve hipertrofia. Durante todo o tempo de tratamento não foi registado qualquer tipo de reações adversas locais ou sistémicas. Concluiu-se assim que o tratamento tópico com AH 0,2% em queimaduras permitiu uma cicatrização mais rápida e melhorou o resultado estético.

Num estudo realizado por *Ying et al.* (38) utilizou-se um hidrogel constituído por colagénio tipo I e ácido hialurónico como curativo, para avaliar a sua capacidade de promover uma cicatrização espontânea, rápida e eficiente. A estrutura porosa do hidrogel contribuiu para a retenção da água, trocas gasosas, e crescimento de células vasculares. No tratamento das feridas com o hidrogel de colagénio e ácido hialurónico, a cicatrização mostrou ser mais rápida e eficiente, concluindo-se que o hidrogel teve uma grande importância na promoção espontânea da formação da vasculatura, camada epitelial e fibras de colagénio.

Xiao et al. (39) desenvolveram um hidrogel com guanósina e colagénio recombinante de origem humana como adesivo médico a fim de verificar se este contribuía para acelerar o processo de cicatrização de feridas. O hidrogel obtido, devido à presença

de colagénio, era flexível e quando incluído na ferida favorecia a deposição adequada de colagénio o que permitia a incorporação de macrófagos e fibroblastos para o local da ferida, induzindo a proliferação e migração. A eficácia do hidrogel foi demonstrada através de ensaios *in vitro*, modelos de cicatrização *in vivo* em camundongos e análise histológica. Dadas as suas características, este gel flexível de colagénio e guanósina demonstrou elevado potencial como adesivo médico para a cicatrização de feridas e regeneração de tecidos *in vivo*.

1.5 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos principais:

- Desenvolver cremes hidrófilos, emulsões múltiplas (A/O/A) gelificadas e películas contendo ácido hialurónico e colagénio para a regeneração cutânea.
- Caracterizar e comparar os vários sistemas desenvolvidos.

2. Material e Métodos

2.1 Matérias-primas e Equipamento

Na realização experimental deste trabalho utilizaram-se as matérias-primas presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Matérias-primas utilizadas no trabalho experimental.

Matéria-prima	Lote	Origem
Ácido hialurônico	191197-J-1	Acofarma
Água purificada	-	LTF
Alginato de sódio	S22176	Protanal
Base PFC [®]	9127700011	Guinama
Carbopol [®] 940	221123-BO012814	Fagron
Colagénio hidrolisado em pó	R2111494	Farmalabor
Gel de hidroxietilcelulose	85476GH	LTF
Glicerina	225938-P-1	Acofarma
Hidroxipropilmetilcelulose	DTR563067	Colorcon
Kathon [®] CG	0073360	Guinama
Miglyol [®] 812	220495	Acofarma
Span [®] 80	215742-N-1	Acofarma
Trietanolamina	L20060137-OF- 241716	Fagron
Tween [®] 80	170972-P-1	Acofarma

Na tabela 3 constam os equipamentos utilizados ao longo da realização experimental deste trabalho.

Tabela 3. Equipamentos utilizados no trabalho experimental.

Equipamento	Fabricante	Modelo	Origem
Aagitador em hélice	Heidolph	RZR 2041	Alemanha
Aagitador mecânico	IKA	T25 Ultra turrax	Alemanha
Balança de determinação do teor da humidade	Gravimetra	AD-4713	Japão
Balança analítica	Mettler Toledo	ME104	Suíça
Balança semi-analítica	Sartorius	AZ 1502	Alemanha
Banho de água	AuxiLab S.L	Banho de água Nahita	Espanha
Centrífuga	Eppendorf AG	5804	Alemanha
Colorímetro	Konica Minolta Sensing, Inc.	Chroma Meter Cr-400	Japão
Craveira digital	Parkside®	HG00962A	Alemanha
Difratómetro a laser	Malvern	Mastersizer 3000	Reino Unido
Estufa	Memmert	-	Alemanha
Placa de agitação com aquecimento	IKA®	C-MAG HS 7	Alemanha
Placa de agitação magnética	Stuart scientific	SM26	Reino Unido
Potenciómetro	HANNA instruments	HI 2211	Roménia
Sensor de temperatura	Courage and Khazaka Electronic	TM 210	Alemanha
Sonicador	Sonics Vibra-cell™	VCX 130	EUA
Texturómetro	Stable Micro Systems	TA-XT2i	Reino Unido
Viscosímetro	Thermo Haake	VT-550	Alemanha

2.2 Cremes

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9.0 (40), os cremes são preparações multifásicas formadas por uma fase aquosa e por uma fase lipófila.

Quando a fase externa é a fase lipófila, o creme designa-se por creme lipófilo. Este tipo de creme contém agentes emulsivos água/óleo tais como ésteres do sorbitano, álcoois da lanolina e monogliceridos que tornam a preparação mais estável. Quando a fase externa é a fase aquosa, o creme designa-se creme hidrófilo. Este tipo de creme contém agentes emulsivos óleo/água, tais como álcoois gordos sulfatados, sabões de sódio ou de trietanolamina, álcoois gordos polioxietilénicos e polissorbatos que, eventualmente, podem ser combinados com agentes emulsivos água/óleo (40).

As substâncias ativas podem ser dissolvidas ou dispersas na fase aquosa ou na fase lipófila de acordo com a sua solubilidade.

Gonçalves et al. (41) compararam a utilização de ácidos gordos essenciais (AGE) a 0,2% e de um creme de ácido hialurónico a 0,2% no tratamento de uma queimadura provocada pela exposição a fertilizante nas mãos de um paciente de 46 anos. Foi realizada, com soro fisiológico 0,9%, uma limpeza diária das lesões. Numa mão foi feita a aplicação de creme de AH e na outra mão a aplicação de AGE. A lesão foi observada diariamente para avaliar a evolução da sua cicatrização. 60 dias após ambos os tratamentos na mão onde foi aplicado o creme de AH a cicatrização foi completa enquanto na mão tratada com AGE ainda havia descamação e fissuras. Tendo em conta este resultado o tratamento com AGE foi suspenso e iniciou-se o uso do creme com AH. Após 39 dias a lesão já estava totalmente cicatrizada. Este estudo permitiu concluir que o uso do creme de AH contribuiu para uma cicatrização mais eficiente e rápida comparado com o uso de AGE.

Udhayakumar et al (42) prepararam um creme com colagénio isolado do tecido estomacal de bovino, quitosano, goma xantana, lanolina e glicerol a fim de verificar se o colagénio acelerava a proliferação de fibroblastos. Após caracterização o creme exibiu bom comportamento reológico, boa estabilidade e espalhabilidade e atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e negativas. Realizaram-se estudos *in vitro* que demonstraram a elevada citocompatibilidade sem qualquer toxicidade para as células e o fornecimento de um ambiente favorável para a fixação, migração e proliferação das células. O creme foi aplicado em feridas animais de excisão aberta e espessura total e após avaliação *in vivo*, este estudo demonstrou que este promoveu a reepitelização, a contração da ferida e a deposição de colagénio.

2.2.1 Preparação dos cremes

Com base em estudos anteriores (43) foram preparadas cinco formulações de cremes com percentagens de ácido hialurónico e colagénio distintas (Tabela 4). A Base PFC[®] constituiu a fase oleosa associada ao agente emulsivo e os restantes componentes a fase aquosa. A trietanolamina foi adicionada para ajustar o pH.

Tabela 4. Composição dos cremes (% m/m).

Matérias-primas	Formulação 1A	Formulação 2A	Formulação 3A	Formulação 4A	Formulação 5A
Base PFC [®]	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
Kathon [®] CG	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Colagénio	5,0	5,0	5,0	2,5	5,0
Ácido Hialurónico	1,0	1,5	2,0	1,0	1,0
Trietanolamina	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.	q.b.*
Água purificada	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0

* Formulação 5A com composição igual à 1A, mas com o pH ajustado para 6.

Num banho de água a 70°C fundiu-se a Base PFC[®] e aqueceu-se à mesma temperatura a água com o Kathon[®] CG, onde se foi adicionando aos poucos o colagénio e o ácido hialurónico. Depois do colagénio e do AH terem dispersado completamente e das duas fases, oleosa e aquosa, se encontraram à mesma temperatura, adicionou-se, em constante agitação, a fase aquosa à fase oleosa. De seguida retirou-se a cápsula do banho de água, continuando a agitação até total arrefecimento. Por fim procedeu-se à medição do pH, utilizando o potenciómetro, tendo-se adicionado quantidade suficiente de trietanolamina para ajustar o pH entre 4 e 6 (pH normal da pele). Os cremes foram acondicionados num frasco de plástico e armazenados na estufa a 25 °C para avaliação da estabilidade (Figura 7).

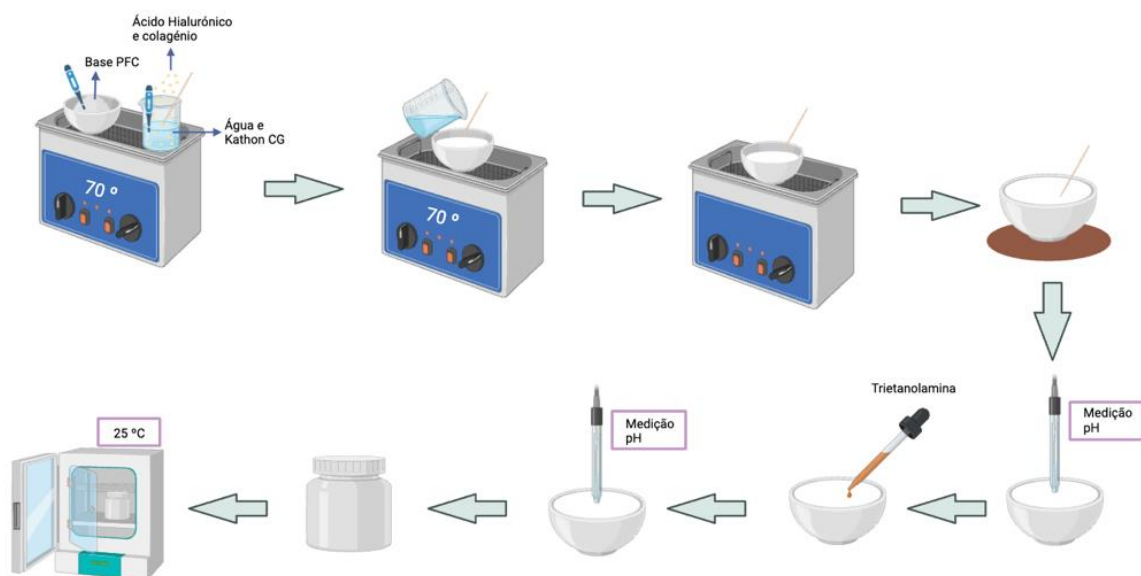


Figura 7. Representação do método utilizado para a produção dos cremes.

2.2.2 Caracterização dos cremes

2.2.2.1 Determinação do pH

O pH indica a basicidade ou acidez de um meio por meio de uma escala, compreendida entre 0 e 14 (44). O pH da pele é ácido, variando entre 4 e 6, o que permite proteger a superfície cutânea contra bactérias e fungos (45). Contudo, nas feridas o pH é mais alcalino devido à exposição dos tecidos subjacentes, gerada pelo trauma que afeta o ambiente ácido (46). O pH varia de acordo com o tipo de ferida, por exemplo, um pH médio de 7,44 é característico de uma ferida aguda, enquanto um pH médio entre 7,42 e 8,90 é comum nas feridas crônicas (46). Como os ambientes alcalinos são benéficos para o crescimento microbiano é aconselhável o uso de produtos ácidos não só para regular o pH prevenindo o crescimento microbiano, mas também para promover a proliferação de fibroblastos, tornar a epitelialização mais rápida e promover a contração da ferida e a angiogénese (46). Assim, ao longo da cicatrização da ferida o pH diminui restaurando um ambiente ácido.

O valor ideal de pH varia conforme a área corporal a que o produto cosmético ou farmacêutico se destina a ser aplicado (44). Nas preparações para aplicação cutânea o pH é uma propriedade importante uma vez que se relaciona com a eficácia e segurança do uso da preparação e com a compatibilidade dos componentes presentes na formulação (44). A medição do pH ao longo do tempo é importante também para avaliar a estabilidade do produto e a validade do mesmo. Tendo em consideração que os produtos para aplicação cutânea devem possuir um valor de pH próximo do pH fisiológico, neste trabalho

pretendeu-se que o pH do creme se encontrasse entre 4 e 6, valores compatíveis com a pele.

A medição do pH foi efetuada com o Potenciômetro *HANNA instruments* 2211 (figura 8) em triplicado. Os resultados indicados correspondem ao valor médio das três medições $\pm$ desvio padrão. A medição do pH para as formulações 1A, 2A e 3A foi apenas realizada no dia da preparação enquanto para as formulações 4A e 5A foi efetuada no dia da preparação e 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação.



Figura 8. Potenciômetro *HANNA instruments* 2211.

2.2.2.2 Análise da cor

A cor é definida como uma percepção visual provocada pela reflexão ou refração da luz da superfície de objetos (47). A cor é percebida de forma diferente por cada indivíduo.

Um espaço de cor consiste num método para exprimir a cor de um objeto utilizando um determinado tipo de notação, como por exemplo números ou letras. A CIE (*Commission Internationale de l'Eclairage*) é considerada a autoridade na ciência da cor e luz, tendo definido três espaços cromáticos entre eles o CIELAB, também designado por espaço de cor $L^*a^*b^*$. Este espaço de cor é o mais utilizado na atualidade por correlacionar os valores de cor com a percepção visual (47).

Neste ensaio avaliou-se a luminosidade e o parâmetro *Chroma* para definir as características cromáticas das preparações semissólidas. Recorreu-se então ao espaço cromático CIELAB (figura 9) que é representado por três eixos ortogonais onde L^* indica a luminosidade ($L^* = 0$ representa o preto e $L^* = 100$ representa o branco), a^* uma escala cromática entre as cores verde e vermelha ($a^* < 0$ representa o verde e $a^* > 0$ o vermelho) e b^* uma escala cromática entre as cores azul e amarela ($b^* < 0$ representa o azul e $b^* > 0$ o amarelo) (47).

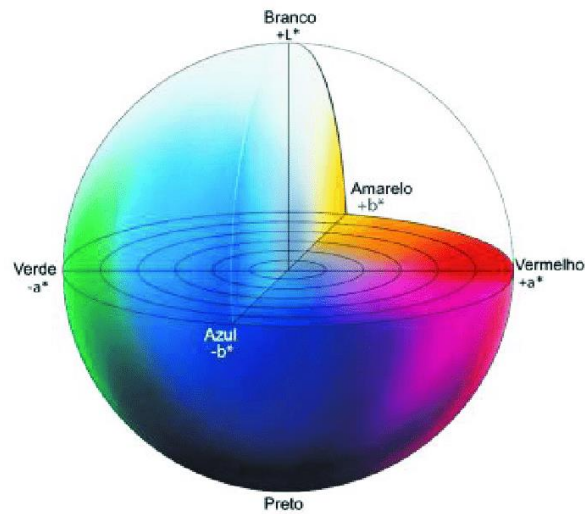


Figura 9. Espaço cromático $L^* a^* b^*$.

Retirada de (47)

A intensidade da cor é indicada pelo parâmetro *Chroma*, C^* , que se obtém pela equação:

$$C^* = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$$

O parâmetro *Chroma* permite-nos avaliar se a amostra escurece ao longo do tempo uma vez que caso o seu valor aumente com o tempo significa que a amostra escurece.

Este ensaio foi realizado aos 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação para as formulações 4A e 5A. Utilizou-se o colorímetro *Konica Minolta Chroma Meter 400* e o software *SpectraMagic NX* (figura 10). A amostra, colocada numa placa de Petri, foi coberta com papel de alumínio (para garantir que não havia interferência da luz). Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram medidos em triplicado. Os resultados indicados dizem respeito ao valor médio das três medições $\pm$ desvio padrão.



Figura 10. Colorímetro Konica Minolta Chroma Meter 400 e software SpectraMagic NX.

2.2.2.3 Ensaio reológico

A reologia consiste no estudo das características de escoamento e de deformação da matéria. O objetivo principal da reologia é descrever as relações que existem entre tensões e deformações (48). Nas áreas farmacêutica e cosmética a reologia é importante para caracterizar parâmetros que permitem inferir sobre a estabilidade e qualidade das formas farmacêuticas e dos produtos cosméticos.

A viscosidade, propriedade reológica mais conhecida, avalia a resistência de um fluido ao escoamento, isto é, quando se submete um fluido a uma tensão, se ele flui de maneira rápida, ou seja, se a velocidade de movimentação for elevada, ele é pouco viscoso, como por exemplo a água, se acontecer o oposto, então ele é muito viscoso, como por exemplo um óleo (49). Esta propriedade pode ser calculada através da equação:

$$\eta = \frac{\tau}{\gamma}$$

onde η é a viscosidade (Pa.s), τ a tensão de corte (Pa) e γ a velocidade de corte (s^{-1}).

Os fluidos podem ser classificados em Newtonianos e não Newtonianos. Os fluidos Newtonianos são caracterizados por uma viscosidade constante para qualquer tensão de corte, a uma certa temperatura. No caso dos fluidos não Newtonianos a viscosidade altera-se com a variação da tensão de corte (48).

Nos fluidos não Newtonianos podem ainda observar-se três comportamentos distintos. Se a viscosidade diminui com o aumento da tensão de corte, o fluido designa-se reofluidificante ou pseudoplástico e se a viscosidade aumenta com o aumento da tensão de corte, o que é pouco comum, o fluido designa-se reoespessante ou dilatante. Se for necessária uma tensão de corte mínima (tensão de cedência) para que se inicie o escoamento, comportamento observado em vários cremes, o fluido designa-se plástico (figura 11) (48).

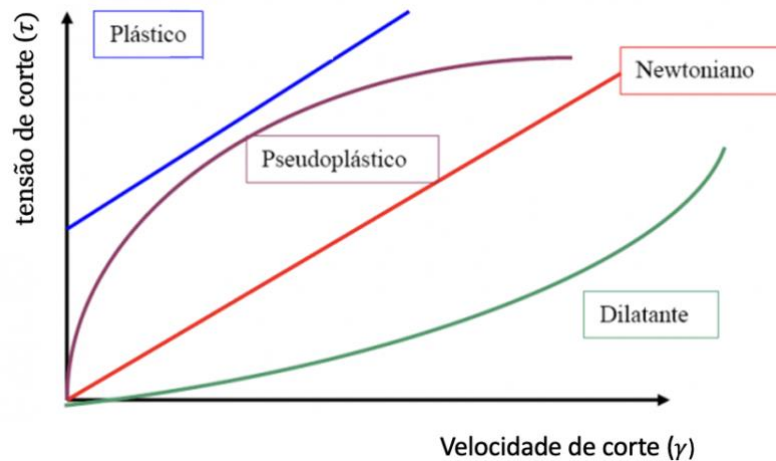


Figura 11. Representação gráfica da tensão de corte (τ) em função da velocidade de corte (γ) para alguns comportamentos reológicos.

Adaptada de (50)

Quando se aplica uma tensão de corte constante é possível, através das alterações reológicas com o passar do tempo, distinguir fluidos tixotrópicos e fluidos reopéticos (figura 12). No primeiro caso, para a mesma tensão de corte, a viscosidade diminui ao longo do tempo, já no segundo caso, a viscosidade aumenta com o passar do tempo, para a mesma tensão de corte. A área entre as curvas ascendente e descendente do reograma permite-nos medir a tixotropia (49).

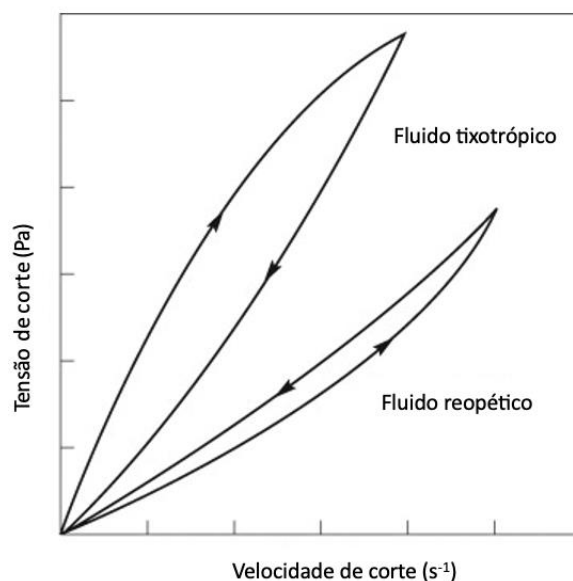


Figura 12. Fluidos tixotrópicos e reopéticos.

Adaptada de (51)

Nas preparações semissólidas a avaliação da tixotropia permite conhecer o desempenho da preparação quando esta for aplicada na pele. Uma preparação que apresente tixotropia tende a ser fisicamente mais estável uma vez que será mais consistente, mas quando aplicada na pele, devido à tensão provocada, a fluidez aumenta, melhorando o seu espalhamento (52). Após a aplicação, o produto readquire a sua viscosidade inicial, impedindo o derrame do mesmo para outras regiões do corpo (52).

