



Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

Joana Sofia Figueira Lopes Frazão

Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais

Orientado por:

Maria João Sousa

Vitor Manuel Ramalheira Martins

Bragança

2017

Agradecimentos

À minha família, de quem sei que tenho o apoio incondicional, obrigado por todas as palavras de incentivo no momento certo e por nunca me deixarem ir desistir. Apesar de distantes estão sempre presentes.

Aos meus orientadores, a Professora Doutora Maria João Sousa e o Professor Doutor Vítor Martins, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível, por sempre acreditarem em mim e por todo o apoio prestado ao longo deste tempo.

À Professora Doutora Maria da Conceição Fernandes pela ajuda incansável na determinação dos valores de LC_{50} dos extratos obtidos e na ajuda na análise da toxicidade das emulsões.

Ao Professor Doutor Luís Pedro do Laboratório do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar Lisboa da Faculdade de Ciências de Lisboa, pelo apoio nas análises das frações voláteis das plantas e do fungo analisadas.

Aos meus colegas de mestrado, por terem estado presentes nos bons e maus momentos, por me terem ensinado tanto sobre mim e os outros, por todos os momentos de descontração e de estudo juntos, sem vocês nunca teria sido o mesmo. Sei que tive uma sorte enorme em vos ter conhecido e serem vocês ao meu lado durante estes anos.

Ao Hugo Goes por todo o apoio e paciência no laboratório e por se ter tornado não só um colega, mas também um amigo.

À Dona Isabel pelos ensinamentos indispensáveis para a realização deste trabalho assim como por toda a paciência e disponibilidade que teve.

À Mestre Andreia Tomás por ter partilhado comigo as suas amostras de méis e pela ajuda e apoio fornecidos.

Índice

Agradecimentos	iii
Índice.....	v
Abstract.....	ix
Resumo.....	xiii
Índice de Tabelas.....	xvii
Índice de Figuras	xix
Abreviaturas.....	xxi
1 Revisão bibliográfica.....	1
1.1 Produtos cosméticos.....	1
1.1.1 Tipos de formulações cosméticas.....	3
1.1.1.1 Emulsões.....	3
1.1.1.2 Pomadas.....	5
1.1.1.3 Géis.....	5
1.1.2 Constituintes das formulações cosméticas	5
1.1.2.1 Fungos	6
1.1.2.2 Produtos apícolas.....	10
1.1.2.3 Óleos essenciais.....	15
1.1.3 Estabilidade dos produtos cosméticos.....	25
1.1.4 Toxicidade dos produtos cosméticos.....	27
2 Objetivos	34
3 Materiais e métodos	38
3.1 Recolha dos corpos frutíferos de <i>Clitocybe odora</i> (Bull.) e desenvolvimento da cultura do micélio in vitro.....	38
3.2 Determinação da curva de crescimento do micélio	39
3.3 Preparação do micélio.....	39
3.4 Extração de voláteis	40
3.5 Análise dos voláteis	41
3.5.1 Cromatografia Gasosa	41
3.5.2 Cromatografia gasosa-espectrometria de massa	42
3.6 Extração de óleos essenciais	42
3.7 Maceração de <i>Calendula officinalis</i> L.	43
3.8 Elaboração do extrato hidroalcoólico de própolis	43
3.9 Análise do extrato de própolis	44
3.9.1 Conteúdo balsâmico	44
3.9.2 Fenóis totais.....	44
3.9.3 Flavonas e flavonóis.....	45

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

3.9.4	Flavanonas e di-hidroflavonóis	45
3.10	Desenvolvimento e otimização de duas formulações cosméticas de aplicação tópica.....	46
3.11	Incorporação de produtos apícolas e de óleos essenciais nas formulações.....	47
3.12	Testes físico-químicos	51
3.12.1	Medição do pH.....	51
3.12.2	Viscosidade	51
3.12.3	Densidade relativa	52
3.12.4	Teste com luz	52
3.12.5	Teste de vibração mecânica.....	52
3.13	Teste de estabilidade acelerado	53
3.14	Atividade antimicrobiana das emulsões	53
3.15	Teste de contaminação microbiana.....	54
3.16	Teste espectrofotométricos	54
3.17	Estudo de toxicidade dos extratos	55
3.18	Potencial ocular irritativo das formulações	56
4	Resultados e Discussão	60
4.1	Avaliação do crescimento do micélio de <i>Clytocibe odora</i> em dois meios de cultura diferentes	61
4.2	Identificação dos compostos voláteis dos extratos	63
4.2.1	Compostos voláteis extraídos do micélio de <i>Clitocybe odora</i>	64
4.2.2	Compostos voláteis de <i>Mentha pulegium</i> (Poejo).....	68
4.2.3	Compostos voláteis do <i>Thymus zygis subsp. zygis</i> (serpão-do-monte).....	71
4.3	Análise ao extrato hidroalcoólico de própolis	76
4.4	Análise da estabilidade da emulsão 1	79
4.4.1	Emulsão 1 contendo óleo de essencial de <i>Thymus zygis</i> L. ssp. <i>zygis</i>	79
4.4.2	Emulsão 1 contendo óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i>	85
4.5	Análise da estabilidade da emulsão 2	89
4.5.1	Emulsão 2 contendo óleo de essencial de <i>Thymus zygis</i> L. ssp. <i>zygis</i>	89
4.5.2	Emulsão 2 contendo óleo de essencial de <i>Mentha pulegium</i>	93
4.6	Testes espectrofotométricos	96
4.7	Atividade antimicrobiana das emulsões.....	98
4.8	Estudo de toxicidade dos extratos.....	101
4.9	Potencial ocular irritativo das formulações.....	112
5	Conclusões e perspetivas.....	118

6	Referências	124
7	Anexos.....	152
7.1	Composição do meio de cultura <i>Melin-Norkans</i> Modificado Incompleto (MMN incompleto).....	152
7.2	Composição do meio de cultura <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	152
7.3	Composição do meio de incubação de <i>Artemia salina</i> L.....	153
7.4	Composição do meio de crescimento bacteriano.....	153
7.5	Composição do meio de crescimento de leveduras	154
7.6	Espectro GC da análise de voláteis de <i>Thymus zygis subsp. zygis</i> obtido por destilação-extração com um aparato de LN.....	154
7.7	Espectro GC da análise de voláteis de <i>Mentha pulegium</i> obtido por destilação-extração com um aparato de LN.....	155

Abstract

The use of natural products in cosmetics became quite popular among the consumers due to the idea that these don't have secondary effects for the human being. However, although these products exist and have been used for millions of years, their analysis was just recently initiated by the scientific community.

The objective of this study was to determine the effect of two bee products (hydroalcoholic extract of propolis and two honeys of *Lavandula sp.* from the north and the south of Portugal) and of essential oils of two medicinal plants characteristic from Portugal (*Thymus zygis* L. subsp *zygis* and *Mentha pulegium* L.) in the physicochemical parameters, stability and in the capacity to inhibit the growth of microorganisms of two formulations of topical application. Was also evaluated the toxicity of the essential oils to *Artemia salina* as well as the irritant potential in the eyes of the elaborated formulations. Additionally, was analysed the volatile composition of the extract obtained from the mycelium of an *in vitro* culture of *Clitocybe odora* to be in the future incorporated in a cosmetic formulation, having been determined the value of LC₅₀ of the extract in *Artemia salina*.

The results of the stability test indicated that occurred phase separation and liquification of the samples, which can be related with the manufacturing technique of the formulation. It was verified that the incorporation of the bee products didn't changed the pH of the formulations or the density. However, it was observed changes in the viscosity and in UV-Vis spectra. Regarding the vibration test, there were no changes in the formulations, which indicates that they can be transported by land transport without the occurrence of modifications.

The preservation system used, the essential oils of *Mentha pulegium* and of *Thymus zygis* subsp. *zygis*, was effective, not having been observed the occurrence of contamination of the cosmetic formulations. All the emulsions demonstrated to be bacteriostatic and fungistatic against the microorganisms *Candida albicans*,

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Was also verified that the emulsions were stronger bacteriostatic in relation to the bacteria *Bacillus subtilis*. Despite the two bee products used are, according to the literature, bactericides and fungicides in relation to the used species, its utilization didn't affect the microbiological results obtained when compared with the control.