Neste trabalho, a viscosidade foi avaliada recorrendo-se ao viscosímetro *Thermo Kaake VT-550* (figura 13). O ensaio foi realizado a 20 °C com leituras de velocidade de corte entre 1 s⁻¹ e 100 s⁻¹, com um tempo de estabilização de 900 s e 10 etapas ascendentes e descendentes. Para as formulações 1A, 2A e 3A a medição foi apenas efetuada ao fim de 7 dias e para as formulações 4A e 5A esta determinação foi realizada ao fim de 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação.

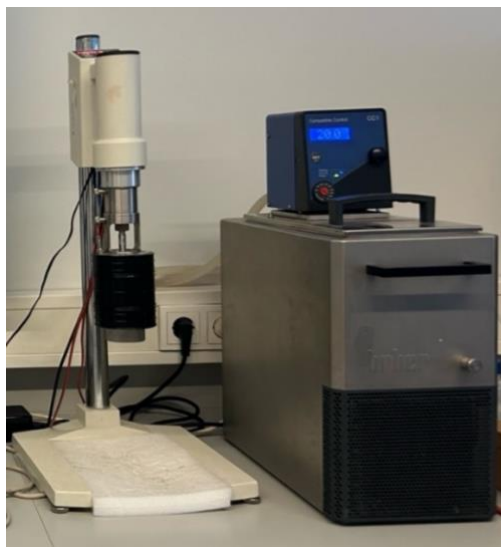


Figura 13. Viscosímetro *Thermo Kaake VT-550*.

2.2.2.4 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação

A estabilidade farmacêutica, segundo a Organização Mundial de Saúde, consiste na capacidade que uma preparação farmacêutica possui para manter as suas características físicas, químicas, microbiológicas e biofarmacêuticas dentro dos limites especificados durante todo o prazo de validade (53).

A fim de prever possíveis modificações químicas e/ou físicas que possam surgir nas formulações a longo prazo, durante o seu armazenamento, é comum realizar ensaios de estabilidade num espaço de tempo reduzido (estabilidade acelerada).

No ensaio da estabilidade acelerada por centrifugação as amostras são sujeitas a condições de força gravítica extrema o que cria *stress* mecânico e aumenta a mobilidade das partículas. Este aumento do movimento das partículas causa instabilidade e, assim, este ensaio permite observar possíveis alterações, tais como modificações sob a forma de coalescência, precipitação, existência de separação de fases, formação de sedimentos compactos, etc (54).

A centrífuga *Eppendorf AG 5804* (figura 14) foi utilizada para a realização deste ensaio em todas as formulações. As amostras foram colocadas em tubos graduados numa quantidade de cerca de 6 ml e estes foram colocados na centrífuga, paralelamente. A centrifugação foi feita em duplicado, à temperatura ambiente, a 3500 rpm durante 30 minutos, valores recomendados pela ANVISA (54). Após a centrifugação verificou-se se houve separação de fases, através de uma análise visual. O ensaio foi realizado no dia da preparação da formulação, bem como 7 dias depois.



Figura 14. Centrífuga *Eppendorf AG 5804*.

2.2.2.5 Avaliação da textura

A textura engloba as características físicas de uma formulação e pode ser avaliada pelo tato ou recorrendo a um equipamento específico designado texturómetro (55). Estas características relacionam-se com a deformação derivada de uma força e são medidas em termos de distância, tempo e força (56). Para a aceitabilidade do produto pelo consumidor, a avaliação da textura é fundamental (56).

A avaliação da textura realizada por um texturómetro compreende ensaios mecânicos que avaliam a adesividade e a firmeza em função da distância que a sonda percorre ao longo da deformação da preparação. A penetração da sonda na preparação ocorre a uma distância e velocidade pré-definidas e após a distância de penetração a sonda ascende à sua posição inicial, acima da superfície da preparação (57).

Num gráfico *Força (N)* em função do *Tempo (s)* (figura 15), a firmeza corresponde à força máxima necessária para provocar uma deformação e quanto maior for o valor da força máxima necessária para penetrar na preparação, mais consistente esta é. A adesividade determina-se através do cálculo da área negativa que corresponde ao trabalho necessário para que a sonda regresse à sua posição inicial, isto é, corresponde ao trabalho necessário para ultrapassar as forças atrativas entre a superfície da sonda e a superfície da preparação, sendo que, quanto maior for o valor da área negativa, mais adesiva é a preparação (57). A firmeza relaciona-se com a facilidade de aplicação da preparação e a adesividade com a aderência do produto à região onde é aplicado. A compressibilidade corresponde à área positiva.

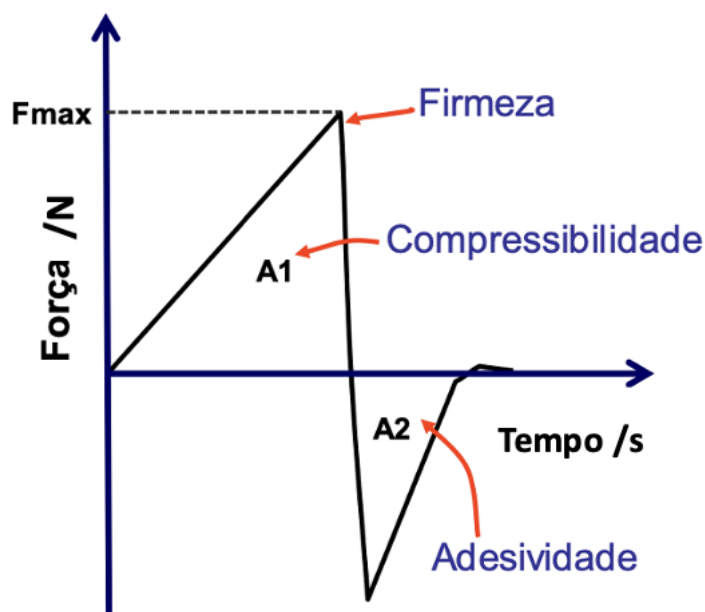


Figura 15. Representação do gráfico da força *versus* tempo.

Para avaliar a textura de todas as formulações recorreu-se ao texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (figura 16), ao software *Texture Exponent* e às seguintes condições:

- Sonda: Sonda cilíndrica *Lap Perspex* 25 mm diâmetro
- Distância de penetração: 5 mm
- Velocidade de penetração: 1 mm/s
- Célula de carga: 5 kg
- *Trigger Force*: 0,049 N

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente, em triplicado. Nas formulações 1A, 2A e 3A este ensaio apenas foi realizado 7 dias após a preparação, já nas formulações 4A e 5A o ensaio foi realizado ao fim de 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação para verificar a estabilidade destas formulações. Os resultados correspondem à média das três medições $\pm$ desvio padrão.

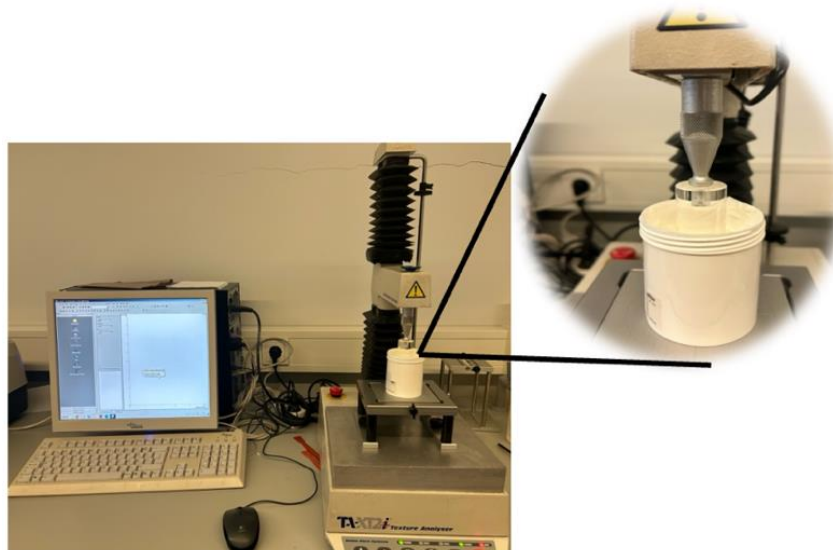


Figura 16. Texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* e sonda *Lap Perspex 25 mm*.

2.2.2.6 Análise da espalhabilidade

A espalhabilidade corresponde à área ocupada por uma preparação semissólida após a sua aplicação no local alvo. Esta propriedade determina a facilidade de remoção da embalagem e de aplicação na região pretendida, a transferência da dosagem adequada para o local alvo e a aceitabilidade do consumidor (58).

A espalhabilidade foi avaliada utilizando-se o texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (figura 17) e o software *Texture Exponent*. A preparação foi colocada no cone feminino e os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- Sonda: *TTC Spreadibility Rig (HDP/SR)*
- Distância de penetração: 23 mm
- Velocidade de penetração: 1 mm/s
- Célula de carga: 5 kg
- *Trigger force*: 0,049 N

O ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente, para as formulações 4A e 5A. Os resultados apresentados dizem respeito à média das três medições $\pm$ desvio padrão.



Figura 17. Texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* e sonda *TTC Spreadability Rig (HDP/SR)*.

2.2.2.7 Análise estatística

Os valores do pH, firmeza e adesividade foram analisados estatisticamente entre o dia 7 e o dia 90 para as formulações 4A e 5A. A análise foi realizada no *Microsoft® Excel* utilizando-se o teste F para comparar as variâncias seguido do teste t de *Student* para avaliar as diferenças estatísticas dos resultados. O nível de significância usado foi de 95% ($\alpha = 0,05$). Valores de $p < 0,05$ revelam resultados diferentes estatisticamente.

2.3 Emulsões gelificadas

As emulsões consistem em dispersões de gotículas num meio líquido (fase externa ou dispersante) no qual são imiscíveis. Como constituem um sistema termodinamicamente instável é essencial a presença de um ou mais tensioativos, que diminuem a tensão na interface entre as duas fases e permitem a dispersão das mesmas, evitando a sua separação e aumentando a estabilidade da emulsão (59). No caso das emulsões cuja fase externa é aquosa, os tensioativos são utilizados não só com o objetivo de dispersar a fase oleosa na aquosa e aumentar a estabilidade, mas também com o objetivo de melhorar a penetração na pele. É comum neste tipo de formulações existir um sistema misto de tensioativos que provoca um efeito sinérgico. São exemplos de tensioativos o *Span® 80*, o *Tween® 80*, o lauril sulfato de sódio, os derivados do polietilenoglicol, entre outros.

Tendo em conta a estrutura do sistema é possível distinguir, essencialmente, dois tipos de emulsões: emulsões lipófilas (água/óleo (A/O)) em que a fase interna é a aquosa

e a externa a oleosa e emulsões hidrófilas (óleo/água (O/A)) em que a fase oleosa se encontra dispersa na fase aquosa (59).

Existem ainda emulsões múltiplas ou duplas que são sistemas mais complexos formados por uma emulsão A/O ou O/A dispersa numa fase aquosa ou oleosa (figura 18). Estes sistemas, como possuem duas interfaces, comparados com as emulsões normais, melhoram a encapsulação das substâncias ativas, a sua resistência à degradação pela fase externa e permitem uma libertação controlada (60).

Existem dois tipos principais de emulsões múltiplas: emulsões água/óleo/água (A/O/A) e emulsões óleo/água/óleo (O/A/O). As emulsões A/O/A são amplamente utilizadas e permitem encapsular substâncias ativas hidrófilas na fase aquosa interna. Neste tipo de emulsões primeiramente é produzida uma emulsão A/O, utilizando um tensioativo hidrófobo, que é posteriormente adicionada a uma fase aquosa que contém um tensioativo hidrófilo que permite dispersar a emulsão inicial na fase aquosa externa (61).

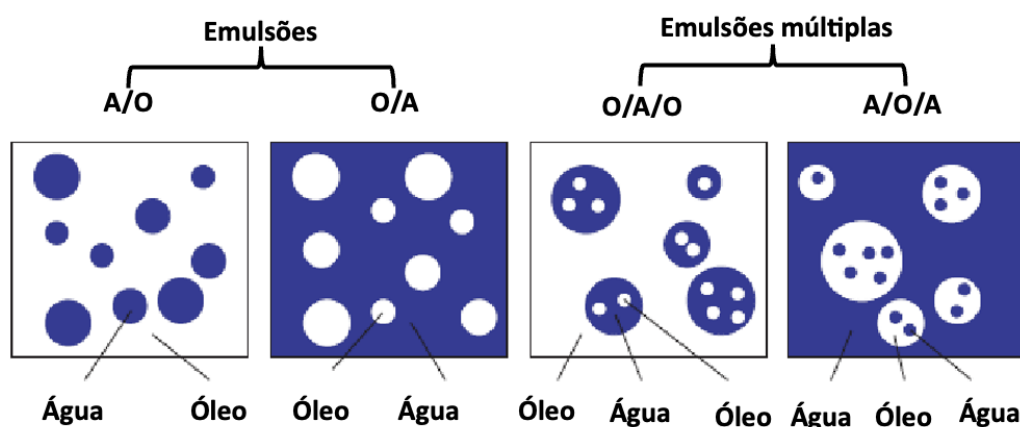


Figura 18. Representação de emulsões simples e emulsões múltiplas.

Adaptada de (62)

2.3.1 Preparação das emulsões gelificadas

Foram preparadas nove formulações diferentes, baseadas em estudos anteriores (43), com o objetivo de obter emulsões triplas do tipo A/O/A gelificadas (tabela 5). A fase oleosa foi mantida em todas as formulações. O colagénio foi incorporado sempre na fase aquosa 1 (FA 1) (fase aquosa mais interna), com o objetivo de obter uma libertação lenta do colagénio, enquanto o AH foi incorporado tanto na fase aquosa 1 como na fase aquosa 2 (FA 2) (fase aquosa mais externa), atuando como agente gelificante, ajudando a ajustar a viscosidade pretendida.

Tabela 5. Composição das emulsões múltiplas (% , m/m).

Matérias-primas		1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B
FA 1	AH	1,0	1,0	1,0	-	-	-	-	-	-
	COL	2,5	2,5	-	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Água purificada	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0
FO	Span® 80	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
	Miglyol® 812	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0	25,0
Emulsão A/O		40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
FA 2	Tween® 80	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
	Kathon® CG	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	AH	-	-	-	-	1,0	2,0	-	-	-
	Água purificada	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0
Gelificante	AH	-	-	-	-	-	-	2,0	2,5	5,0

A fase aquosa 1 e a fase oleosa foram agitadas num agitador magnético. Posteriormente, adicionou-se, com agitação constante, a fase aquosa 1 à fase oleosa. A seguir, adicionou-se a fase aquosa 2 à emulsão A/O, preparada anteriormente, com constante agitação. Por fim, a emulsão A/O/A foi colocada no ultrassons a uma amplitude de 70% durante 20 minutos. De seguida, a emulsão foi colocada na centrífuga para verificar se ocorria a separação de fases. Para as formulações 7B, 8B e 9B após submeter a emulsão ao ultrassons adicionou-se o AH utilizando um agitador em hélice e de seguida avaliou-se a separação de fases (figura 19). As emulsões foram posteriormente acondicionadas num frasco de plástico e colocadas na estufa a 25 °C para avaliação da estabilidade.

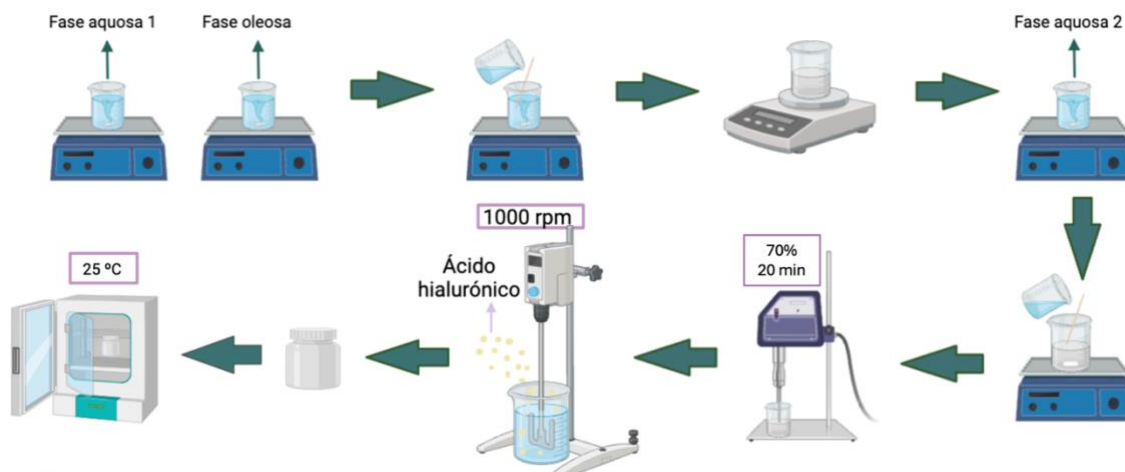


Figura 19. Representação do método utilizado para produzir a emulsão múltipla gelificada.

2.3.2 Caracterização das emulsões múltiplas gelificadas

2.3.2.1 Medição do tamanho das gotículas

De acordo com o tamanho das gotas da fase dispersa, as emulsões podem ser classificadas em nanoemulsões, se as gotículas possuírem um diâmetro igual ou inferior a 100 nm, em microemulsões, se o diâmetro das gotículas for entre 0,01 μm e 0,1 μm e em macroemulsões, se o diâmetro das gotículas for superior a 0,1 μm (63). O tamanho das gotículas depende da quantidade de agente emulsivo utilizada e do processo de fabrico da emulsão.

É importante medir o tamanho das gotículas da fase dispersa uma vez que este influencia as propriedades reológicas, bem como a estabilidade da emulsão. As emulsões com tamanhos menores de gotículas são fisicamente mais estáveis (64).

Existem várias técnicas para analisar a distribuição do tamanho das partículas/gotículas, sendo a mais utilizada a difração a laser (64). Nesta técnica um feixe de laser incide nas partículas dispersas, iluminando-as. O tamanho das partículas é obtido pela medição da intensidade da variação angular da luz dispersa. As partículas de tamanho mais reduzido dispersam a luz em ângulos maiores, enquanto as partículas de tamanho maior dispersam a luz em ângulos menores (64). É feita uma análise matemática para a obtenção da distribuição estatística dos tamanhos das gotículas (65). Os tamanhos geralmente apresentam-se em percentis, obtendo-se o volume de distribuição de 10%, 50% e 90%, que diz respeito às gotículas com diâmetros iguais ou inferiores aos resultados obtidos (65). O equipamento faz várias medições fornecendo a média, o coeficiente de variação e o *Span* (65).

A medição do tamanho das gotículas foi realizada para as formulações 8B e 9B com um difratômetro a laser *Mastersizer 3000* (figura 20), utilizando os seguintes parâmetros:

- Tipo de partícula: esférica
- Material: Lípido
- Índice de refração do material: 1,44
- Índice de absorção: 0,01
- Densidade (g/cm^3): 1
- Dispersante: água
- Índice de refração do dispersante: 1,33



Figura 20. *Mastersizer 3000, Malvern.*

2.3.2.2 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação

O ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação descrito em 2.2.2.4 é importante para avaliar possíveis alterações físicas na preparação.

O ensaio foi realizado para todas as formulações e para aquelas que continham o agente gelificante (7B, 8B e 9B), a medição foi efetuada antes e após adição do mesmo.

Foram também realizados dois ciclos de 3500 rpm durante 30 minutos na centrífuga *Eppendorf AG 5804*, valores recomendados pela ANVISA (54). No final, a verificação da existência de separação de fases foi realizada através de uma análise visual.

2.3.2.3 Determinação do pH

Tal como referido em 2.2.2.1 um pH ácido favorece o processo de regeneração da pele. Desta forma, o pH pretendido para as emulsões foi também entre 4 e 6.

Recorreu-se ao potenciômetro *HANNA instruments 2211* e realizaram-se as medições, para todas as formulações, em triplicado. Para as formulações 8B e 9B a

medição foi efetuada não só no dia da preparação, mas também aos 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação a fim de avaliar a estabilidade. Os resultados representam o valor médio das medições $\pm$ desvio padrão.

2.3.2.4 Análise da cor

A cor foi analisada pelo espaço cromático CIELAB, definido em 2.2.2.2, avaliando-se a luminosidade e o parâmetro *Chroma*.

A medição foi efetuada com o colorímetro *Konica Minolta Chroma Meter 400* e o software *SpectraMagic NX* para as formulações 8B e 9B no dia da preparação e ao fim de 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação. Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram medidos em triplicado. Os resultados apresentados referem-se ao valor médio das três medições $\pm$ desvio padrão.

2.3.2.5 Ensaio reológico

A concentração e o tamanho das gotículas da fase interna, bem como o comportamento reológico da fase externa e a interação entre os componentes, são fatores que afetam a reologia de uma emulsão (66).

A viscosidade foi avaliada para as formulações 8B e 9B ao fim de 7, 30, 60 e 90 dias após preparação, utilizando-se o viscosímetro *Thermo Kaake VT-550*. O ensaio foi realizado a 20 °C com leituras de velocidade de corte entre 1 s^{-1} e 100 s^{-1} , com um tempo de estabilização de 900 s e 10 etapas ascendentes e descendentes.