The results obtained in the toxicity test with *Artemia salina* indicate that the essential oils of *Mentha pulegium* and of *Thymus zygis* subsp. *zygis* are toxic for this crustaceous, having been obtained values of lethal concentration that kills 50% of the population (LC_{50}) $<100 \mu\text{g/mL}$. As described in the literature, this result is due possibly to the toxicity of the main compounds present in the essential oil of *Mentha pulegium* and in the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *zygis*, the pulegone and the carvacrol respectively. Furthermore, was evaluated the Irritative eye potential of the developed formulations through the hen's egg test–chorioallantoic membrane (HET-CAM), having been determinate that those are not irritants.

The fungi *Clitocybe odora* was collected in Bragança, Portugal and its mycelium was inoculated in *Potato dextrose agar* medium (PDA) and in incomplete solid *Melin Norkans* medium (incomplete MMN). The mycelium was collect from incomplete MMN, which showed a better rate of growth, and was extracted using a *Likens-Nickerson* extraction-distillation method (LN). The main compounds detected in the extract were the spathulenol and β -caryophyllene oxide, which are not found, according to the literature, in wild samples. This extract demonstrated to be toxic for *Artemia salina*, with 100% of mortality, possibly due to the presence of spathulenol, which is toxic for this crustaceous. The spathulenol presents several applications in the cosmetic industry and therefore the extract obtained from the *in vitro* mycelium of *Clitocybe odora* might be a potential source of bioactive compounds to incorporate in cosmetic formulations.

The results obtained throughout this study show that the incorporation of the bee products studied (*Lavandula* sp. honey and propolis hydroalcoholic extract) and the two

essential oils of *Mentha pulegium* and *Thymus zygis* subsp. *zygis* are an alternative that should be considered when formulating cosmetic products.

Resumo

O uso de produtos naturais em cosméticos tornou-se bastante popular entre os consumidores devido à ideia de que estes não apresentam efeitos secundários para o ser humano. Contudo, apesar destes produtos existirem e serem utilizados há milhões de anos, a análise dos mesmos foi iniciada apenas recentemente pela comunidade científica.

O objetivo deste estudo foi determinar o efeito de dois produtos apícolas (extrato hidroalcoólico de própolis e dois méis de *Lavandula sp.* procedentes do Norte e do Sul de Portugal) e de óleos essenciais de duas plantas medicinais características da flora de Portugal (*Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e *Mentha pulegium* L.) nos parâmetros físico-químicos, estabilidade e capacidade de inibição do crescimento microbiano de duas emulsões de aplicação tópica. Foram também avaliadas a toxicidade dos óleos essenciais relativamente à *Artemia salina* assim como o potencial de irritação ocular das formulações elaboradas. Adicionalmente, foi analisada a composição volátil do extrato obtido a partir do micélio de uma cultura *in vitro* de *Clitocybe odora* para futuramente ser incorporado numa formulação cosmética, tendo-se determinado o valor de LC₅₀ do extrato em *Artemia salina*.

Os resultados do teste de estabilidade indicaram que ocorreu separação de fases e liquidificação das amostras, o que poderá estar relacionado com a técnica de manufatura das formulações. Verificou-se que a incorporação dos produtos apícolas não alterou o pH das formulações nem a densidade. No entanto, foram verificadas alterações na viscosidade das mesmas e nos espectros UV-Visível. Em relação ao teste de vibração, não ocorreram alterações nas formulações, o que indica que as mesmas poderão ser transportadas por transporte terrestre sem ocorrerem modificações.

O sistema de preservação utilizado, os óleos essenciais de *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, foi eficaz, não se tendo observado a ocorrência de

contaminação das formulações cosméticas. Todas as emulsões demonstram ser bacteriostáticas e fungistáticas contra os microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Verificou-se ainda que as emulsões eram fortemente bacteriostáticas em relação à bactéria *Bacillus subtilis*. Apesar de os dois produtos apícolas utilizados serem, de acordo com a literatura, bactericidas e fungicidas em relação às espécies utilizadas, a sua utilização não afetou os resultados microbiológicos obtidos quando comparados com o controlo.