2.3.2.6 Análise da textura

Para avaliar a facilidade de aplicação das formulações (firmeza) e a aderência das mesmas à região onde são aplicadas (adesividade), avaliou-se a textura das formulações 8B e 9B recorrendo ao texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i*, ao software *Texture Exponent* e às seguintes condições:

- Sonda: Sonda cilíndrica *Lap Perspex* 25 mm diâmetro
- Distância de penetração: 5 mm
- Velocidade de penetração: 1 mm/s
- Célula de carga: 5 kg
- *Trigger Force*: 0,049 N

O ensaio foi realizado à temperatura ambiente, em triplicado, ao fim de 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação para verificar a estabilidade das formulações 8B e 9B. Os resultados correspondem à média de três medições $\pm$ desvio padrão.

2.3.2.7 Análise da espalhabilidade

A espalhabilidade também foi avaliada para as emulsões 8B e 9B utilizando-se o texturômetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* e o software *Texture Exponent*. A preparação foi colocada no cone feminino e os parâmetros utilizados foram os seguintes:

- Sonda: *TTC Spreadability Rig (HDP/SR)*
- Distância de penetração: 23 mm
- Velocidade de penetração: 1 mm/s
- Célula de carga: 5 kg
- *Trigger force*: 0,049 N

O ensaio foi realizado em triplicado, à temperatura ambiente, e os resultados apresentados dizem respeito à média de três medições $\pm$ desvio padrão.

2.3.2.8 Análise estatística

À semelhança dos cremes os valores do pH, firmeza e adesividade foram analisados estatisticamente entre o dia 7 e o dia 90 para as formulações 8B e 9B. A análise foi realizada no *Microsoft® Excel* utilizando-se o teste F para comparar variâncias e o teste t de *Student* para avaliar as diferenças estatísticas dos resultados. O nível de significância usado foi de 95% ($\alpha = 0,05$) e valores de $p < 0,05$ revelam resultados diferentes estatisticamente.

2.4 Películas

As películas ou filmes são sistemas que substituem temporariamente a pele, atuando como uma barreira física e mecânica. São vários os tipos de filmes existentes, sendo de realçar os filmes poliméricos que ajudam no processo de regeneração da pele (67).

Os filmes poliméricos protegem a ferida de microrganismos e agentes tóxicos, proporcionam um ambiente húmido, possuem capacidade de absorver os fluidos e exsudatos, não requerem frequente troca ou limpeza, possuem custo reduzido, elevada eficiência e baixa toxicidade. Para além disso, são sistemas resistentes, com elevada flexibilidade e transparentes, nos quais se podem incorporar substâncias ativas tendo em vista uma libertação controlada ou prolongada (67). Diversos polímeros, nomeadamente o quitosano, o álcool polivinílico, o colagénio, a hidroxipropilmetilcelulose, o alginato, o ácido hialurónico, entre outros, são utilizados na preparação de películas para aplicações

cosméticas e farmacêuticas. Este tipo de materiais pode também ser utilizado em biomedicina, nomeadamente em engenharia de tecidos e na cicatrização de feridas.

O colagénio é um polímero natural e é o constituinte maioritário do tecido conjuntivo. Assim, é bastante utilizado na cicatrização de feridas e no tratamento de úlceras crónicas, uma vez que estas possuem deficiência na matriz extracelular que o colagénio vai ajudar a regenerar (67). O ácido hialurónico também se encontra na matriz extracelular e sendo biocompatível, biodegradável e com boas propriedades viscoelásticas é muito utilizado na composição de películas (68).

Para a obtenção de filmes poliméricos existem dois métodos mais utilizados: o método da extrusão e o método da evaporação do solvente. O método da evaporação do solvente consiste em dissolver o polímero num solvente adequado, colocar num recipiente e com o passar do tempo no ambiente escolhido (temperatura ambiente ou secagem na estufa) o solvente evapora, restando apenas o filme polimérico. Este método é de baixo custo e é o mais utilizado em laboratório, contudo não é adequado para produção em escala industrial. No método da extrusão, apropriado para produção em escala industrial, o polímero em pó ou *pellet* é adicionado numa extrusora e por efeito da pressão e do calor forma-se o filme polimérico. Apesar deste método ser mais rápido é necessário ter em atenção a temperatura usada uma vez que existem polímeros que podem degradar a elevadas temperaturas (69).

Comercialmente, o *Hyalosafe*[®] consiste numa película transparente contendo AH utilizado no tratamento de feridas e queimaduras de segundo grau. Neste tipo de curativo o AH é libertado e promove a proliferação de células epiteliais (70).

Lewandowska et al. (71) prepararam e caracterizaram películas contendo quitosano e ácido hialurónico e películas contendo quitosano, ácido hialurónico e colagénio. O método de preparação utilizado foi o da evaporação do solvente e na caracterização foram utilizados testes como o de tração, análise termogravimétrica e espectroscopia de infravermelho por transformada de *Fourier*. Os resultados demonstraram que a presença de colagénio contribuiu para aumentar a força de tração e a estabilidade térmica devido às ligações de hidrogénio entre o grupo hidroxilo (-OH) dos aminoácidos que o colagénio contém e os grupos carboxilo (-COOH) e amina (-NH₂) do ácido hialurónico e do quitosano, respetivamente.

2.4.1 Preparação das películas

Inicialmente prepararam-se películas com 2,5% (m/m) de colagénio e diferentes concentrações de glicerina, utilizada como plastificante (tabela 6).

Tabela 6. Composição das películas de colagénio (% m/m).

Matérias-primas	Formulação 1C	Formulação 2C	Formulação 3C	Formulação 4C
Colagénio	2,5	2,5	2,5	2,5
Glicerina	2,5	1,5	1,0	0,5
Água purificada	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0

Para a preparação das películas misturou-se a água com a glicerina e adicionou-se o colagénio lentamente. Após a dispersão do colagénio a preparação foi transferida para placas de Petri e estas foram colocadas numa estufa a 40 °C, durante 48h.

Uma vez que as películas anteriormente preparadas não ficaram conforme o pretendido, com base no trabalho de *Morang et al*, (72) prepararam-se películas a partir da solução de alginato de sódio a 4% (m/m) como base e com concentrações variadas de colagénio e de ácido hialurónico (tabela 7).

Tabela 7. Composição das películas de alginato de sódio, colagénio e ácido hialurónico (% m/m).

Matérias-primas	Formulação 1D	Formulação 2D	Formulação 3D	Formulação 4D
Colagénio	0,5	0,5	0,5	1,0
Glicerina	1,4	1,4	1,4	2,5
Ácido hialurónico	-	1,0	2,0	-
Solução de alginato de sódio a 4%	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0

Primeiramente foi preparada a solução de alginato de sódio a 4%. De seguida, adicionou-se a glicerina e aos poucos o colagénio e o ácido hialurónico, usando um agitador em hélice a 700 rpm. A dispersão ocorreu durante 20 minutos com aquecimento a 60 °C. Por fim, as preparações foram transferidas para placas de Petri e colocadas na estufa a 40 °C, durante 48h.

O alginato de sódio originou películas bastante resistentes, em alternativa foram preparadas películas a partir da dispersão de hidroxietilcelulose a 2% (m/m) com 1% de colagénio (tabela 8).

Tabela 8. Composição das películas com HEC e colagénio (% , m/m).

Matérias-primas	Formulação 1E	Formulação 2E
Colagénio	1,0	1,0
Glicerina	2,5	2,0
Gel de HEC	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0

O procedimento consistiu na dispersão do colagénio na mistura da HEC com glicerina, transferência da preparação para placas de Petri e colocação na estufa a 25°C, durante 48h.

Não sendo possível destacar estas últimas películas, procedeu-se à preparação de películas constituídas por 2% de Carbopol® 940, 2,5% de glicerina, 1% de colagénio e água purificada (q.b.p 100%).

O procedimento seguido foi o seguinte: usando um agitador em hélice, o Carbopol e de seguida o colagénio foram dispersos na mistura da água com a glicerina. Por fim, a preparação foi colocada no frigorífico a fim de eliminar as bolhas resultantes da agitação. Verificou-se que o Carbopol e o colagénio são incompatíveis.

A hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) foi o último polímero a ser testado para a preparação das películas. Foram preparadas oito formulações descritas na tabela 9.

Tabela 9. Composição das películas com HPMC, colagénio e ácido hialurónico (% , m/m).

Matérias-primas	1F	2F	3F	4F	5F	6F	7F	8F
Colagénio	1,0	1,0	-	-	1,0	-	0,5	0,25
Glicerina	2,5	2,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
AH	-	-	-	1,0	-	0,5	-	0,25
HPMC	2,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Água purificada	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p 100,0	q.b.p. 100,0	q.b.p. 100,0	q.b.p 100,0

O procedimento foi idêntico ao descrito para as películas de HEC e encontra-se representado na figura 21.

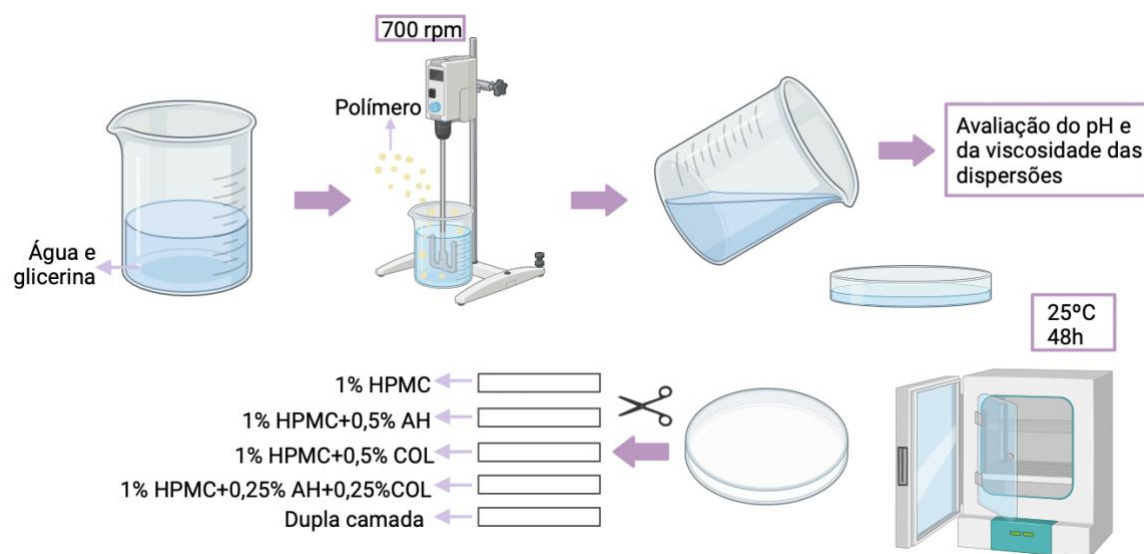


Figura 21. Representação do método de evaporação do solvente utilizado na preparação das películas de HPMC.

Por fim, procedeu-se à preparação de uma película de camada dupla cuja composição se encontra descrita na tabela 10. Inicialmente preparou-se a dispersão da camada inferior que foi colocada na estufa até evaporação do solvente. De seguida preparou-se a dispersão da camada superior que foi colocada na estufa nas mesmas placas de Petri que continham a primeira camada já seca.

Tabela 10. Composição da película dupla com HPMC, colagénio e ácido hialurónico (% , m/m).

Matérias-primas		Formulação 9F
Camada inferior	HPMC	1,0
	Glicerina	1,0
	Ácido Hialurónico	0,25
	Água purificada	q.b.p 100,0
Camada superior	HPMC	1,0
	Glicerina	1,0
	Colagénio	0,25
	Água purificada	q.b.p 100,0

2.4.2 Caracterização das películas

2.4.2.1 Determinação do pH

Como já referido anteriormente, pretendia-se que o pH se encontrasse entre 4 e 6, valores compatíveis com a pele.

A medição do pH foi efetuada em triplicado, para todas as dispersões, utilizando o Potenciómetro *HANNA instruments 2211*. Os resultados indicados correspondem ao valor médio das três medições $\pm$ desvio padrão.

2.4.2.2 Ensaio reológico

A avaliação da viscosidade foi também efetuada para 3F, 6F, 7F e 8F antes de estas serem colocadas na estufa para evaporação do solvente e formação da película.

Para tal, recorreu-se ao viscosímetro *Thermo Kaake VT-550*. O ensaio foi realizado a 20 °C com leituras de velocidade de corte entre 1 s⁻¹ e 100 s⁻¹, com um tempo de estabilização de 900 s e 10 etapas ascendentes e descendentes.

2.4.2.3 Avaliação da extensibilidade

A extensibilidade é uma propriedade que mede a distância a que as películas esticam sem romperem e a força que é necessária exercer para que estas se rompam. As películas devem ter uma extensibilidade suficiente que permita que sejam esticadas sem romper durante o manuseamento para aplicação no local desejado.

Para avaliar a extensibilidade das películas 3F, 6F, 7F, 8F e 9F, primeiramente estas foram recortadas em retângulos (5 cm x 2 cm) iguais. Depois, recorreu-se ao texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* (figura 22) e ao software *Texture Exponent* para proceder ao ensaio da extensibilidade. As películas foram colocadas entre as garras com papel de filtro nas regiões superior e inferior (regiões onde a garra exerce força sobre a película) para protegê-las. De seguida, iniciou-se o ensaio, em triplicado, com uma distância entre as garras de 30 cm. Os resultados da força correspondem ao valor médio $\pm$ desvio padrão, de três medições.

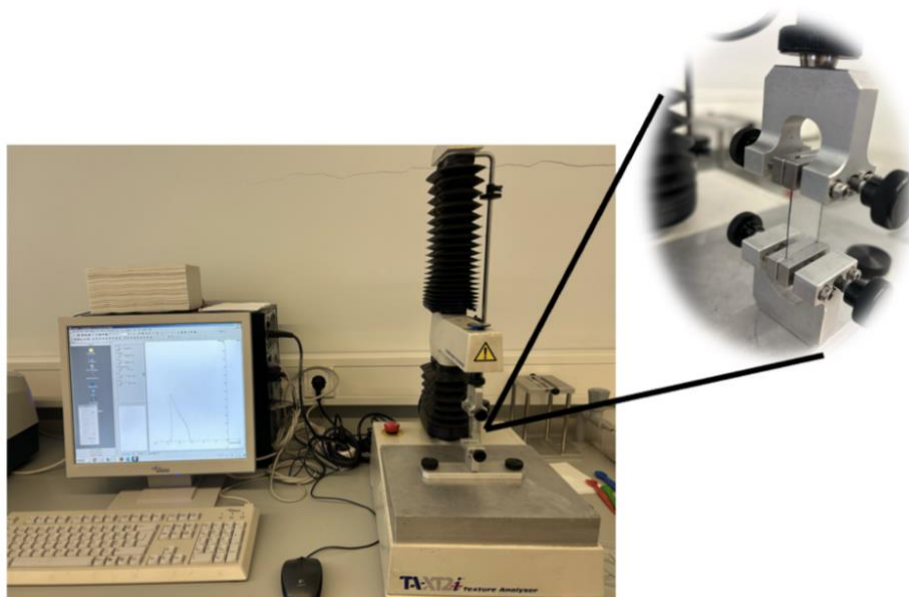


Figura 22. Texturómetro *Stable Micro Systems TA-XT2i* e software *Texture Exponent*.

2.4.2.4 Determinação da uniformidade de massa

É de esperar que as películas com a mesma composição possuam massas idênticas. Para avaliar a uniformidade de massa foi avaliada a massa individual de 12 películas, recorrendo-se a uma balança analítica *Mettler Toledo* (figura 23). Os resultados correspondem à média das 12 medições $\pm$ desvio padrão. O ensaio foi realizado para as formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F.

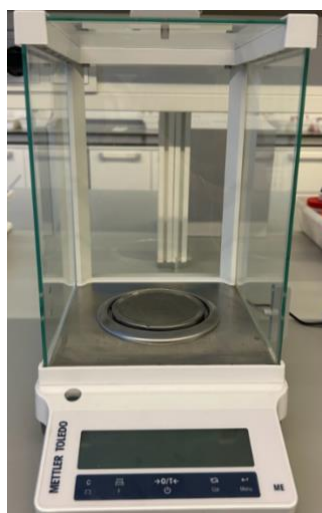


Figura 23. Balança analítica *Mettler Toledo*.

2.4.2.5 Determinação da espessura

A medição da espessura foi feita no centro e nas extremidades de cada película utilizando-se uma craveira digital *Parkside*® (figura 24).

As películas devem possuir uma espessura fina, cujos valores dependem da composição, a fim de facilitar a sua aplicação. Os resultados obtidos correspondem ao valor médio $\pm$ desvio padrão, de três medições para as formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F.

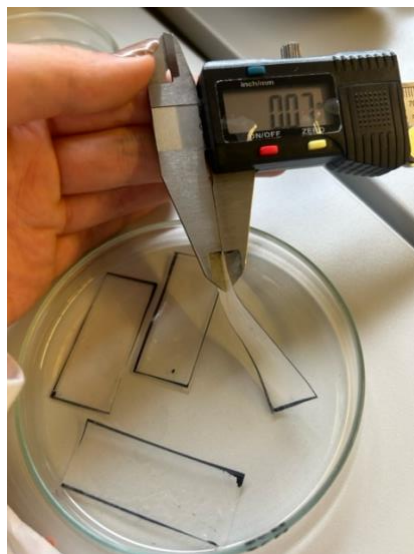


Figura 24. Craveira digital *Parkside*®.

2.4.2.6 Determinação do teor de humidade

O teor de humidade consiste na perda de massa por secagem e é expresso geralmente em percentagem. Para determinar este valor, inicialmente é medida a massa da película, depois ela é submetida a temperaturas elevadas e é medida a massa final da película após esta estabilizar ou após um período pré-definido. Por fim, o teor de humidade pode ser calculado pela expressão:

$$\text{Teor de humidade (\%)} = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Na qual:

m_i – massa inicial

m_f – massa final após aquecimento

Para realizar este ensaio recorreu-se a uma balança de determinação do teor da humidade *Gravimetra AD-4713* (figura 25) a partir da qual se obtém o valor do teor da humidade em percentagem. A medição foi feita em triplicado para as películas 3F, 6F, 7F, 8F e 9F, durante 10 minutos a uma temperatura de 100 °C. Os resultados obtidos correspondem à média das percentagens de teor de humidade $\pm$ desvio padrão.



Figura 25. Balança de determinação do teor da humidade *Gravimetra AD-4713*.

2.4.2.7 Determinação da resistência à dobragem

Para avaliar a flexibilidade das películas obtidas pelas formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F, realizou-se o teste de resistência à dobragem. Este teste consistiu em dobrar repetidamente as películas no mesmo local até estas quebrarem ou até 300 vezes, valor aceitável para considerar a película com boas propriedades.

2.4.2.8 Determinação da perda de água por evaporação

Para determinar a perda de água por evaporação utilizou-se a sonda *Tewameter TM 210* (figura 26) que foi posta em contacto direto com as películas resultantes das formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F. O *software* que a sonda fornece dá-nos o valor médio da perda de água por evaporação e o respetivo desvio padrão.

As medições foram efetuadas antes e 52 h após as películas terem ficado expostas à temperatura ambiente da sala (cerca de 20°C) e com uma humidade relativa entre 40 e 60%. Este ensaio realizou-se para as formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F, em triplicado. Os resultados correspondem ao valor médio das medições $\pm$ desvio padrão.

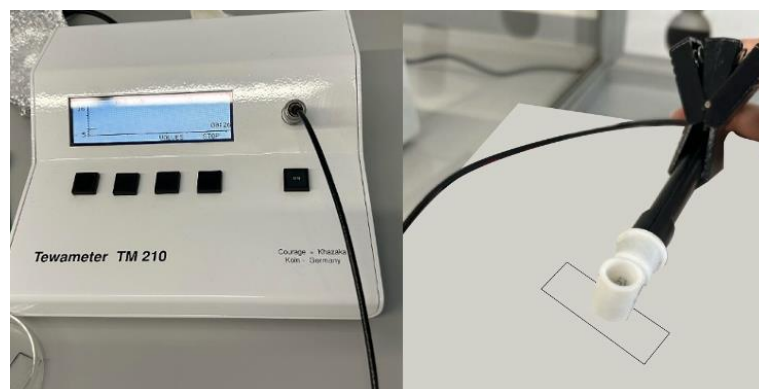


Figura 26. *Tewameter* TM 210.

2.4.2.9 Análise estatística

Os valores de uniformidade de massa e espessura foram analisados estatisticamente entre as formulações de camada simples e dupla (8F e 9F). A análise foi realizada no *Microsoft*® *Excel* utilizando o teste F e o teste t de *Student*. O nível de significância usado foi de 95% ($\alpha = 0,05$). Valores de $p < 0,05$ exprimem resultados estatisticamente diferentes.

3. Resultados e discussão

3.1 Caracterização dos cremes

Para as formulações preparadas inicialmente (1A, 2A e 3A) os ensaios de pH, viscosidade e textura foram realizados apenas uma vez de modo a concluir qual a percentagem de AH adequada. Para as formulações 4A e 5A foram realizados os ensaios ao longo de 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação, a fim de avaliar a estabilidade destas formulações.

3.1.1 Determinação do pH

Os valores de pH para as formulações 1A, 2A e 3A, após a adição de trietanolamina (TEA), constam na tabela 11.

Tabela 11. Resultados de pH para as formulações 1A, 2A e 3A.