Os resultados obtidos no teste de toxicidade com *Artemia salina* indicam que os óleos essenciais de *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* subsp. *zygis* são tóxicos para este crustáceo, tendo-se obtido valores de concentração letal que mata 50% da população (LC₅₀) <100 µg/mL. De acordo com o descrito na literatura, este resultado possivelmente deve-se à toxicidade dos compostos maioritários presentes no óleo essencial de *Mentha pulegium* e no óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, a pulegona e o carvacrol respetivamente. Adicionalmente foi avaliado o potencial irritativo ocular das formulações desenvolvidas através do teste *hen's egg test-chorioallantoic membrane* (HET-CAM), tendo-se determinado que as mesmas não são irritantes.

O fungo *Clitocybe odora* foi recolhido em Bragança, Portugal tendo-se inoculado o seu micélio em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) e em meio sólido *Melin Norkans* (MMN incompleto). O micélio foi recolhido do meio MMN incompleto, o qual apresentou maior taxa de crescimento, e foi extraído utilizando o método de extração *Likens-Nikerson* (LN). Os compostos maioritários detetados no extrato obtido foram o espatulenol e o óxido de β-cariofileno, os quais não são detetados, de acordo com a bibliografia, em amostras silvestres. Este extrato demonstrou ser tóxico para a *Artemia salina*, com 100% de mortalidade, possivelmente devido à presença do espatulenol, o qual é tóxico para este crustáceo. O espatulenol apresenta diversas aplicações na indústria cosmética e conseqüentemente o extrato obtido do micélio *in vitro* de

Clitocybe odora poderá ser uma fonte de compostos bioativos para incorporar em formulações cosméticas.

Os resultados obtidos ao longo deste estudo evidenciam que a incorporação dos produtos apícolas estudados (mel de *Lavandula* sp. e extrato hidroalcoólico de própolis) e dos dois óleos essenciais de *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* subsp. *zygis* constituem uma alternativa que deverá ser considerada ao serem formulados produtos cosméticos.

Índice de Tabelas

Tabela I - Composição da fração volátil de <i>Clitocybe odora</i> obtida por destilação-extração LN, utilizando como solvente o diclorometano	9
Tabela II - Parâmetros de qualidade do mel de rosmaninho	13
Tabela III – Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>Mentha pulegium</i> L. (poejo)	18
Tabela IV - Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> (serpão-do-monte)	21
Tabela V - Atividade antibacteriana de extratos das pétalas de <i>Calendula officinalis</i> ... 24	
Tabela VI - Composição de uma emulsão para gretas nos pés (emulsão 1).	46
Tabela VII - Composição de uma emulsão regenerante (emulsão 2).	47
Tabela VIII - Tipos de compostos incorporados na emulsão 1	49
Tabela IX - Tipos de compostos incorporados na emulsão 2.....	50
Tabela X - Composição da fração volátil de <i>Clitocybe odora</i> em meio MMN incompleto, obtida com um aparato de Likens-Nickerson.	65
Tabela XI - Composição da fração volátil (óleos essenciais) de <i>Mentha pulegium</i>	69
Tabela XII - Composição da fração volátil de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	72
Tabela XII - Composição da fração volátil de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i> (continuação)	73
Tabela XIV – Conteúdo balsâmico e fenólico do extrato de própolis.....	77
Tabela XV - Proposta para standardização do própolis Português.....	78
Tabela XVI - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 1, com incorporação de óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i> e produtos apícolas.	79
Tabela XVII – Resultados do teste a 40°C e 75% de H.R. das amostras possuindo como base a emulsão 1 e óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	84
Tabela XVIII - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 1, com incorporação de óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> e produtos apícolas.	85
Tabela XIX - Resultados dos testes utilizando 40°C e 75% de H.R. das amostras possuindo como base a emulsão 1 e óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i>	87
Tabela XX – Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 2, com incorporação de óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i> e produtos apícolas.	90