Formulação	pH _{com} TEA
1A	7,78
2A	6,88
3A	6,93

Após a adição da trietanolamina os valores de pH das formulações 1A, 2A e 3A foram ligeiramente superiores ao pretendido.

Para as formulações 4A e 5A, após adição de trietanolamina, os valores de pH obtidos ao longo do tempo encontram-se representados na figura 27.

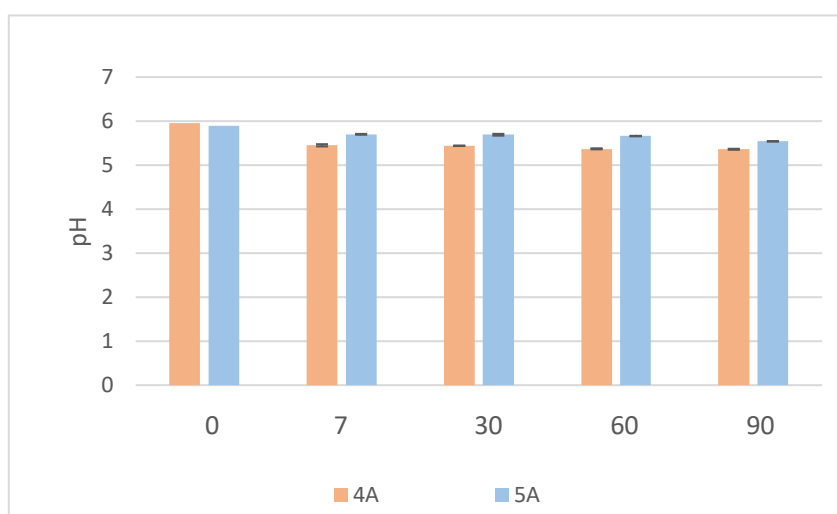


Figura 27. Resultados do pH das formulações 4A e 5A ao longo de 90 dias.

Todos os valores de pH obtidos foram compatíveis com a pele, mesmo após 90 dias, observando-se, para ambas as formulações, a tendência para a diminuição do pH ao longo do tempo. Para a preparação 4A (contendo 2,5% de COL) o pH inicial foi de 5,96 e após 3 meses foi de 5,36. Para a preparação 5A (contendo 5,0% de COL) o pH inicial foi 5,90 e o final foi 5,54. A percentagem de COL não contribuiu para uma variação significativa dos valores de pH ao longo do tempo.

Depois da realização do teste F que permitiu considerar as variâncias iguais ($p > 0,05$) o teste *t de Student* demonstrou que tanto para 4A como para 5A, comparando os resultados obtidos no dia 7 e 90, estes foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

3.1.2 Análise da cor

Através do método descrito em 2.2.2.2 foi possível medir a luminosidade (L^*) dos cremes (tabela 12).

Tabela 12. Luminosidade das formulações 4A e 5A ao longo de 3 meses. Os resultados dizem respeito à média de 3 medições $\pm$ desvio padrão.

Dias	L^*	
	4A	5A
7	$86,72 \pm 0,01$	$85,77 \pm 0,01$
30	$86,38 \pm 0,00$	$87,87 \pm 0,00$
60	$87,04 \pm 0,00$	$86,09 \pm 0,00$
90	$88,58 \pm 0,01$	$87,86 \pm 0,00$

Podemos considerar que a coloração dos cremes obtidos foi próxima da cor branca (valores de L^* próximos de 100). Comparando os resultados ao fim de 7 e 90 dias após a preparação ambas as formulações apresentaram um ligeiro aumento da luminosidade, no caso da 4A de $86,72 \pm 0,01$ para $88,58 \pm 0,01$ e no caso da 5A de $85,77 \pm 0,01$ para $87,86 \pm 0,00$.

A formulação 5A apresentou, de um modo geral, valores de L^* ligeiramente mais baixos talvez devido ao facto de conter maior quantidade de COL, um pó com cor amarelada.

A figura 28 representa o gráfico do parâmetro *Chroma* em função do tempo para as formulações 4A e 5A.

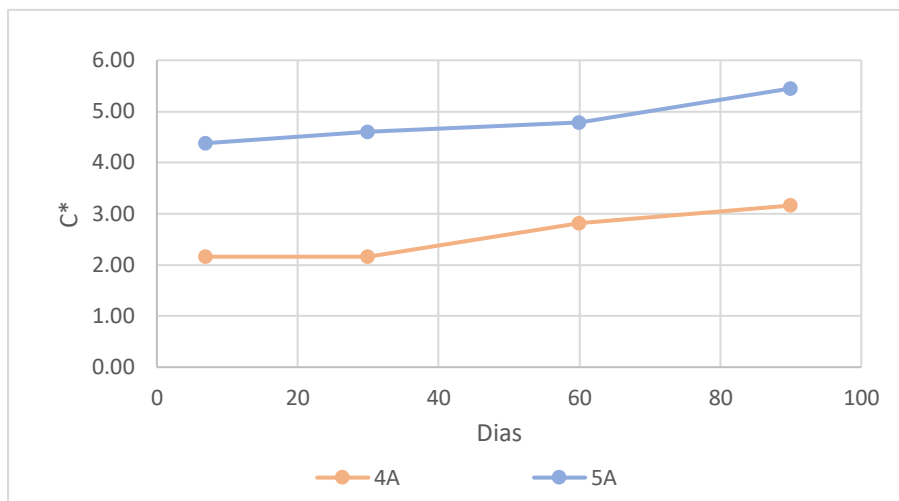


Figura 28. Gráfico da variação do parâmetro *Chroma* em função do tempo para as formulações 4A e 5A.

Para ambas as formulações o parâmetro *Chroma* aumentou ao longo do tempo, o que significa que as amostras escureceram, possivelmente devido à oxidação de algum dos componentes das formulações. No entanto, estes resultados não são concordantes com os resultados obtidos para os valores da luminosidade segundo os quais as amostras tornaram-se ligeiramente mais claras ao longo do tempo (L^* aumentou). Na formulação 4A o parâmetro *Chroma* aumentou de 2,16 para 3,16. Na formulação 5A o aumento foi maior, passando de 4,38 para 5,45.

A maior quantidade de COL na formulação 5A contribuiu para um valor de parâmetro *Chroma* mais elevado, ou seja, para uma amostra ligeiramente mais escura estando, neste caso, de acordo com os resultados obtidos para a luminosidade devido ao tom amarelado do COL.

No trabalho realizado por Silva (43) o creme sem AH e com 5% (m/m) de COL, a mesma quantidade utilizada na formulação 5A, apresentou passado sete dias, um valor de luminosidade menor que o obtido com a 5A e um valor de parâmetro *Chroma* também menor.

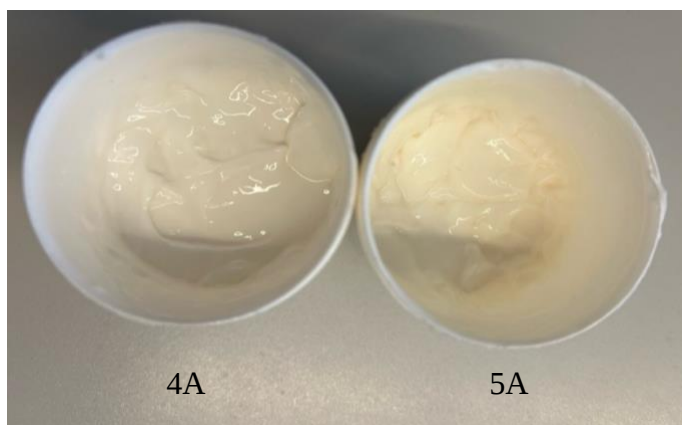


Figura 29. Aspeto das formulações 4A e 5A.

Na figura 29 é apresentado o aspeto dos cremes 4A e 5A, cuja análise visual permite comprovar que a formulação 5A apresentou uma tonalidade mais amarelada.

3.1.3 Ensaio reológico

A viscosidade dos cremes contendo diferentes percentagens de AH foi avaliada 7 dias após a preparação e os resultados encontram-se representados na figura 30.

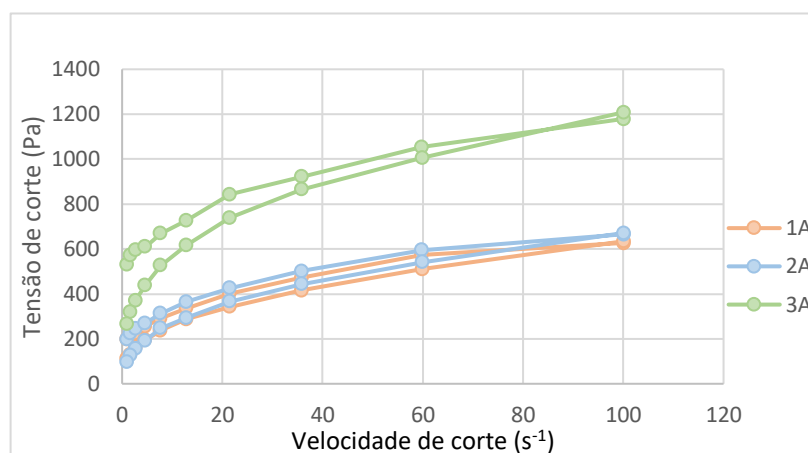


Figura 30. Reogramas das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura de 20°C.

Como seria de esperar uma maior quantidade de AH (formulação 3A) deu origem a uma maior viscosidade do creme (valor de tensão de corte de 1209 Pa para uma velocidade de corte de 100 s⁻¹). O valor máximo de tensão de corte para a formulação 1A (com 1% de AH) foi de 634,6 Pa e para a formulação 2A (com 1,5% de AH) foi de 665,3 Pa, valores muito próximos, mas bastante diferentes do da formulação 3A (com 2% de AH). Todos os cremes demonstraram ter um comportamento pseudoplástico ou reofluidificante, com tensão de cedência e uma ligeira tixotropia.

As figuras 31 e 32 dizem respeito à variação da viscosidade ao longo do tempo para as formulações 4A e 5A, respetivamente.

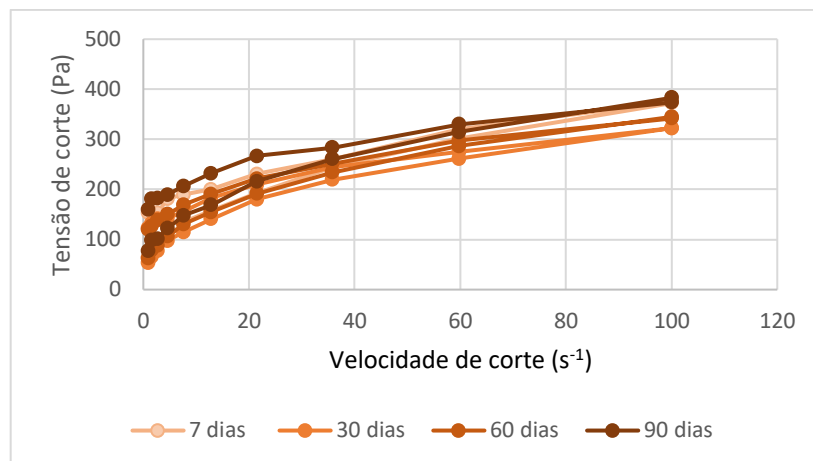


Figura 31. Reogramas da formulação 4A ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.

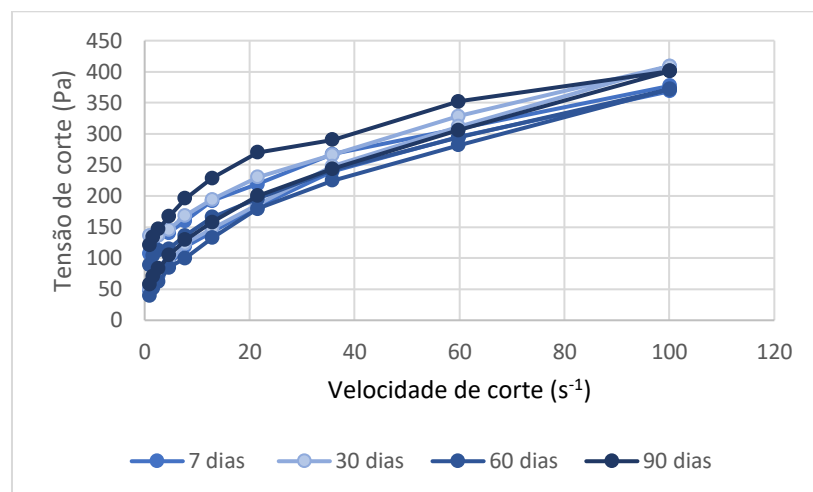


Figura 32. Reogramas da formulação 5A ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.

Pode considerar-se que as formulações não apresentaram grandes variações de viscosidade ao longo do tempo. Estas formulações apresentaram também um comportamento pseudoplástico, com tensão de cedência e ligeira tixotropia. No caso da formulação 4A (com 2,5% de COL) a tensão de corte máxima foi de 374,2 Pa e na 5A este valor foi de 400,8 Pa, verificando-se que a quantidade de COL não interferiu consideravelmente na viscosidade das formulações.

Num estudo realizado por *Makvandi et al.* (73) foi desenvolvido um creme com 1% (m/m) de AH tendo sido também observado um comportamento pseudoplástico com ligeira tixotropia.

Noutro trabalho realizado por *Danila et al.* (74) produziram-se cremes contendo COL em diferentes quantidades e também se obteve um comportamento pseudoplástico com tixotropia para ambos. A diferença na quantidade de COL também não contribuiu para a tensão de corte máxima que foi de aproximadamente 200 Pa, à temperatura de 24 °C.

3.1.4 Ensaio estabilidade acelerada por centrifugação

Em nenhuma das formulações ocorreu separação de fases, precipitação, ou outro efeito relacionado com instabilidade física.

A figura 33 apresenta os resultados obtidos para as formulações 4A e 5A após serem submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação no dia da preparação.

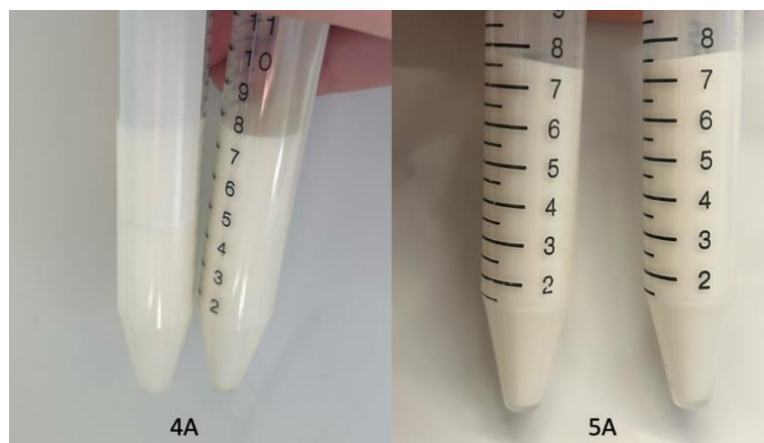


Figura 33. Estabilidade acelerada por centrifugação das formulações 4A e 5A.

O ensaio foi repetido após 7 dias de preparação para as formulações 4A e 5A, não se tendo observado também a separação de fases.

3.1.5 Avaliação da textura

A partir da análise da textura obtiveram-se gráficos como o representado na figura 34. No gráfico deste tipo a força máxima corresponde à firmeza e a adesividade corresponde à área negativa.

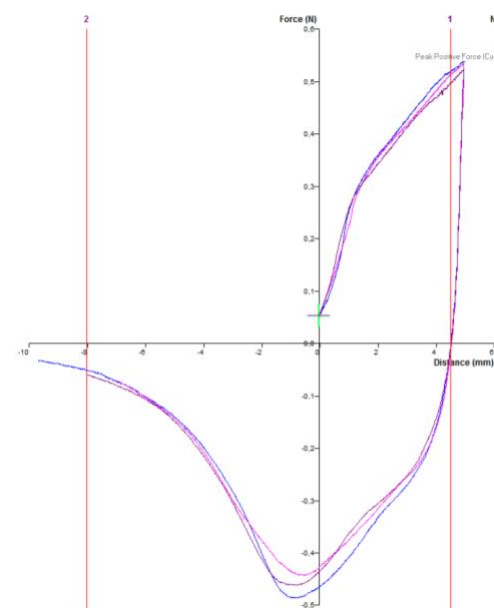


Figura 34. Gráfico da força máxima em função da distância para a formulação 5A.

As figuras 35 e 36 dizem respeito aos gráficos da firmeza e da adesividade, respectivamente, para as formulações 1A, 2A e 3A, parâmetros de textura avaliados 7 dias após a preparação das formulações.

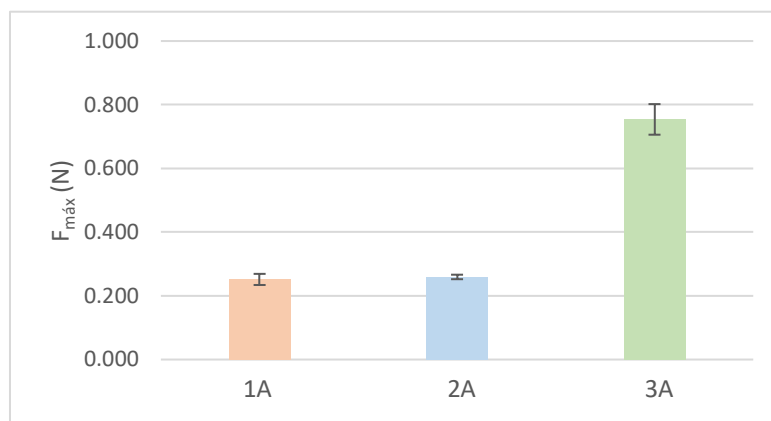


Figura 35. Firmeza das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura ambiente.

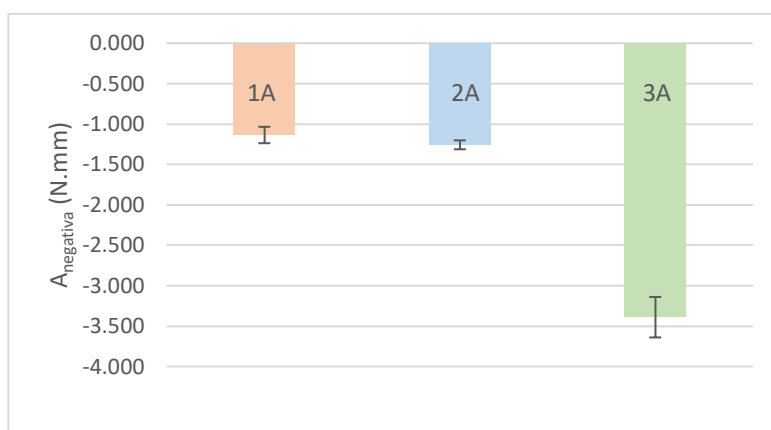


Figura 36. Adesividade das formulações 1A, 2A e 3A, à temperatura ambiente.

Em concordância com a viscosidade, o creme contendo 2% de AH (formulação 3A) apresentou maior firmeza ($0,647 \pm 0,032$ N) e adesividade ($-2,219 \pm 0,515$ N.mm), sendo, portanto, o mais consistente. Nas formulações 1A e 2A os valores da firmeza ($0,151 \pm 0,012$ N e $0,216 \pm 0,014$ N, respectivamente) foram relativamente próximos. No entanto, os valores da adesividade ($-0,551 \pm 0,016$ N.mm e $-0,809 \pm 0,049$ N.mm), apresentaram uma diferença considerável.

Para as formulações 4A e 5A os resultados da textura em função do tempo estão apresentados nas figuras 37 e 38.

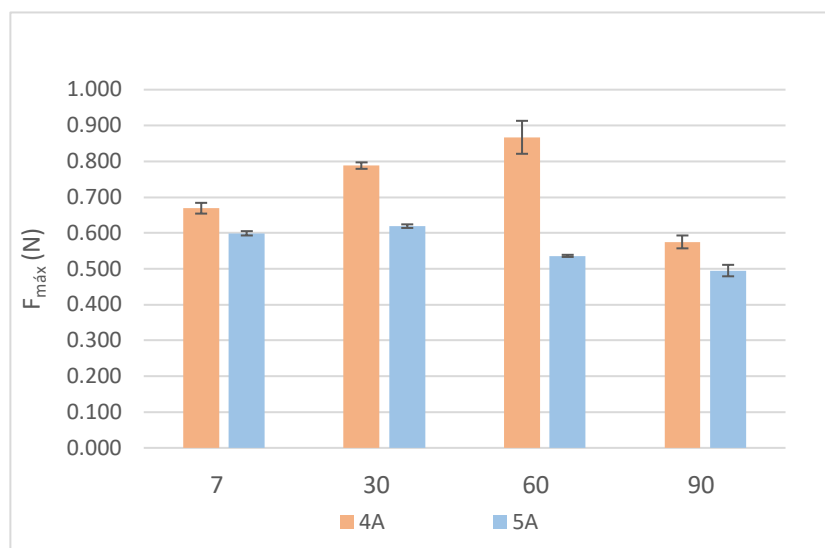


Figura 37. Firmeza das formulações 4A e 5A, ao longo de 90 dias, à temperatura ambiente.