Tabela XXI – Resultados obtidos quando submetidas as amostras, com óleo essencial de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i> e utilizando como base a emulsão 2, a 40°C e 75% de H.R.....	92
Tabela XXII - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 2, com incorporação de óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> e produtos apícolas.....	93
Tabela XXIII - Resultados obtidos quando submetidas as amostras com óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i> a 40 °C e 75% de H.R..	95
Tabela XXIV – Actividade antimicrobiana das formulações F1-F12, (n=3).....	101
Tabela XXV - Resumo dos valores de toxicidade para cada um dos componentes da emulsão 1.....	103
Tabela XXVI - Resumo dos valores de toxicidade para cada um dos reagentes utilizados na emulsão 2.....	105
Tabela XXVII - Avaliação da margem de segurança dos reagentes presentes na formulação 1.....	107
Tabela XXVIII - Resultados obtidos dos valores de LC ₅₀ obtidos no teste de toxicidade aguda com <i>Artemia salina</i>	110
Tabela XXIX - Valores de IS para as formulações F1-F12.	114
Tabela XXX - Valores de IS para as formulações FC1-FC12.	114

Índice de Figuras

Figura 1 - A diversidade de produtos cosméticos no mercado.....	2
Figura 2 - Tipos de emulsões.....	4
Figura 3 - A estrutura de um cogumelo.....	7
Figura 4 - <i>Clitocybe odora</i> (Bull) P. Kumm.....	8
Figura 5 – Mel.	11
Figura 6 - Própolis.	14
Figura 7 – Estrutura de um tricoma glandular	15
Figura 8 - <i>Mentha pulegium</i> L. (poejo) florida (Quinta do poulão).	17
Figura 9 - Estrutura química da pulegona.	19
Figura 10 – <i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i> (serpão-do-monte) da zona de Rebordãos, Bragança.	20
Figura 11 - <i>Calendula officinalis</i> florida	22
Figura 12 - Modo de indicação do prazo de validade.....	25
Figura 13 - As diferentes fases de crescimento da <i>Artemia salina</i>	30
Figura 14 – Exemplo de um corpo frutífero recolhido.....	38
Figura 15 - Esquema representativo do procedimento utilizado para a determinação das curvas de crescimento do micélio de <i>Clitocybe odora</i>	39
Figura 16 - Destilação-extração Likens-Nickerson de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	40
Figura 17 - Destilação com recurso a um Clevenger de <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i> ..	43
Figura 18 - Extrato hidroalcoólico de própolis.....	44
Figura 19 - Viscosímetro rotativo Myr.....	51
Figura 20 - Amostras em banho de água regulado à temperatura de 25 °C.....	51
Figura 21 – Esquema da metodologia desenvolvida neste estudo.....	57
Figura 22 - Curva de crescimento do fungo <i>Clytocibe odora</i> em dois meios de cultura diferentes (PDA e MMN incompleto) (n=2).	63
Figura 23 - Estrutura química do composto espatulenol	67
Figura 24 - Estrutura química do composto óxido de β -cariofileno.....	67
Figura 25 - Estrutura química do composto piperitenona.	71
Figura 26 - Estrutura química do composto mentona.....	71
Figura 27 - Síntese de carvacrol e timol a partir de γ -terpineno.....	74

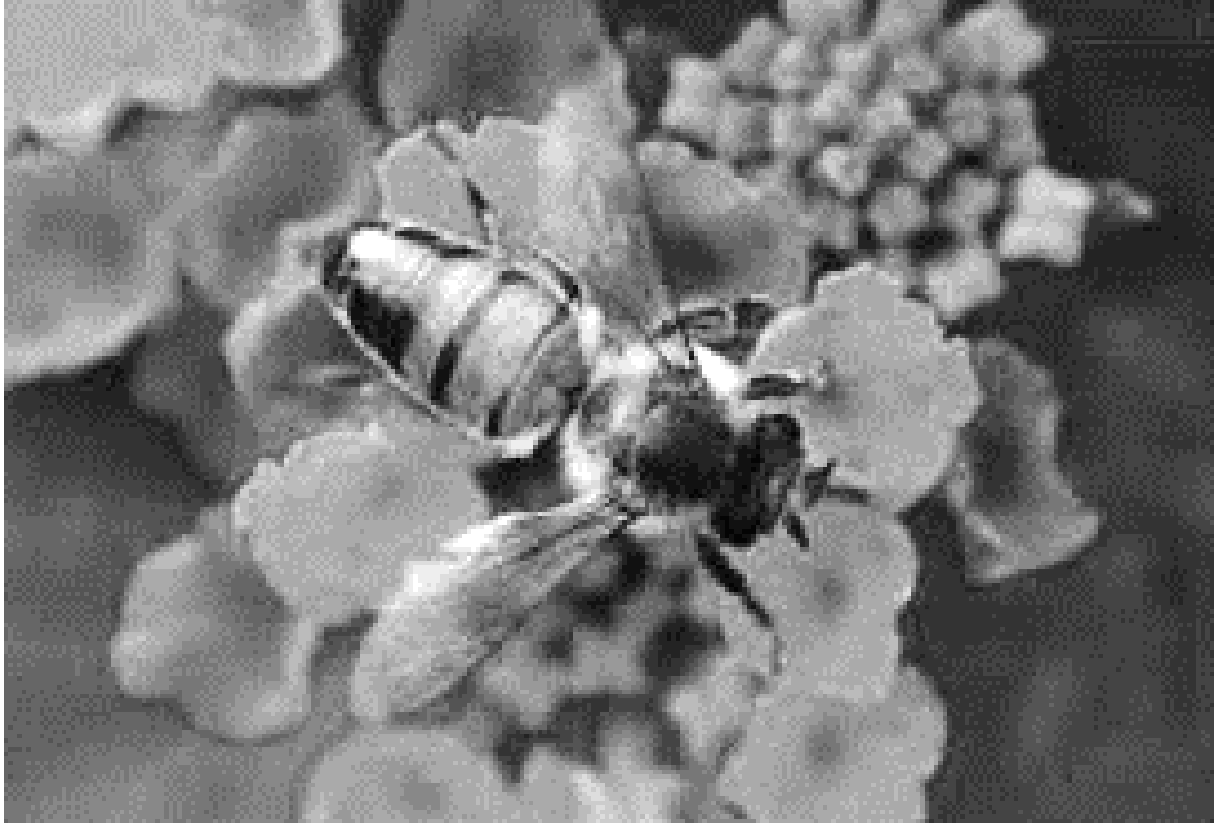
Figura 28 - Estrutura química do composto carvacrol.	74
Figura 29 - Estrutura química do composto γ -terpineno	75
Figura 30 - Estrutura química do composto p-cimeno	75
Figura 31 - Estrutura química do composto β -cariofileno.....	76
Figura 32 - Dependência da viscosidade com a velocidade de rotação do spindle para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 1 como base.	82
Figura 33 - Dependência da viscosidade com a velocidade de rotação do spindle para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 2 como base.	88
Figura 34 - Espectro UV-Vis das emulsões F1-F6.....	96
Figura 35 – Espectro UV-Vis das emulsões F7-F12.	97
Figura 36 - Espectros UV-Vis da emulsão FC1.	98
Figura 37 - Toxicidade do DMSO, expressa como a média das percentagem de mortalidade de <i>Artemia salina</i> (n=3).....	109
Figura 38 - Teste de toxicidade das soluções controlo.....	113

Abreviaturas

- A - Exposição diária estimada ao produto cosmético
A/O - Água/óleo
A/O/A - Água/óleo/água
BCOP - *Bovine Cornea Opacity Permeability*
C - Concentração do ingrediente em estudo no produto cosmético final
CAM - Membrana corioalantóica
CIR - *Cosmetic Ingredient Review*
COLIPA - *The European Cosmetics Association*
DA - Absorção dérmica
DMSO - Dimetilsulfóxido
DNP - 2,4- dinitrofenil-hidrazina
EMA - *European Medicines Agency*
FDA - *Food and Drug Administration*
GC - Cromatografia gasosa
GC/MS - Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
H.R. - Humidade relativa
HET-CAM - *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*
HMPC - *Committee on herbal medicinal products*
ICCVAM - *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*
Infarmed - Autoridade nacional do medicamento e produtos de saúde
IS - Índice de irritação
LC₅₀ - Concentração letal mínima
LD₅₀ - Dose letal mínima
LN - Destilação-extração *Likens-Nickerson*
LOEC - Concentração mais baixa na qual foi observado o efeito
M - Modificado
m/m - Massa/massa
m/v - Massa/volume
MAC - Macedo