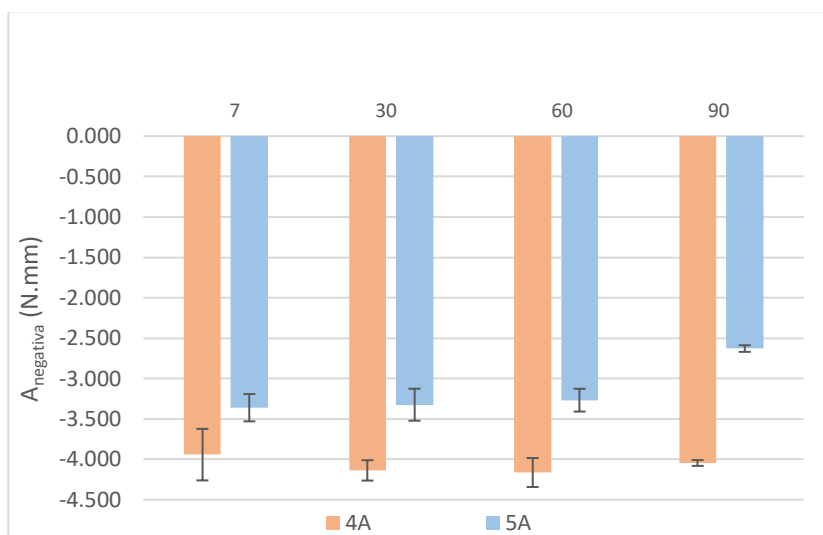


Figura 38. Adesividade das formulações 4A e 5A, ao longo de 90 dias, à temperatura ambiente.

O aumento da percentagem de COL (formulação 5A, com 5% de COL) provocou uma diminuição da firmeza e da adesividade o que seria de esperar tendo em conta que o CH possui baixa massa molecular e elevada solubilidade em água, não permitindo formar uma rede coesa que aumente a consistência da formulação.

Em termos de avaliação da estabilidade, a firmeza aumentou até aos 60 dias no caso da formulação 4A (de $0,669 \pm 0,015$ N para $0,867 \pm 0,046$ N), mas diminuiu ao fim de 90 dias. Na preparação 5A a firmeza diminuiu (de $0,599 \pm 0,006$ N para $0,495 \pm 0,016$ N). Relativamente à adesividade, na formulação 4A manteve-se sem grande alteração ao longo de 90 dias (de $-3,942 \pm 0,319$ N.mm para $-4,045 \pm 0,036$ N.mm). Já para a formulação 5A a adesividade diminuiu ao longo de 90 dias (de $-3,361 \pm 0,169$ N.mm para $-2,629 \pm 0,041$ N.mm). Assim, a formulação 4A, com menor quantidade de COL apresentou uma maior consistência, prevendo-se que permanecerá mais tempo em contacto com a pele.

Através da análise estatística realizada para as formulações 4A e 5A, após consideração de variâncias iguais ($p > 0,05$ no teste de F), a comparação através do teste t de *Student*, entre os resultados das medições dos dias 7 e 90, permitiram concluir que para ambas as formulações os resultados da firmeza foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Para as medições relativas à adesividade as variâncias também foram consideradas iguais depois da realização do teste F e pelo teste t de *Student* os resultados foram considerados estatisticamente iguais na 4A ($p > 0,05$) e estatisticamente diferentes na 5A ($p < 0,05$).

Num trabalho realizado por *Danila et al.* (75) num creme O/A contendo 2% (m/m) de COL (quantidade semelhante à utilizada em 4A) foi possível obter uma força máxima média de $0,363 \pm 0,009$ N, valor ligeiramente abaixo do obtido neste trabalho, o que seria expectável tendo em conta que o AH tem tendência a aumentar a firmeza das preparações. Noutro estudo realizado por Oliveira (76) também foi desenvolvido um creme contendo ácido hialurónico a 0,5% (m/m), metade da quantidade usada em 4A e 5A e obteve um valor de firmeza de 0,900 N ao fim de 90 dias, valor mais elevado comparando com o obtido neste trabalho, realçando assim o facto de a adição de COL à formulação diminuir a consistência da mesma.

3.1.6 Análise da espalhabilidade

Na figura 39 encontra-se o gráfico correspondente à avaliação da espalhabilidade. A área positiva foi o parâmetro analisado.

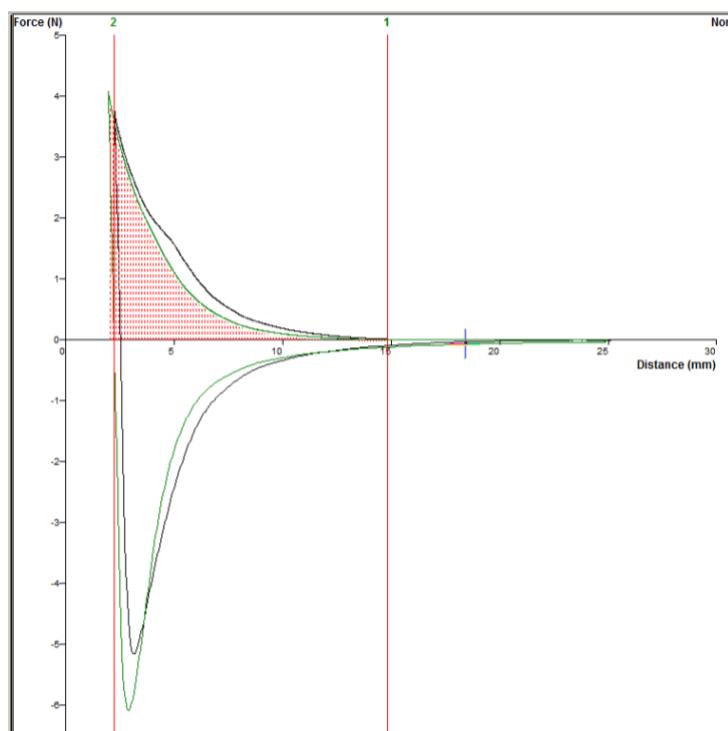


Figura 39. Representação gráfica da espalhabilidade da formulação 5A.

Os resultados do ensaio da espalhabilidade também permitiram inferir sobre a consistência das preparações e encontram-se representados na figura 40.

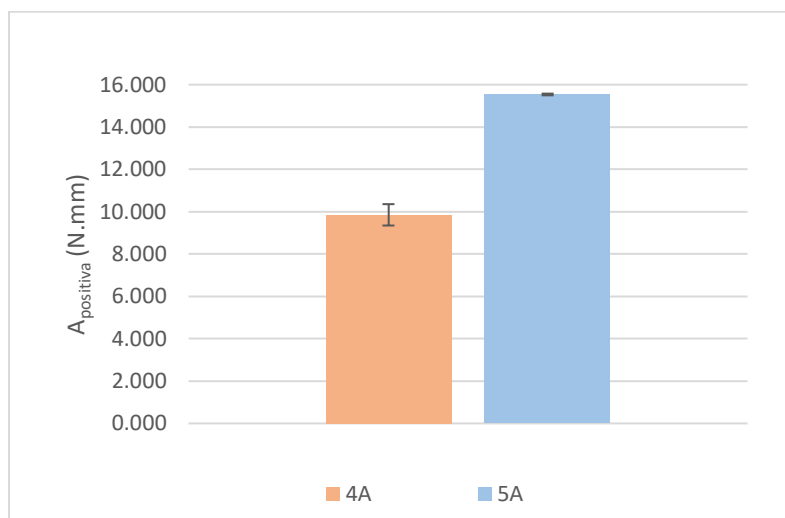


Figura 40. Espalhabilidade das formulações 4A e 5A, à temperatura ambiente.

O gráfico mostra que para a formulação 4A (contendo 2,5%COL) a espalhabilidade na pele é menor ($9,853 \pm 0,505$ N.mm) o que está de acordo com os resultados obtidos no ensaio da firmeza e textura (preparação com maior firmeza e adesividade) e em 5A a espalhabilidade é maior ($15,538 \pm 0,041$ N.mm) tendo em conta que a formulação ao ser menos consistente se espalha mais facilmente na pele. Este ensaio de espalhabilidade pode também ser realizado recorrendo à análise sensorial por um painel de avaliadores, no entanto, neste caso, apenas é possível uma avaliação qualitativa deste parâmetro. Por exemplo, no trabalho realizado por *Deambrozi et al.* (77) foi desenvolvido um creme hidratante contendo 2% (m/m) de COL e foi realizada uma análise sensorial por 30 voluntários, para avaliação da espalhabilidade. Quase todos os voluntários avaliaram o produto como tendo boa espalhabilidade.

3.2 Preparação das emulsões múltiplas gelificadas

Inicialmente desenvolveram-se emulsões múltiplas A/O/A em que se adicionou o COL e o AH na fase aquosa mais interna, resultando na formulação 1B e 2B. Como na formulação 1B se verificou separação de fases, na 2B aumentou-se a percentagem de agente emulsivo (*Tween*[®] 80), mas voltou a verificar-se separação de fases. Para verificar se seria o AH ou o COL a provocar esta separação de fases, preparou-se uma emulsão apenas com AH (3B) e outra apenas com COL (4B), ambos na fase aquosa interna, tendo-se verificado em 3B a separação de fases, mas em 4B não. Tendo em conta este resultado, a tentativa seguinte consistiu em manter o COL na fase aquosa interna e o AH na fase aquosa externa (formulação 5B). O resultado não foi o esperado porque continuou a ocorrer separação de fases. Então aumentou-se a quantidade de AH a fim de tentar contornar o problema (formulação 6B). No entanto, esta emulsão também sofreu separação de fases. Como o AH é bastante higroscópico as tentativas seguintes consistiram em adicioná-lo após a preparação da emulsão múltipla, funcionando como agente gelificante. Optou-se então por preparar a emulsão tripla e só posteriormente adicionar o AH em três quantidades diferentes, 2%, 2,5% e 5% (formulações 7B, 8B e 9B, respetivamente). Nestas três últimas emulsões não se verificou separação de fases. Contudo, no caso da formulação 7B, que continha menor quantidade de AH, não se verificou a consistência pretendida pelo que, a caracterização completa e o estudo de estabilidade apenas se realizou para as formulações 8B e 9B. Nos anexos 1,2 e 3 encontram-se os resultados da caracterização feitos no dia 0 e 7 dias após a preparação da formulação 7B.

Kupper et al. (78), também prepararam uma microemulsão onde incorporaram ácido hialurónico e colagénio, de baixa e elevada massa molecular. Como tensioativos usaram uma mistura de *Span*[®] 80 e *Tween*[®] 80. Na caracterização do sistema avaliaram a condutividade, o tamanho das gotículas, as propriedades reológicas, o índice de polidispersão e a inversão de fase. Os resultados permitiram concluir que o colagénio, dependendo da sua massa molecular, afetou o tamanho das gotículas e o ácido hialurónico, principalmente o de alta massa molecular, provocou alterações na viscosidade devido à sua grande capacidade de estabelecer ligações com a água e formar um hidrogel.

3.3 Caracterização das emulsões múltiplas gelificadas

Como mencionado anteriormente, apenas as formulações 8B (contendo 2,5% de AH) e 9B (contendo 5% de AH) apresentaram as características pretendidas, pelo que o estudo de estabilidade ao longo do tempo foi efetuado apenas para estas emulsões gelificadas.

3.3.1 Medição do tamanho das gotículas

O tamanho das gotículas da fase oleosa das formulações 8B e 9B foi avaliado pelo método descrito em 2.3.2.1.

Tabela 13. Tamanho das gotículas das formulações 8B e 9B (apresentados sob a forma de percentis médios e dos respetivos coeficientes de variação) e valor de *Span*.

	D ₁₀ (µm)	CV (%)	D ₅₀ (µm)	CV (%)	D ₉₀ (µm)	CV (%)	<i>Span</i>
8B com AH	0,331	0,020	0,633	0,050	1,720	0,112	2,238
9B com AH	0,297	0,056	0,533	0,036	1,270	0,179	1,819

Na tabela 13, D₁₀, D₅₀ e D₉₀ representam a percentagem (10%, 50% e 90%, respetivamente) das gotículas que apresentam diâmetro inferior ou igual aos valores obtidos. Isto é, na formulação 8B 10% das gotículas possuíam tamanho inferior ou igual a 0,331 µm.

Verificou-se que o valor da mediana da 8B (0,633 µm) foi superior ao da 9B (0,533 µm). A maior quantidade de AH (formulação 9B) contribuiu para diminuir os tamanhos das gotículas uma vez que o AH forma uma rede coesa limitando o movimento das partículas dispersas e impedindo que estas se aproximem.

Através do valor de *Span* é possível inferir acerca da polidispersão das gotículas, sendo que valores mais próximos de 1 representam tamanhos das gotículas mais uniformes (79). Assim, a formulação 9B apresentou gotículas com menor polidispersão (*Span* = 1,819) que a formulação 8B (*Span* = 2,238).

Tendo em conta os resultados do D₅₀ obtidos em ambas as emulsões (> 0,100 µm), estas não podem ser consideradas microemulsões.

3.3.2 Ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação

As formulações 8B e 9B foram submetidas ao ensaio de estabilidade acelerada por centrifugação antes e após a adição do AH (gelificante). O registo fotográfico após este ensaio está presente na figura 41.

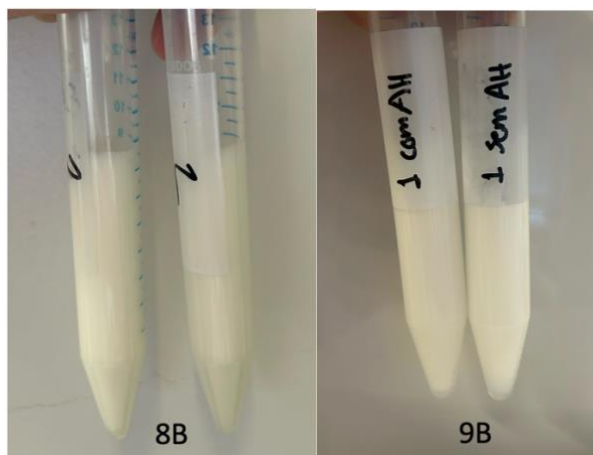


Figura 41. Estabilidade acelerada por centrifugação das formulações 8B e 9B.

Como verificado na figura 41 para ambas as formulações após 2 ciclos de centrifugação de 30 min a 3500 rpm, não houve separação de fases nem antes nem após adição do AH o que comprova a estabilidade física destas formulações.

3.3.3 Determinação do pH

O pH para 8B e 9B foi avaliado no dia da preparação e 7, 30, 60 e 90 dias após a preparação. Os resultados encontram-se na figura 42.

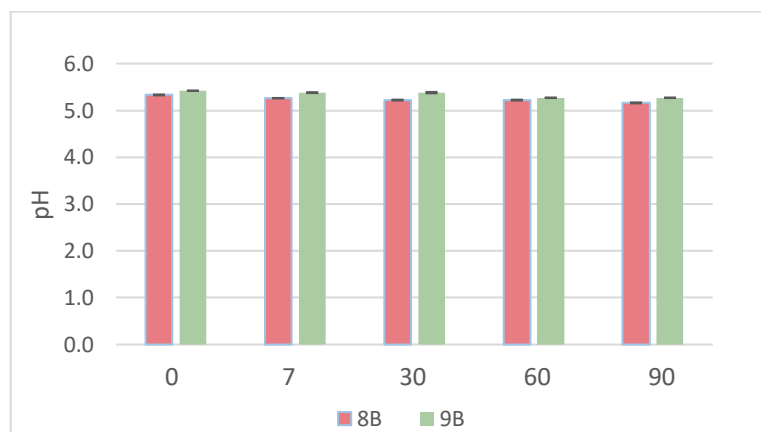


Figura 42. Resultados do pH das emulsões gelificadas 8B e 9B, ao longo de 90 dias.

Através da análise do gráfico verificou-se que para ambas as formulações o pH diminuiu ligeiramente ao longo do tempo. Na formulação 8B (contendo 2,5% de AH) o pH inicial obtido foi de $5,33 \pm 0,01$ e ao fim de 90 dias este valor baixou para $5,16 \pm 0,01$. Na formulação 9B (contendo 5% de AH) o pH no tempo 0 foi de $5,42 \pm 0,01$ e passados 90 dias foi de $5,27 \pm 0,01$. Ao longo do tempo os valores de pH obtidos foram sempre compatíveis com o pH da pele.

Para uma maior quantidade de AH verificaram-se valores de pH ligeiramente mais elevados, ou seja, o AH tornou a formulação menos ácida uma vez que neste trabalho foi utilizado o hialuronato de sódio (sal sódico do AH).

Na realização do teste F foi possível considerar as variâncias iguais ($p > 0,05$) e de seguida, o teste t de *Student* demonstrou que tanto para 8B como para 9B, comparando os resultados obtidos no dia 7 e 90, estes foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Comparando os resultados de pH dos cremes descritos em 3.1.1 com os obtidos para as emulsões gelificadas conclui-se que apesar das emulsões não conterem TEA, apresentaram valores de pH próximos com os dos cremes talvez devido à maior quantidade de AH.

3.3.4 Análise da cor

Na tabela 14 está representada a variação da luminosidade ao longo do tempo para as formulações 8B e 9B.

Tabela 14. Luminosidade das formulações 8B e 9B. Os resultados correspondem à média de três medições $\pm$ desvio padrão.

Dia	L*	
	8B	9B
0	86,14 $\pm$ 0,01	83,59 $\pm$ 0,01
7	85,97 $\pm$ 0,00	84,60 $\pm$ 0,01
30	84,75 $\pm$ 0,01	83,59 $\pm$ 0,01
60	84,24 $\pm$ 0,00	83,72 $\pm$ 0,00
90	83,60 $\pm$ 0,01	83,54 $\pm$ 0,00

De acordo com os resultados obtidos, a formulação 8B escureceu uma vez que os valores de luminosidades baixaram ao longo do tempo de 86,14 $\pm$ 0,01 para 83,60 $\pm$ 0,01. Já para a formulação 9B os valores de luminosidade praticamente não sofreram alterações ao longo do tempo (83,59 $\pm$ 0,01 para 83,54 $\pm$ 0,00). A cor de ambas as formulações pode ser considerada branca visto apresentarem valores de luminosidade próximos de 100.

A variação do parâmetro *Chroma* para 8B e 9B encontra-se no gráfico da figura 43.

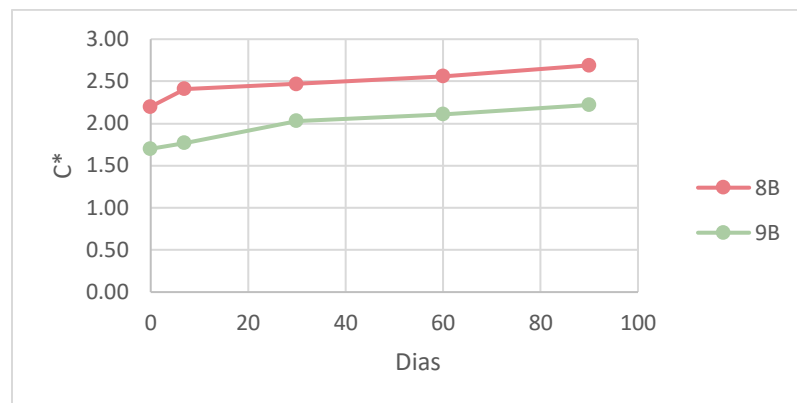


Figura 43. Gráfico da variação do parâmetro *Chroma* em função do tempo para as formulações 8B e 9B.

Para ambas as formulações o parâmetro *Chroma* aumentou ligeiramente o que significa que as amostras escureceram. Na formulação 8B o aumento foi de 2,20 para 2,69 e na formulação 9B foi de 1,20 para 2,22. A formulação 8B apresentou valores mais elevados que a 9B, ou seja, é uma amostra ligeiramente mais escura, o que pode ser justificado devido à maior percentagem de AH, um pó branco, na formulação 9B.

Em 3.1.2, para o creme 5A o parâmetro *Chroma* para 7 e 90 dias após a preparação foi de 4,38 e 5,45, respetivamente, enquanto nestas emulsões, que apresentavam a mesma quantidade de COL que a 5A, estes valores, para os mesmos tempos, foram de 2,41 e 2,69 no caso da 8B e 1,77 e 2,22 no caso da 9B. Verificou-se, assim, que para uma maior quantidade de AH (caso da 8B e 9B), o parâmetro *Chroma* foi menor, ou seja, a amostra apresentou uma cor mais clara, o que pode ser justificado devido à cor branca do AH.

Na figura 44, pode verificar-se que a cor das formulações 8B e 9B era semelhante.

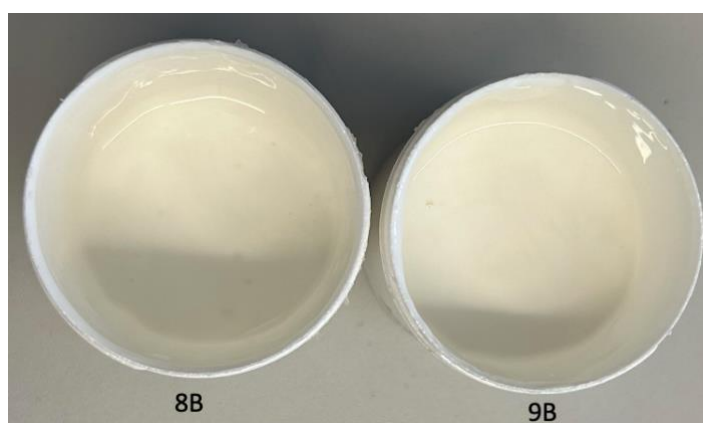


Figura 44. Aspeto das formulações 8B e 9B.

3.3.5 Ensaio reológico

A variação da viscosidade ao longo do tempo para as formulações 8B e 9B está representada nas figuras 45 e 46, respetivamente.

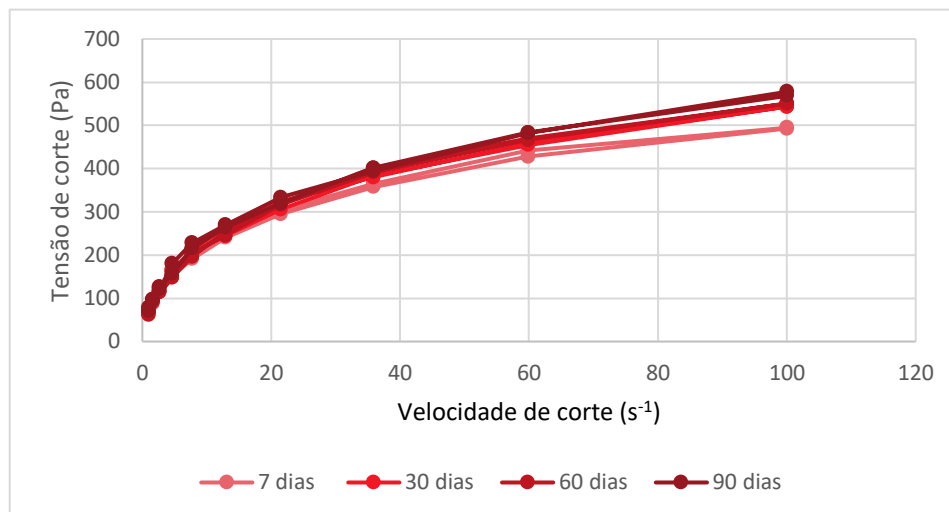


Figura 45. Reogramas da formulação 8B ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.

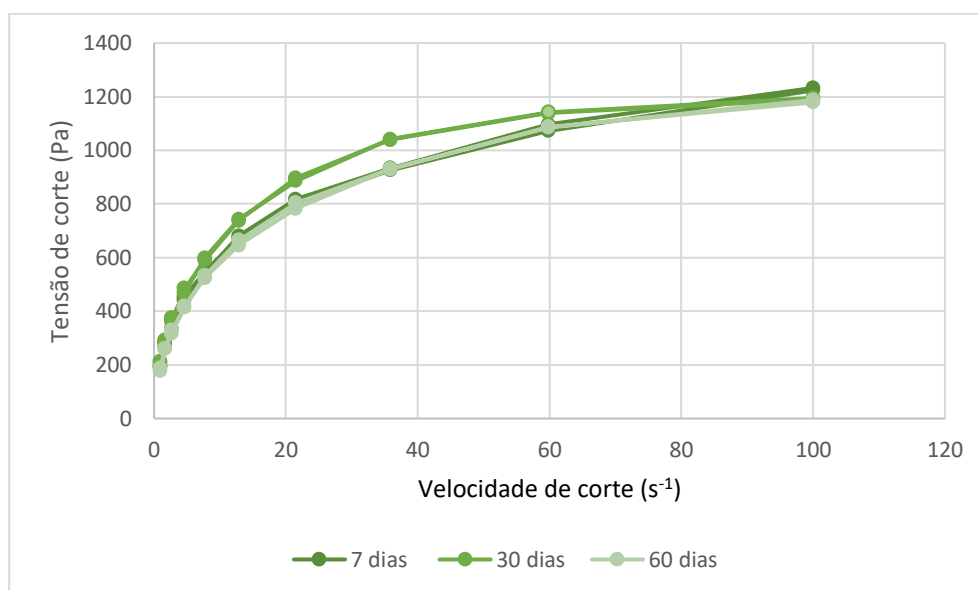


Figura 46. Reogramas da formulação 9B ao longo do tempo, à temperatura de 20°C.

Pela análise de ambos os gráficos pode-se considerar que ao longo do tempo as formulações mantiveram a sua viscosidade e apresentaram um comportamento pseudoplástico, com tensão de cedência. Aos 60 dias após a preparação a tensão de corte máxima para a 8B (contendo 2,5% de AH) foi de 550,8 Pa e para a 9B (contendo 5% de AH) este valor foi de 1188 Pa, verificando-se que, como seria de esperar, devido à maior quantidade de AH a amostra ficou demasiado consistente, não tendo sido possível efetuar a medição ao fim de 90 dias.

Estes resultados, quando comparados com os obtidos para os cremes em 3.1.3 onde a tensão de corte máxima para a mesma quantidade de COL foi de 400,8 Pa, realçam a influência do AH na viscosidade visto que em 3.1.3 a percentagem de AH foi de 1% e nas emulsões gelificadas foi de 2,5% e 5%.

Num trabalho realizado por Gomes (80) foram desenvolvidas emulsões A/O/A com e sem cafeína e gelificadas com Carbopol® 980 (0,5% (m/m)). Na emulsão que não continha cafeína a tensão de corte máxima foi de ~300 Pa, cerca de metade do valor obtido na emulsão múltipla gelificada com AH (formulação 8B), reforçando o papel do AH no aumento da viscosidade das formulações.

3.3.6 Análise da textura

Tal como nos cremes, a partir da análise da textura obtiveram-se gráficos como o representado na figura 47 onde a força máxima corresponde à firmeza e a área negativa corresponde à adesividade.

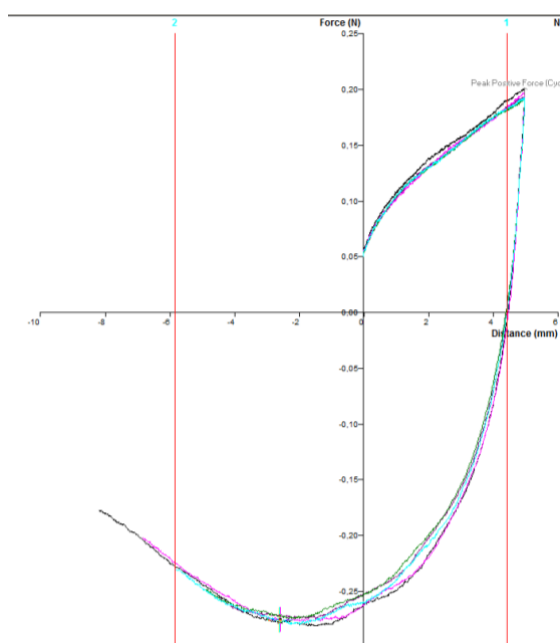


Figura 47. Gráfico da força máxima em função da distância para a formulação 9B.

É de realçar que neste gráfico o perfil não regressa ao eixo da distância uma vez que a formulação era bastante adesiva, permanecendo aderida à sonda. Este facto pode ser observado na figura 48 onde se verifica que a formulação permaneceu unida à sonda quando esta retornou à posição inicial.



Figura 48. Adesividade da formulação 9B.

Nas figuras 49 e 50 estão representados, respetivamente, os resultados da firmeza e da adesividade das formulações 8B e 9B ao longo de 90 dias de armazenamento a 25°C.

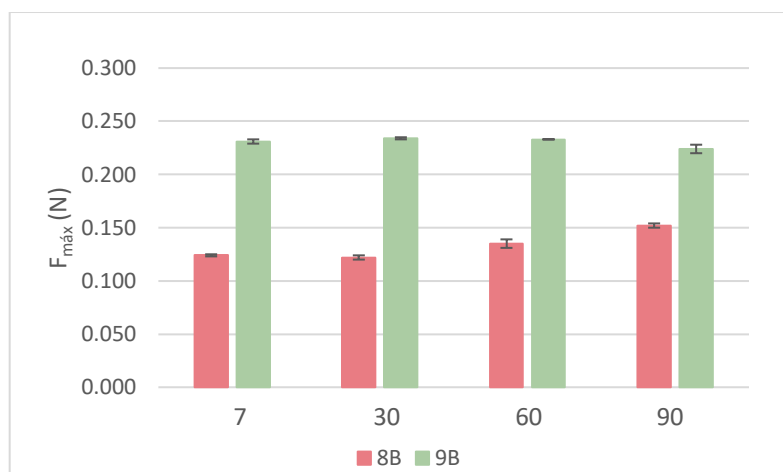


Figura 49. Firmeza das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.

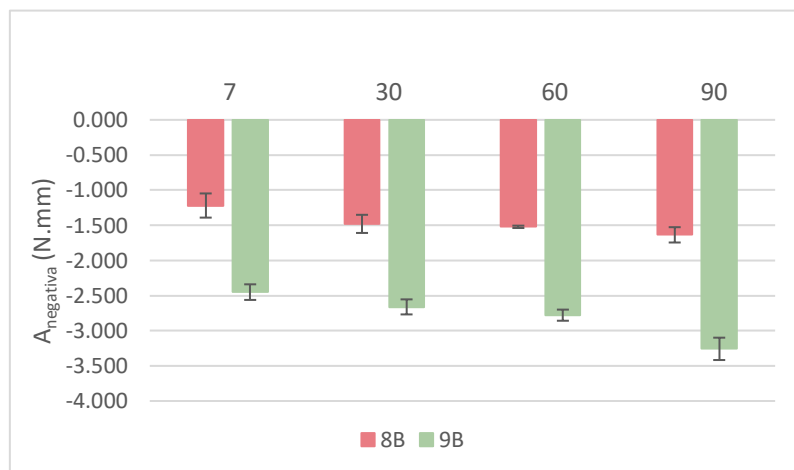


Figura 50. Adesividade das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.

Como seria de esperar tendo em consideração a sua maior viscosidade, a formulação 9B (contendo 5% de AH) apresentou valores de firmeza e de adesividade mais elevados, demonstrando ser mais consistente.

Relativamente à firmeza, no caso da 8B o valor da força máxima aumentou de $0,128 \pm 0,003$ N aos 7 dias para $0,152 \pm 0,002$ N aos 90 dias após preparação. No caso da 9B os valores foram bastante próximos entre si ($0,231 \pm 0,002$ N e $0,224 \pm 0,004$ N).

Para a adesividade, as conclusões são semelhantes, tanto para a 8B como para a 9B os valores de área negativa aumentaram, sendo que para maior quantidade de AH (9B) os valores foram mais elevados. Na 8B o aumento foi de $-1,219 \pm 0,172$ N.mm para $-1,636 \pm 0,109$ N.mm e na 9B foi de $-2,451 \pm 0,111$ N.mm para $-3,258 \pm 0,159$ N.mm.

Através da análise estatística realizada para as formulações 8B e 9B, após consideração de variâncias iguais ($p > 0,05$ no teste de F), a comparação através do teste t de *Student*, entre os resultados das medições dos dias 7 e 90, permitiram concluir que para ambas as formulações os resultados da firmeza foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Para as medições relativas à adesividade as variâncias também foram consideradas iguais depois da realização do teste F e pelo teste t de *Student* os resultados também foram considerados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

No caso dos resultados obtidos em 3.1.6 para o creme 5A, contrariamente aos obtidos para 8B e 9B, verificou-se uma diminuição da adesividade ao longo do tempo. Comparando o valor ao fim de 90 dias do creme 5A ($-2,629 \pm 0,041$ N.mm) com o obtido com a emulsão gelificada 9B ($-3,258 \pm 0,159$ N.mm) comprova-se mais uma vez que o AH aumentou a consistência das formulações quando aumentado para 5%, mas o mesmo não ocorreu quando aumentado apenas para 2,5%.

Num estudo realizado por Xavier (81) foram preparadas emulsões múltiplas A/O/A sem e com extrato de Centelha Asiática, gelificadas com 0,5% (m/m) de Carbopol® 940. Para a formulação sem extrato de Centelha asiática o valor de firmeza medido 8 dias após a preparação foi de $\sim 0,250$ N, valor semelhante ao obtido neste trabalho no caso da formulação 9B.

3.3.7 Análise da espalhabilidade

Na análise da espalhabilidade que também permite concluir sobre a consistência das preparações, o parâmetro avaliado foi a área positiva e os resultados estão representados na figura 51.

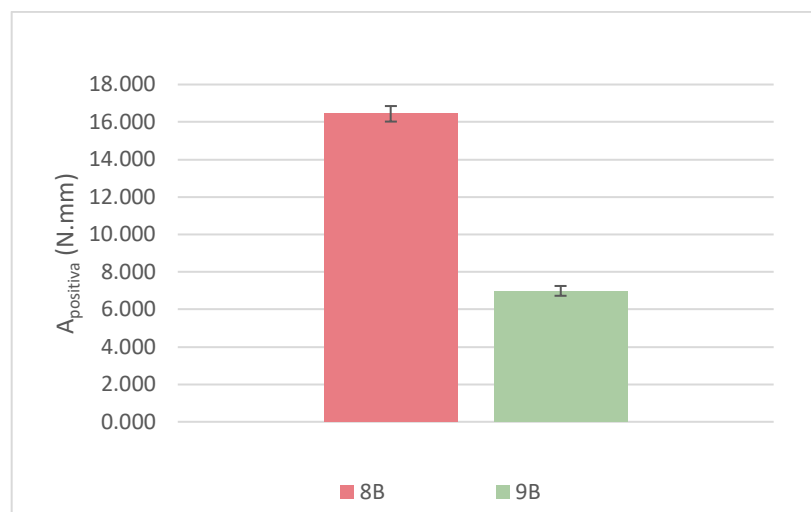


Figura 51. Espalhabilidade das formulações 8B e 9B, à temperatura ambiente.

Pela análise do gráfico é possível concluir que tal como verificado na análise da firmeza e da adesividade, a emulsão gelificada 9B apresentou menor espalhabilidade o que se justifica com o facto da preparação ser mais consistente e, por isso, mais difícil de espalhar na pele. Para a 9B o valor da área positiva foi de $6,987 \pm 0,262$ N.mm, enquanto para a 8B o valor foi de $16,437 \pm 0,415$ N.mm.

Comparando estes valores com os obtidos para os cremes em 3.1.6 é possível concluir que o creme com maior espalhabilidade apresentou um valor de $15,538 \pm 0,041$ N.mm, ou seja, uma menor espalhabilidade que a emulsão gelificada 8B ($16,437 \pm 0,415$ N.mm).

Num trabalho realizado por Silva (43) preparou-se uma emulsão A/O/A contendo 5% COL (semelhante à 9B), mas gelificada com 0,5% (m/m) de Gelificante PFC®, cujo valor da espalhabilidade foi de 10 N.mm, valor ligeiramente superior ao obtido na emulsão gelificada com 5% de AH (9B).

3.4 Preparação das películas

As formulações 1C, 2C e 3C contendo 2,5% de COL e 2,5, 1,5 e 1,0%, de glicerina como plastificante, respetivamente, deram origem a películas bastante pegajosas e difíceis de destacar das placas de Petri mesmo após 72h na estufa a 40°C. A formulação 4C (com apenas 0,5% de glicerina) originou uma película seca, contudo não destacável da placa de Petri, como se pode verificar na figura 52.



Figura 52. Película obtida a partir da dispersão do colagénio em água e glicerina.

Concluiu-se assim que as películas apenas com colagénio e glicerina não eram uma boa opção tendo sido testados posteriormente outros polímeros.

A partir das formulações 1D, 2D e 3D (contendo COL e AH dispersos numa solução de alginato de sódio adicionada de 1,4% de glicerina) obtiveram-se películas muito secas, tendo-se preparado a formulação 4D com maior percentagem de glicerina (2,5%, mas sem AH) para tentar contornar este problema. A formulação 4D originou películas secas, fáceis de destacar, mas com bolhas e bastante resistentes, não tendo sido possível realizar o ensaio de extensibilidade (figura 53). No anexo 4 está representado o reograma da formulação 4D.

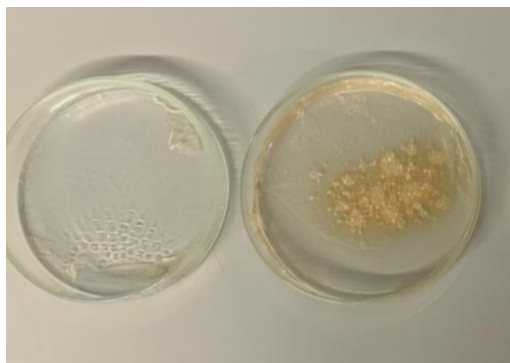


Figura 53. Películas de COL disperso em solução de alginato de sódio.

Para as formulações preparadas dispersando 1% de COL numa solução de HEC, com 2,5 e 2,0% de glicerina (1E e 2E, respetivamente) as películas resultantes estavam bastante pegajosas e não se destacaram da placa de Petri (figura 54). No anexo 5 está representado o reograma da formulação 1E.



Figura 54. Películas de HEC.

Procedeu-se à preparação de películas constituídas por 2% de Carbopol® 940, 2,5% de glicerina, 1% de colagénio dispersos em água purificada. No entanto, esta dispersão não ficou homogénea, tendo-se observado a presença de um precipitado devido, provavelmente, à incompatibilidade entre o Carbopol® e o COL.

Prepararam-se então várias películas contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) (formulações 1F a 9F). No entanto, apenas as formulações 6F e 7F (com 0,5% de AH e 0,5% de COL, respetivamente), além da HPMC a 1%, originaram películas fáceis de destacar. Finalmente, decidiu-se formar películas com os 2 componentes, COL e AH, simultaneamente, uma de camada simples e outra de camada dupla (8F e 9F, respetivamente), tendo-se obtido películas com as características pretendidas (figura 55).

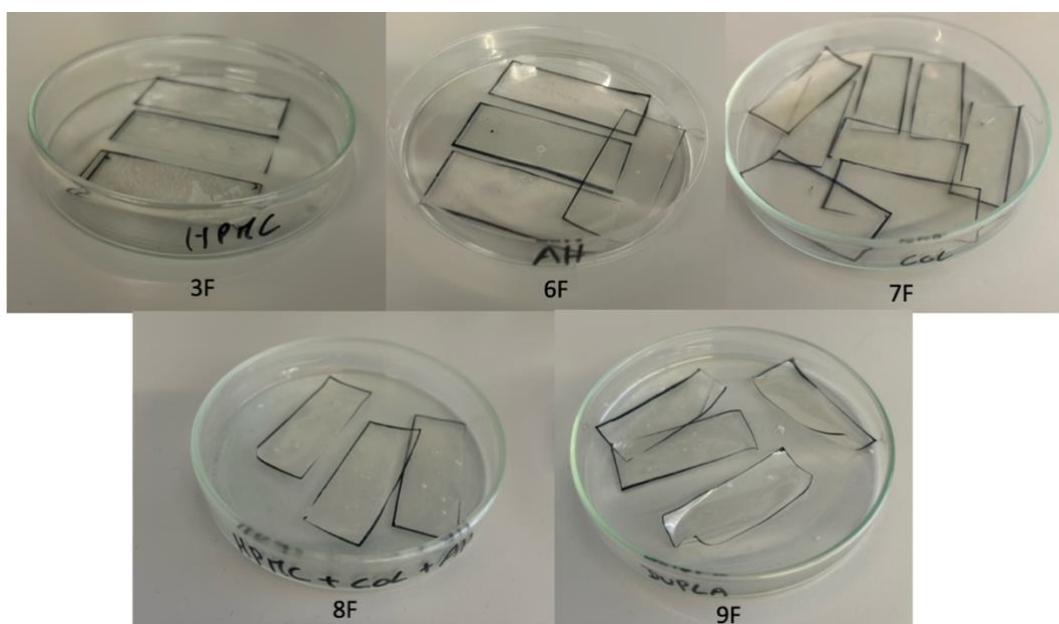


Figura 55. Películas de HPMC (3F), HPMC+AH (6F), HPMC + COL (7F), HPMC + COL + AH (8F) e dupla camada (9F).

Assim, o melhor polímero para a preparação das películas foi a HPMC e os testes de caracterização foram realizados para as formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F. No entanto, deveria ter sido também adicionado à formulação um conservante para aumentar a estabilidade.

3.5 Caracterização das películas

3.5.1 Determinação do pH

Os resultados da figura 56 dizem respeito aos valores de pH para as dispersões de HPMC.

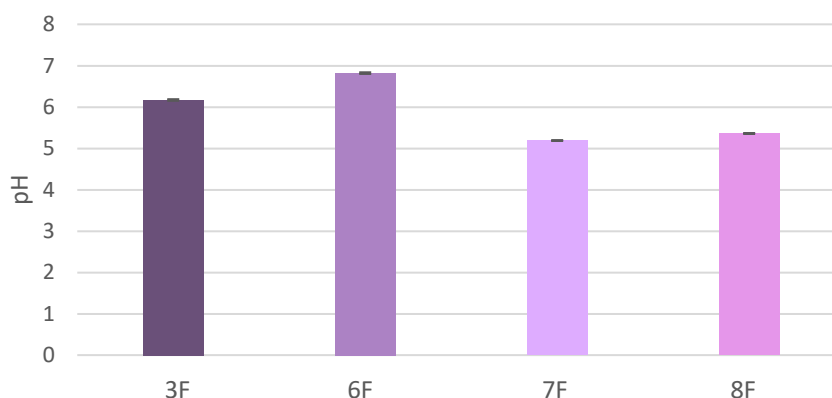


Figura 56. Resultados do pH das dispersões de HPMC.

Os valores de pH das dispersões estavam dentro dos valores pretendidos e compatíveis com a pele.

O pH obtido para 3F (apenas HPMC) foi de 6,17. Para 6F e 7F os valores foram de $6,82 \pm 0,02$ e $5,19 \pm 0,01$, respetivamente concluindo-se que o AH aumentou ligeiramente o pH, tornando a dispersão mais básica enquanto o COL tornou a dispersão mais ácida. Para a formulação 8F, que continha os dois polímeros, o pH foi de $5,36 \pm 0,01$.

Num trabalho realizado por Costa (82) foi realizada uma solução com 2% de HPMC e o valor de pH obtido foi de 6,5, valor semelhante ao obtido para a dispersão 3F, constituída por 1% de HPMC.

Birsan et al. (83) prepararam um gel com AH (1%, m/m) e carboximetilcelulose sódica e o pH obtido foi de $5,12 \pm 0,02$, valor muito próximo do obtido neste trabalho para a dispersão contendo 1% de HPMC e 0,5% de AH ($5,19 \pm 0,01$).

3.5.2 Ensaio reológico

Na figura 57 encontra-se o reograma que representa a viscosidade das dispersões de HPMC.

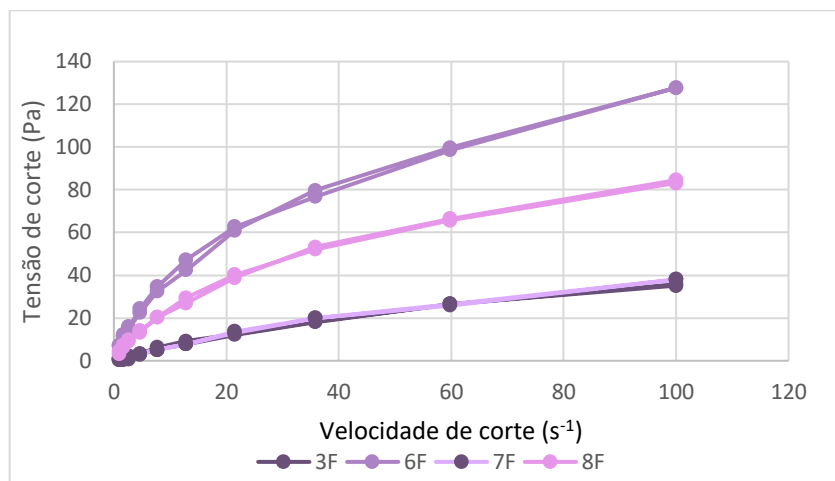


Figura 57. Reogramas das dispersões de HPMC.

Através do gráfico é possível observar que o COL (7F) não contribuiu para a viscosidade da dispersão ao contrário do AH (6F) que aumentou consideravelmente a viscosidade da dispersão de HPMC. A dispersão composta apenas por HPMC (3F) apresentou um valor máximo de tensão de corte de 35,83 Pa e no caso da dispersão com HPMC + AH o valor foi de 128,2 Pa.

A formulação 8F contendo AH e COL associados à HPMC apresentou um valor máximo de tensão de corte de 84,59 Pa.

Todas as dispersões apresentaram um comportamento reofluidificante sem tixotropia.

Nos estudos realizados por *Chaparro et al.* (84) foram preparados géis com COL e HPMC e o valor máximo de tensão de corte obtido foi de cerca de 50 Pa, valor semelhante ao obtido com a 7F.

3.5.3 Avaliação da extensibilidade

No ensaio realizado no texturómetro para avaliar a extensibilidade obteve-se um gráfico tipo, como o demonstrado na figura 58, onde o pico máximo corresponde ao valor da força máxima necessária para que as películas rompessem.

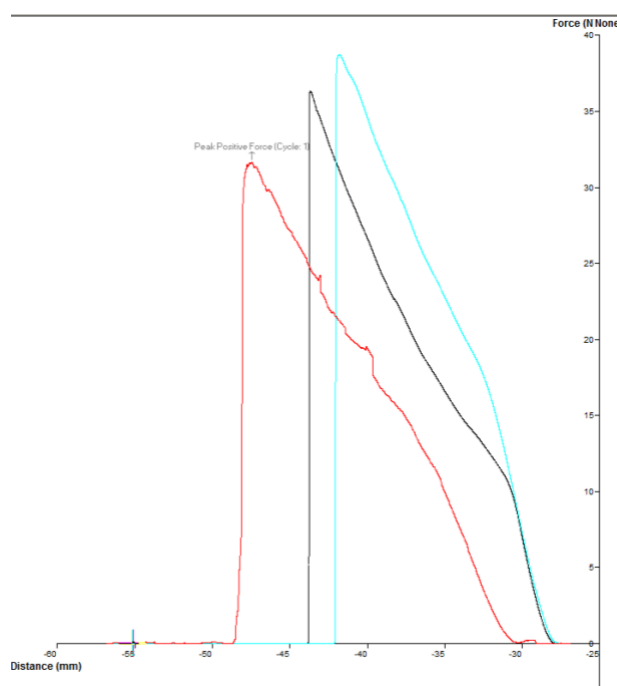


Figura 58. Extensibilidade das películas.

Os valores da força máxima para as formulações 3F, 6F, 7F, 8F e 9F são apresentados no gráfico da figura 59.

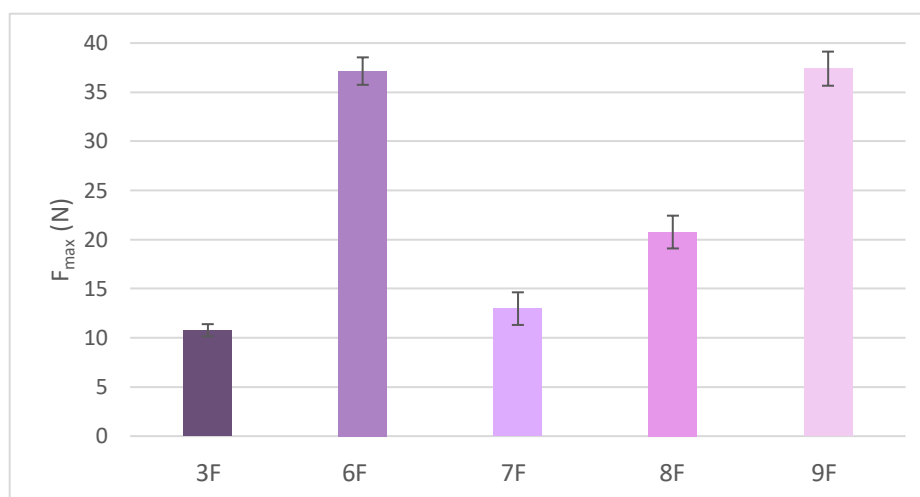


Figura 59. Extensibilidade das películas.

Como vimos anteriormente o AH contribuiu para aumentar a viscosidade da dispersão 6F e, por isso, as películas resultantes desta dispersão também apresentaram os maiores valores para a extensibilidade ($37,149 \pm 0,396$ N), sendo mais resistentes. O valor da força máxima para 3F (apenas HPMC) foi de $10,776 \pm 0,620$ N e para 7F foi de $12,974 \pm 1,659$ N o que permite concluir que o COL (7F) não afetou consideravelmente a extensibilidade das películas de HPMC. As películas monocamada com AH e COL (8F) apresentaram valores de força máxima intermédios, enquanto as de dupla camada (9F)

apresentaram-se mais resistentes ($37,396 \pm 1,736$ N), tendo apresentado valores semelhantes aos das películas com AH (6F).

Mandapalli *et al.* (85) também prepararam películas com vários polímeros, nomeadamente HPMC, e obtiveram um valor de $10,20 \pm 0,53$ N para a força necessária para quebrar a película, sendo este resultado semelhante ao obtido para as películas só com HPMC (3F) preparadas neste trabalho.

3.5.4 Ensaio de uniformidade de massa

De modo a avaliar a uniformidade de massa, foram pesadas 12 películas de cada formulação, correspondendo os resultados apresentados na figura 60 à média das medições.

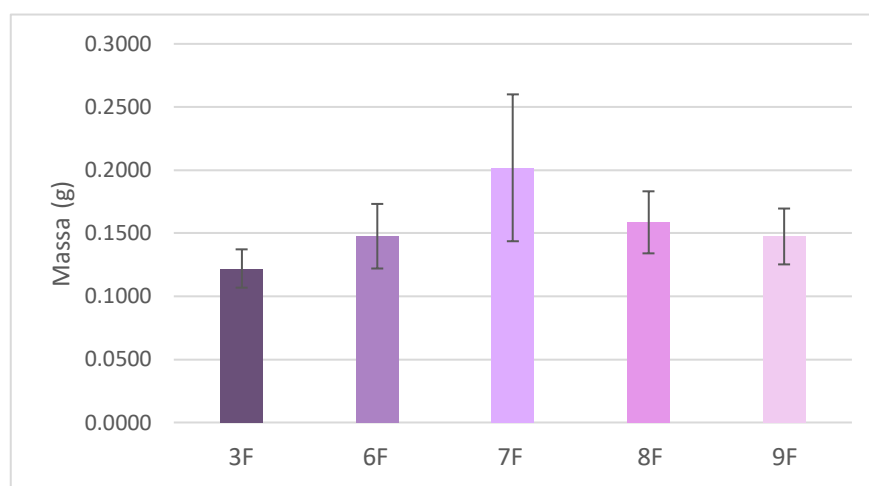


Figura 60. Massa das películas.

A massa média das películas contendo apenas o HPMC (3F) foi ligeiramente inferior ($0,1220 \pm 0,0152$ g) o que significa que tanto o AH (6F) como o COL (7F) aumentaram a massa das películas ($0,1476 \pm 0,0256$ g e $0,2018 \pm 0,0582$ g, respetivamente), sendo o aumento mais significativo para as películas com COL. Entre as películas de camada simples ($0,1586 \pm 0,0246$ g) e dupla ($0,1474 \pm 0,0221$ g) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas, o que foi comprovado pelo teste t de *Student* ($p > 0,05$).

Num estudo realizado por Tighsazzadeh *et al.* (86) produziram-se películas simples e de dupla camada contendo HPMC e AH e as massas obtidas foram de $0,083 \pm 0,005$ g e $0,125 \pm 0,006$ g respetivamente. O valor da massa obtida para a película de dupla camada foi semelhante ao obtido neste trabalho ($0,1474 \pm 0,0221$ g).

3.5.5 Avaliação da espessura

Embora não haja um valor de referência uma vez que a espessura das películas depende da sua composição e do fabricante, as películas devem possuir uma espessura fina a fim de facilitar a sua aplicação. A medição da espessura foi realizada em triplicado em dois locais diferentes das películas e os resultados apresentados na figura 61 correspondem à média das três medições.

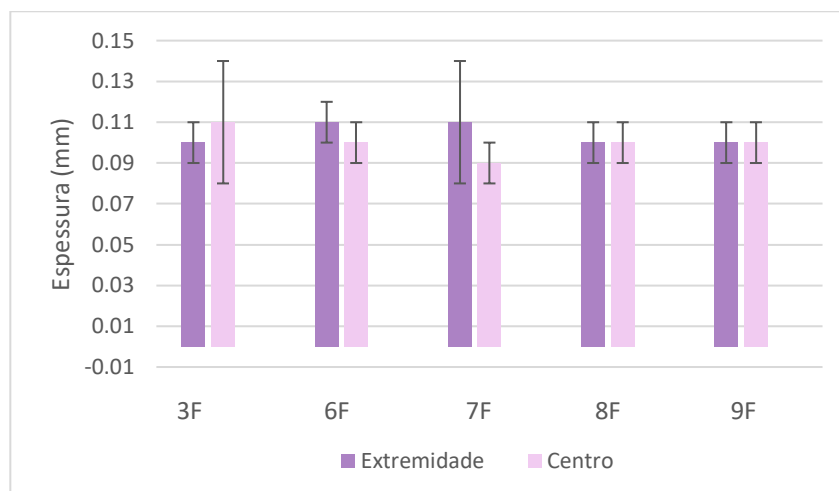


Figura 61. Espessura das películas.

Os resultados da espessura foram praticamente semelhantes para todas as películas.

As películas de camada simples e dupla (8F e 9F, respetivamente) apresentaram o mesmo valor de espessura ($0,10 \pm 0,01$ mm) e demonstraram ser mais uniformes sendo a espessura nas extremidades igual à do centro. Assim, para este parâmetro não houve diferença entre as de camada simples e as de camada dupla o que foi comprovado com a realização dos testes F e t de *Student* entre as formulações 8F e 9F, tendo-se verificado variâncias iguais tanto para as medições na extremidade como no centro e valores médios de espessura na extremidade e no centro estatisticamente iguais ($p > 0,05$).

Num estudo realizado por *Ding et al.* (87) foram preparadas películas de HPMC e COL com uma espessura de $0,067 \pm 0,003$ mm, valor próximo ao obtido pelas películas 7F que contêm a mesma composição de polímeros.

3.5.6 Medição do teor de humidade

Na figura 62 encontram-se os resultados obtidos para o teor de humidade. Este ensaio foi realizado para 3 películas de cada formulação e foi calculada a média e o respetivo desvio padrão.

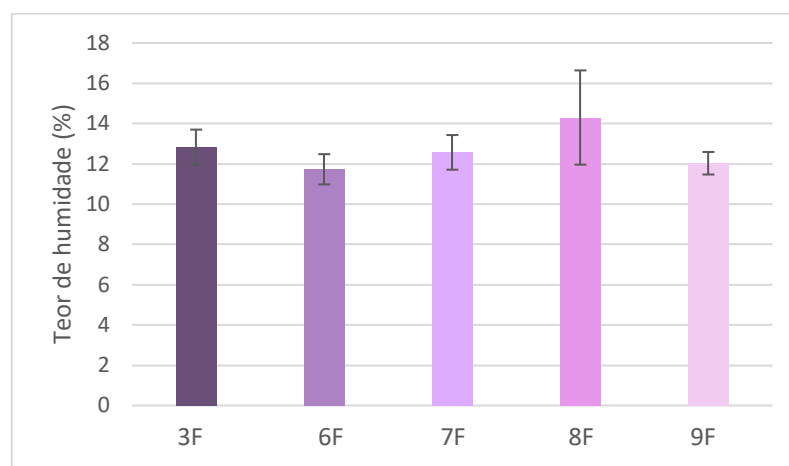


Figura 62. Teor de humidade das películas.

Os resultados do teor de humidade foram semelhantes para todas as películas. A película 3F (apenas HPMC) apresentou o valor de $12,83 \pm 0,87$ % e as 6F (HPMC e AH) e 7F (HPMC e COL) apresentaram, respetivamente, $11,73 \pm 0,75$ % e $12,57 \pm 0,86$ %.

Entre as películas de camada simples e dupla ($14,30 \pm 2,34$ % e $12,03 \pm 0,56$ %, respetivamente) verificou-se uma ligeira diferença, embora não significativa.

Estes resultados permitem concluir que as películas possuíam boa flexibilidade e garantiam um bom manuseamento.

3.5.7 Ensaio resistência à dobragem

Após 300 dobras repetidas no mesmo local não se observou a rutura de nenhuma película.

Apenas a película 6F (contendo AH) ficou marcada, mas não quebrou, como é demonstrado na figura 63.

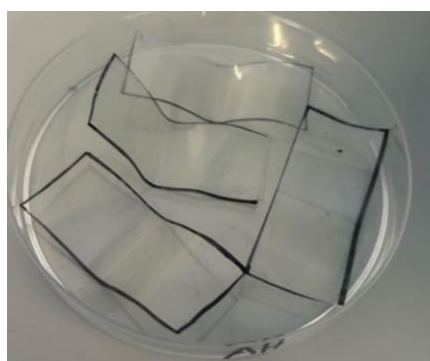


Figura 63. Películas 6F após teste de resistência à dobragem.

Tendo em conta o valor obtido em 3.5.3 para a extensibilidade da película 6F era de esperar que as dobras ficassem marcadas por não ser uma película tão maleável.

3.5.8 Perda de água por evaporação

Na figura 64 é possível observar a variação na perda de água por evaporação (PAE) após 4 dias. Os resultados dizem respeito à média de três medições.

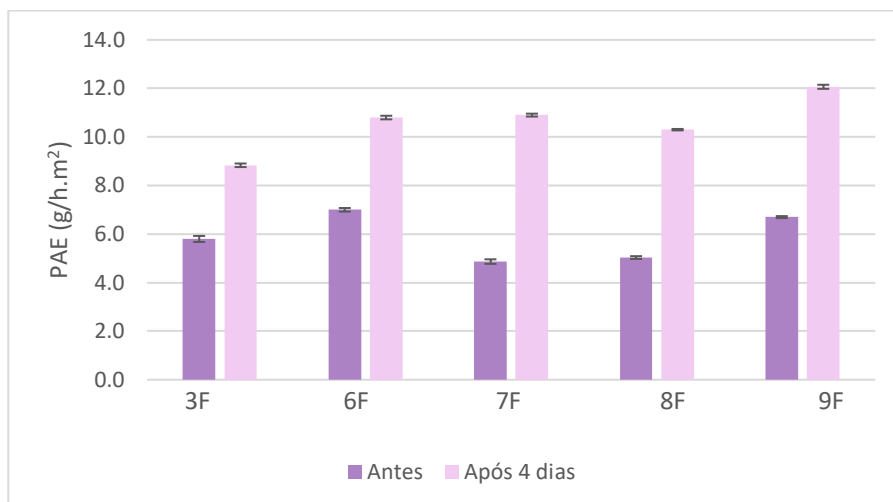


Figura 64. Perda de água por evaporação ao longo do tempo, à temperatura ambiente.

Para todas as películas a perda de água por evaporação aumentou ao fim de 4 dias depois de expostas ao ar a uma temperatura de cerca de 20°C e com uma humidade relativa de 40-60%, o que pode indicar que as películas absorveram a humidade do ar

Procedeu-se ao cálculo da variação da PAE estando os resultados na figura 65.

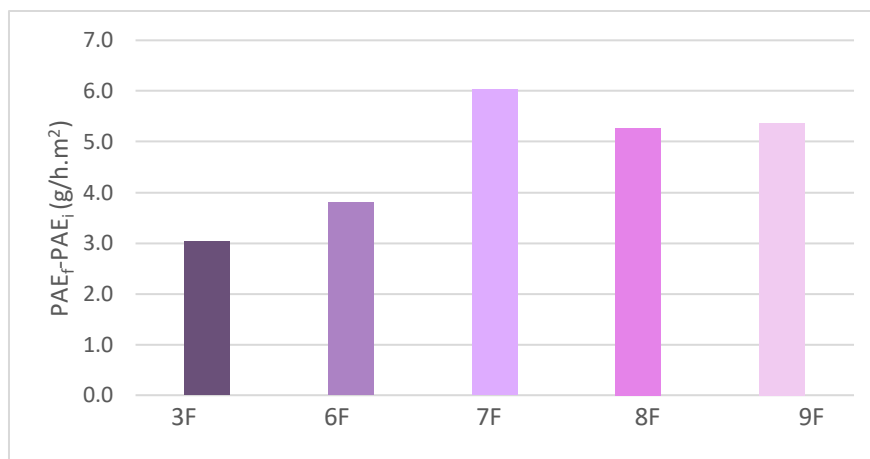


Figura 65. Diferença entre a PAE final e inicial das películas.

Através do gráfico observou-se que a 7F (contendo HPMC e COL) foi a que apresentou uma maior variação da perda de água por evaporação (6,0 g/h.m²), o que significa que a presença do COL nas películas não é favorável à retenção de água, tendo as películas com AH apresentado melhores resultados. Estes resultados podem significar que as películas com AH são mais eficazes para manter a hidratação da pele.

Entre as películas de camada simples e dupla mais uma vez os resultados foram semelhantes 5,3 g/h.m² e 5,4 g/h.m², respetivamente.

4. Conclusão

O ácido hialurônico e o colagénio são dois biopolímeros que desempenham um papel muito importante na regeneração cutânea. O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver formulações promissoras, um creme hidrófilo, uma emulsão múltipla gelificada e uma película, para a regeneração cutânea contendo estes dois compostos.

A preparação de cremes hidrófilos contendo diferentes percentagens de AH e COL permitiu concluir que a melhor opção seria utilizar 1% (m/m) de AH e 5% (m/m) de COL porque permitiu obter um creme com um pH compatível com a pele e estável ao longo do tempo, com viscosidade e firmeza adequadas e, por isso, facilidade de aplicação na pele.

Para as emulsões múltiplas A/O/A gelificadas com AH concluiu-se que apesar do pH ser compatível com a pele e de estas apresentarem estabilidade ao longo do tempo, a formulação 8B (com 2,5% de COL na fase aquosa interna e gelificadas com 2,5% de AH) ficou pouco consistente e a formulação 9B (com 2,5% de COL na fase aquosa interna e gelificadas com 5% de AH) apresentou uma consistência mais elevada. A emulsão múltipla gelificada 9B apresentou elevada adesividade devido à alta percentagem de AH, apresentando-se como uma preparação cutânea promissora para garantir uma boa aderência à pele, promovendo a libertação prolongada do colagénio e, simultaneamente, mantendo a pele hidratada.

Por fim foram testados vários polímeros para a formação de películas, tendo sido o HPMC o que apresentou características mais adequadas para a incorporação de AH e COL. Foram preparadas películas apenas com HPMC, HPMC e COL, HPMC e AH e duas películas com estes três polímeros, sendo uma delas de camada simples e outra de camada dupla. Os resultados dos ensaios de caracterização das películas mostraram que o AH aumentou a resistência mecânica das películas, enquanto o COL não interferiu. Os resultados de uniformidade de massa, teor de humidade e espessura foram semelhantes para todas as películas. Ao combinar os dois componentes (AH e COL) obtiveram-se películas com as características mais próximas do que era pretendido, sendo a de dupla camada a mais adequada devido ao facto de possuir maior resistência e, por isso, poder ser facilmente manuseada durante a aplicação.

Neste trabalho foi demonstrado que os dois polímeros em combinação permitiram obter formulações com características físicas, químicas e mecânicas adequadas para aplicação cutânea. No entanto, para comprovar a capacidade de regeneração cutânea seria necessário prosseguir com ensaios em linhas celulares e, posteriormente, com testes clínicos para comprovar a eficácia dos produtos desenvolvidos.

5. Bibliografia

1. Bernardo AFC, Santos Kd, Silva DPd. Pele: alterações anatômicas e fisiológicas do nascimento à maturidade. *Revista Saúde em foco*. 2019;1(11):1221-1233.
2. Nafisi S, Maibach HI. Skin penetration of nanoparticles. In: Shehokar R, Souto EB, editors. *Emerging nanotechnologies in immunology*: Elsevier; 2018. p. 47-88.
3. Alves DGL, Lima DF, Rocha SG, Kashiwabara TGB. Estrutura e função da pele. In: Dejan, editor. *Medicina Ambulatorial IV*. Montes Claros-MG; 2016. p.13-22.
4. Agarwal S, Krishnamurthy K. Histology, skin. *Europe PMC*. 2019.
5. Sistema Tegumentar Humano. Disponível em: <https://www.coladaweb.com/biologia/corpo-humano/sistema-tegumentar-humano> [acedido a 04/11/2023].
6. Yousef H, Alhajj M, Sharma S. Anatomy, skin (integument), epidermis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA. 2017.
7. Le J. Administração de medicamentos Manual MSD 2022. Disponível em: <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/medicamentos/administração-de-medicamentos-e-farmacocinética/administração-de-medicamentos> [acedido a 19/06/2024].
8. Harris C, Nogueira MI. Derme. In: Senac, editor. *Pele: do nascimento à maturidade*. São Paulo. 2018.
9. Bhadra B, Sakpal A, Patil S, Date A, Prasad V, et al. A Guide to Collagen Sources, Applications and Current Advancements. *Systematic Bioscience and Engineering*. 2021:67-87.
10. Sionkowska A, Adamiak K, Musiał K, Gadomska M. Collagen based materials in cosmetic applications: A review. *Materials*. 2020;13(19):4217.
11. Pinheiro TM. O papel do Ácido Hialurônico na Harmonização Facial: Uma Revisão. *Epitaya E-books*. 2023;1(28):105-114.
12. Sorushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The collagen suprafamily: from biosynthesis to advanced biomaterial development. *Advanced materials*. 2019;31(1):1801651.
13. Colágeno. Disponível em: <https://www.biologianet.com/biologia-celular/colageno.htm> [acedido a 10/11/2023].
14. León-López A, Morales-Peñaloza A, Martínez-Juárez VM, Vargas-Torres A, Zeugolis DI, Aguirre-Álvarez G. Hydrolyzed collagen—Sources and applications. *Molecules*. 2019;24(22):4031.
15. 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. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(2):835-841.

16. Rodríguez MIA, Barroso LGR, Sánchez ML. Collagen: A review on its sources and potential cosmetic applications. *Journal of cosmetic dermatology*. 2018;17(1):20-26.
17. Fertala A. Three decades of research on recombinant collagens: reinventing the wheel or developing new biomedical products? *Bioengineering*. 2020;7(4):155.
18. Neuman MG, Nanau RM, Oruña-Sanchez L, Coto G. Hyaluronic acid and wound healing. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*. 2015;18(1):53-60.
19. Li J, Qiao M, Ji Y, Lin L, Zhang X, Linhardt RJ. Chemical, enzymatic and biological synthesis of hyaluronic acids. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;152:199-206.
20. Bukhari SNA, Roswandi NL, Waqas M, Habib H, Hussain F, Khan S, et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: A review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2018;120(Pt B):1682-1695.
21. Pele mais jovem e mais velhos pele. Disponível em: <https://www.istockphoto.com/br/vetor/pele-mais-jovem-e-mais-velhos-pele-gm522320516-91575683> [acedido a 30/12/2023].
22. Braga JB, Santos CC, Costa FD, Alves TVG. Uso do ácido hialurônico em procedimentos de harmonização facial pelo farmacêutico-esteta: uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*. 2022;11(4):e5111426949.
23. Zhu J, Tang X, Jia Y, Ho CT, Huang Q. Applications and delivery mechanisms of hyaluronic acid used for topical/transdermal delivery - A review. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020;578:119127.
24. Yao ZY, Qin J, Gong JS, Ye YH, Qian JY, Li H, et al. Versatile strategies for bioproduction of hyaluronic acid driven by synthetic biology. *Carbohydrate Polymers*. 2021;264:118015.
25. Rodriguez-Marquez CD, Arteaga-Marin S, Rivas-Sanchez A, Autrique-Hernandez R, Castro-Munoz R. A Review on Current Strategies for Extraction and Purification of Hyaluronic Acid. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(11):6038.
26. Rigo D, da Silva LM, Fischer B, Colet R, Dallago RM, Zeni J. Hyaluronic Acid—from Production to Application: A Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry*. 2022.
27. Wang Y, Hu L, Huang H, Wang H, Zhang T, Chen J, et al. Eliminating the capsule-like layer to promote glucose uptake for hyaluronan production by engineered *Corynebacterium glutamicum*. *Nat Commun*. 2020;11(1):3120.
28. Bielefeld KA, Amini-Nik S, Alman BA. Cutaneous wound healing: recruiting developmental pathways for regeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2013;70:2059-2081.

29. Weng T, Wu P, Zhang W, Zheng Y, Li Q, Jin R, et al. Regeneration of skin appendages and nerves: current status and further challenges. *Journal of translational medicine*. 2020;18:1-17.
30. Della Sala F, Longobardo G, Fabozzi A, di Gennaro M, Borzacchiello A. Hyaluronic acid-based wound dressing with antimicrobial properties for wound healing application. *Applied Sciences*. 2022;12(6):3091.
31. Araújo AL, da Silva ALG, de Freitas IB, Silva TA. Eficácia do uso do ácido hialurônico no processo de cicatrização de feridas. *Brazilian Journal of Development*. 2021;7(12):119067-119082.
32. Feridas Crônicas E Agudas: Entenda A Diferença. Vuelo Pharma. Disponível em: <https://www.vuelopharma.com/feridas-cronicas-e-agudas-entenda-a-diferenca/> [acedido a 05/01/2024].
33. Medeiros AC, Dantas-Filho AM. Cicatrização das feridas cirúrgicas. *Journal of surgical and clinical research*. 2016;7(2):87-102.
34. Afonso M. Cicatrização no Pós-Operatório. 2020. Disponível em: <https://www.mirianafonsoestetica.com/copia-mirian-afonso-estetica-bem-e> [acedido a 08/01/2024].
35. Campos ACL, Borges-Branco A, Groth AK. Cicatrização de feridas. ABC. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo)*. 2007;20:51-58.
36. Castilho MNdS, Damiani GV, Masson VA, Calil SR, Volpato V, Gonçalves N, et al. Efeitos do tratamento tópico com ácido hialurônico 0, 2% em queimadura de segundo grau: um relato de experiência. *Revista Brasileira de Queimaduras*. 2017;16(1):49-52.
37. Fallacara A, Baldini E, Manfredini S, Vertuani S. Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*. 2018;10(7):701.
38. Ying H, Zhou J, Wang M, Su D, Ma Q, Lv G, et al. In situ formed collagen-hyaluronic acid hydrogel as biomimetic dressing for promoting spontaneous wound healing. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;101:487-498.
39. Xiao M, Gao L, Chandrasekaran AR, Zhao J, Tang Q, Qu Z, et al. Bio-functional G-molecular hydrogels for accelerated wound healing. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;105:110067.
40. INFARMED. Monografias Formas Farmacêuticas. *Farmacopeia Portuguesa*. 9 ed2008. p. 912.
41. Castilho NG, Franzolin RA, de Oliveira PG, Cezar J. Comparação dos efeitos do ácido hialurônico 0, 2% e ácidos graxos essenciais em paciente com queimadura por fertilizante: relato de caso. *Revista Brasileira de Queimaduras*. 2016;15(3):175-178.

42. 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. *Biomaterials science*. 2017;5(9):1868-1883.
43. Silva FL. Preparações semissólidas cutâneas contendo colagénio para a regeneração da pele [Dissertação]: FFUP; 2022.
44. Araujo B, da Silva Santos AJ, Júnior JdJGV, Silva ALP. pH de cosméticos e sua analogia com o pH biológico: uma abordagem investigativa no ensino de química. *Pesquisa em foco*. 2022;27(2).
45. Silva FVF, Santos MC, Neiva LDB, Oliveira MAC, de Sousa Leal B, dos Santos Moreira FA, et al. Desenvolvimento e controle de qualidade de um gel-creme antiacneico a base do óleo da *Copaífera officinalis* L.(copaíba). *Revista Eletrônica Acervo Saúde*. 2019(30):e974.
46. Sim P, Strudwick XL, Song Y, Cowin AJ, Garg S. Influence of acidic pH on wound healing in vivo: A novel perspective for wound treatment. *International journal of molecular sciences*. 2022;23(21):13655.
47. Minolta K. Entendendo o Espaço de Cor L* a* b*. Disponível em <https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/entendendo-o-espaco-de-cor-lab/> [acedido a 10/04/2024].
48. Lahoud MH, Campos R. Aspectos teóricos relacionados à reologia farmacêutica. *Visão Acadêmica*. 2011;11(1).
49. Costa CM, Naccache MF, Vargas P. Caracterização reológica de fluidos complexos. *Revista Brasileira de Iniciação Científica*. 2017:3-28.
50. Corrêa F. Fenômenos de Transporte. 2018. Disponível em: https://professor.pucgoias.edu.br/sitedocente/admin/arquivosUpload/17297/material/Aula%202%20%20ENG%204281%20A02_2018.2.pdf. [acedido a 15/04/2024].
51. McLachlan A, Defeo O. The ecology of sandy shores: Academic press; 2017.
52. Gaspar L, Campos PM. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;250(1):35-44.
53. World Health Organization. International Stability Testing: guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. Anex 5. Disponível em: https://www3.paho.org/hq/dmdocuments/2008/6_Annex_5_report_34.pdf [acedido em 25/04/2024].
54. Isaac VLB, Cefali L, Chiari B, Oliveira C, Salgado HRN, Correa MA. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada*. 2008;29(1).

55. 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;3855-3864.
56. Jackman RL, Stanley DW. Perspectives in the textural evaluation of plant foods. *Trends in Food Science & Technology*. 1995;6(6):187-194.
57. Vieira GS, Lavarde M, Fréville V, Rocha-Filho PA, Pensé-Lhéritier AM. Combining sensory and texturometer parameters to characterize different type of cosmetic ingredients. *International Journal of Cosmetic Science*. 2020;42(2):156-166.
58. Garg A, Aggarwal D, Garg S, Singla AK. Spreading of semisolid formulations: An update. *Pharmaceutical Technology North America*. 2002;26:84-105.
59. Tadros TF. *Emulsions: Formation, stability, industrial applications*: Walter de Gruyter GmbH & Co KG; 2016.
60. Wang J, Shi A, Agyei D, Wang Q. Formulation of water-in-oil-in-water (W/O/W) emulsions containing trans-resveratrol. *RSC advances*. 2017;7(57):35917-35927.
61. Estévez M, Güell C, De Lamo-Castellví S, Ferrando M. Encapsulation of grape seed phenolic-rich extract within W/O/W emulsions stabilized with complexed biopolymers: Evaluation of their stability and release. *Food chemistry*. 2019;272:478-487.
62. Callizo Felipe C. *Formulation and characterization of Bifonazole multiple emulsion [Dissertação]: Universitat de Barcelona*; 2016.
63. Serdaroğlu M, Öztürk B, Kara A. An overview of food emulsions: description, classification and recent potential applications. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 2015;3(6):430-438.
64. Stojanović ZS, Marković S, Uskoković D. Determination of particle size distributions by laser diffraction. *Technics–New Materials (Special Edition)*. 2012;67:11-20.
65. Zaidi K. 429 Light Diffraction Measurement of Particle Size. Disponível em: http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c429.html [acedido a 29/05/2024].
66. Dias RJV. *Desenvolvimento e otimização do método de fabrico de uma emulsão cutânea–Scale-up produtivo [Dissertação]: Universidade de Coimbra*; 2017.
67. Barros CFd, Lima IAd, Bunhak ÉJ. Filmes poliméricos no manejo de feridas: uma revisão. *Research, Society and Development*. 2022;11(6):e10111628757.
68. Sionkowska A, Kaczmarek B, Michalska M, Lewandowska K, Grabska S. Preparation and characterization of collagen/chitosan/hyaluronic acid thin films for application in hair care cosmetics. *Pure and Applied Chemistry*. 2017;89(12):1829-1839.
69. Santos ACC, Pascoal DRdC. *Produção de filmes biopoliméricos incorporados com bioativos fitoterápicos: uma revisão bibliográfica. SEMOC-Semana de Mobilização Científica-Alteridade, Direitos Fundamentais e Educação*. 2019.

70. Alven S, Aderibigbe BA. Hyaluronic acid-based scaffolds as potential bioactive wound dressings. *Polymers*. 2021;13(13):2102.
71. Lewandowska K, Sionkowska A, Grabska S, Michalska M. Characterisation of chitosan/hyaluronic acid blend films modified by collagen. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*. 2017(22):125-134.
72. Marangoni Júnior L, Rodrigues PR, da Silva RG, Vieira RP, Alves RMV. Sustainable packaging films composed of sodium alginate and hydrolyzed collagen: preparation and characterization. *Food and Bioprocess Technology*. 2021;14:2336-2346.
73. Makvandi P, Caccavale C, Della Sala F, Zeppetelli S, Veneziano R, Borzacchiello A. Natural formulations provide antioxidant complement to hyaluronic acid-based topical applications used in wound healing. *Polymers*. 2020;12(8):1847.
74. 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. *Power*. 2019;20:160.
75. Dănilă E, Kaya DA, Anuța V, Popa L, Coman AE, Chelaru C, et al. Formulation and Characterization of Niacinamide and Collagen Emulsion and Its Investigation as a Potential Cosmeceutical Product. *Cosmetics*. 2024;11(2):40.
76. Oliveira ÂZM. Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico [Dissertação]: FFUP; 2010.
77. Deambrozi IDS, Milanezi KG, Braz WF. Produção de creme hidratante à base de colágeno extraído de resíduos ósseos de abatedouro bovino [Dissertação]: Faculdades integradas de aracruz; 2017.
78. Kupper S, Klosowska-Chomiczewska I, Szumała P. Collagen and hyaluronic acid hydrogel in water-in-oil microemulsion delivery systems. *Carbohydrate polymers*. 2017;175:347-354.
79. Bachinski BM. Desenvolvimento de nanoemulsão contendo óleo de *Melaleuca alternifolia* e terbinafina destinado à infecções fúngicas tópicas [Dissertação]: Universidade Federal do pampa;. 2022.
80. Gomes ML. Desenvolvimento de nanossistemas para a promoção da penetração cutânea da cafeína [Dissertação]:FFUP. 2022.
81. Xavier EMB. Estudo de estabilidade de formulações com extrato de Centelha asiática [Dissertação]:FFUP; 2021.
82. Costa FMd. Síntese e caracterização de filmes bionanocompósitos à base de biopolímeros reforçados por nanocristais de celulose bacteriana [Dissertação]: Unesp; 2023.

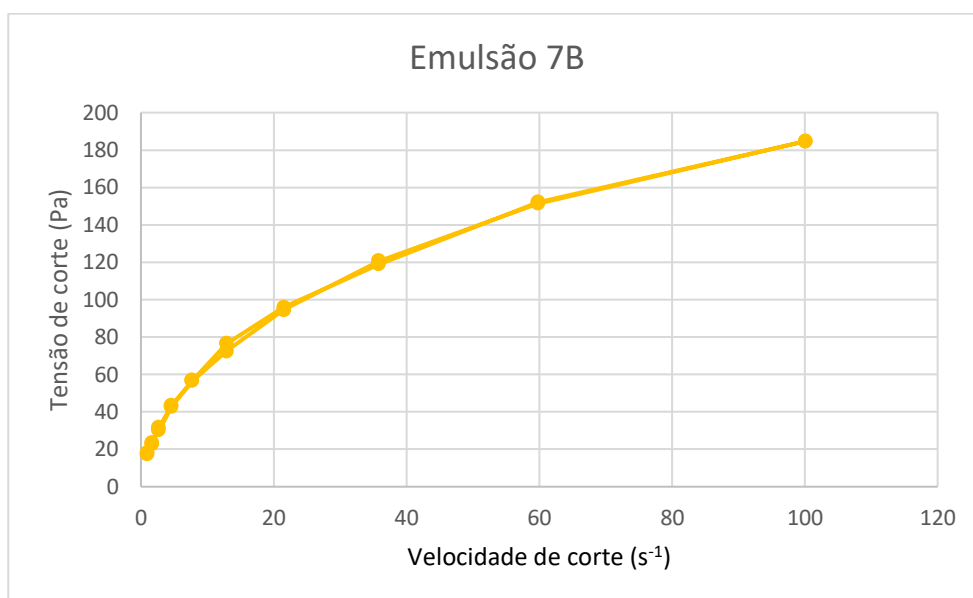
83. Birsan M, Bibire N, Panainte AD, Silasi O, Antonoaea P, Ciurba A, et al. The influence of the preparation method on the characteristics of a new cosmetic gel based on hyaluronic acid and matrix-forming polymers. *Mater Plast*. 2020;57:123-130.
84. Corredor-Chaparro MY, Vargas-Riveros D, Mora-Huertas CE. Hypromellose–Collagen hydrogels/sesame oil organogel based bigels as controlled drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2022;75:103637.
85. Mandapalli PK, Labala S, Chawla S, Janupally R, Sriram D, Venuganti VVK. Polymer–gold nanoparticle composite films for topical application: Evaluation of physical properties and antibacterial activity. *Polymer Composites*. 2017;38(12):2829-2840.
86. Tighsazzadeh M, Boateng J. Matrix hyaluronic acid and bilayer poly-hydroxyethyl methacrylate-hyaluronic acid films as potential ocular drug delivery platforms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;260:129496.
87. Ding C, Zhang M, Li G. Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film. *Carbohydrate polymers*. 2015;119:194-201.

6. Anexos

Anexo 1. Tamanho das gotas da fase oleosa para a formulação 7B.

7B	
D ₁₀ (μm)	0,271
CV (%)	0,105
D ₅₀ (μm)	0,488
CV (%)	0,061
D ₉₀ (μm)	2,120
CV (%)	0,102
Span	3,78

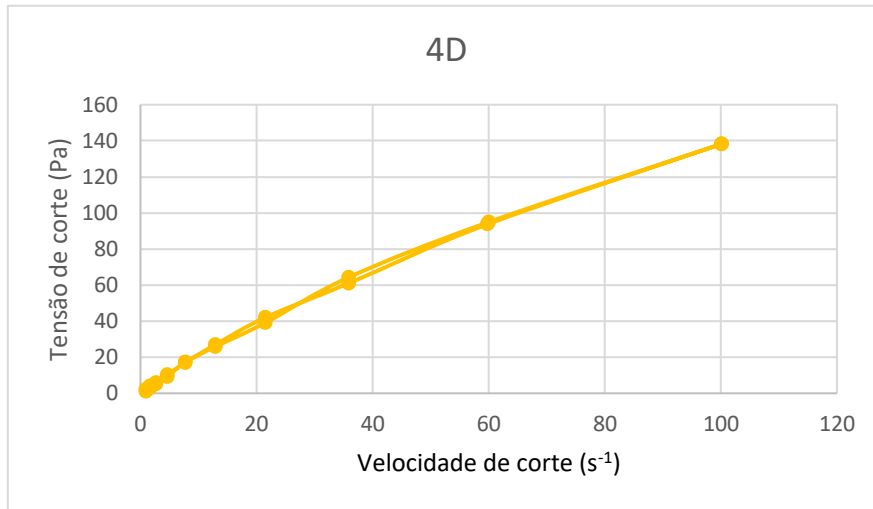
Anexo 2. Reograma para a formulação 7B, à temperatura de 20°C.



Anexo 3. Resultados de pH, luminosidade, parâmetro de *chroma*, firmeza e adesividade para a formulação 7B.

7B					
Dia	pH	L*	C*	Força máxima (N)	Área negativa (N.mm)
0	5,29 ± 0,01	85,00 ± 0,01	1,87	-	-
7	5,24 ± 0,01	85,61 ± 0,01	2,09	0,093 ± 0,001	-0,310 ± 0,010

Anexo 4. Reograma para a formulação 4D.



Anexo 5. Reograma para a formulação 1E.