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

MMN incompleto - Meio sólido *Melin-Norkans* incompleto
MoS - Margem de segurança
N - Normal
NC - Não calculado
NOAEL - *Non Observed Adverse Effect Level*
NOEC - Concentração sem efeito observado
O/A - Óleo em água
O/A/O - Óleo em água em óleo
OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
OD - Odemira
PDA - Meio *Potato Dextrose Agar*
RBC - *Red Blood Cells*
RI - Índice de retenção em relação a n-alcanos C7-C17 em coluna DB-1
RPM - Rotações por minuto
SCCS - *Scientific Committee on Consumer Safety*
SED - *Systemic Exposure Dose*
v - Vestígal
v/m - Volume/massa
v/v - Volume/volume



Revisão bibliográfica

1 Revisão bibliográfica

1.1 Produtos cosméticos

A palavra “cosmética” deriva da palavra do Grego antigo *Kosmein*, que significa “decoração”. O desejo que a humanidade tem de se decorar a si mesma seja para caçar, para provocar atração sexual, para aumentar o estatuto social, com objetivos ritualísticos, em ocasiões especiais ou simplesmente como expressão da beleza, é provavelmente tão antigo como a própria humanidade (Paye *et al.*, 2009).

O uso dos cosméticos era proibido na Idade Média, tendo sido o sabão considerado um objeto sinistro que ameaçava a alma humana. Apenas no final do século XVI a utilização de perfumes, cremes, pós, e, em alguns países da Europa, inclusivamente o banho começaram a ser aceites. O contínuo desprezo pelo banho na Europa impulsionou a indústria cosmética, tornando-se esta indispensável para disfarçar os maus odores provocados pela falta de higiene (Paye *et al.*, 2009).

Atualmente a indústria cosmética encontra-se bastante desenvolvida e inclui uma vasta gama de produtos, nomeadamente emulsões, loções, cremes, essências, sabonetes, entre muitos outros, para serem aplicados no corpo, cara, mãos, pés, cabelo, unhas, etc (**Figura 1**). Esta, ao combinar o conhecimento das áreas da farmacologia e da dermatologia, com o conhecimento tradicional, o processamento tecnológico moderno e as técnicas de marketing psicológico avançado, tem conseguido explorar a necessidade e os fortes instintos que o ser humano possui de ser considerado e de se considerar atraente e saudável (Paye *et al.*, 2009).



Figura 1 - A diversidade de produtos cosméticos no mercado.

De acordo com o Infarmed, “Entende-se por *Produto Cosmético* qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais.” (Infarmed, 2016).

Em Portugal, a procura de produtos cosméticos depende da disponibilidade financeira dos consumidores, que muitas vezes optam pela utilização de produtos económicos que sejam fáceis de aplicar e apresentem diversas funções em simultâneo, diminuindo assim o número de produtos utilizados, exigindo ainda que estes sejam ecológicos e não sintéticos, tendência esta que se tem verificado aumentar nos últimos anos. No entanto, a utilização de produtos cosméticos é uma prática que não se encontra muito enraizada na população, sendo a principal marca utilizada em 2014 a L’Oréal, uma marca multinacional francesa (Euromonitor International, 2015).

1.1.1 Tipos de formulações cosméticas

A seleção do tipo de formulação a utilizar por uma determinada pessoa é geralmente influenciada pela opinião do dermatologista (ou técnico de saúde), do local de ação do cosmético na pele e pela natureza do efeito desejado. No decorrer deste estudo foram desenvolvidas duas emulsões com composição e finalidades diferentes. Ambas as formulações eram constituídas por uma fase aquosa que se encontrava dispersa na fase oleosa (água/óleo; A/O).

De seguida, descrevem-se brevemente os tipos principais de formulações cosméticas que podem ser desenvolvidos.

1.1.1.1 Emulsões

Uma emulsão consiste, no mínimo, em dois líquidos imiscíveis (geralmente água e um óleo), no qual um deles se encontra disperso em pequenas gotas no outro líquido. Este processo opõe-se à tensão superficial presente na interface. A estabilização da interface ocorre em duas fases: através da adição de um agente emulsificante, o qual contribui para a redução da tensão superficial e através da agitação da solução, o que permite a fragmentação de gotas em gotículas de menores dimensões (Kowalska *et al.*, 2015).

Geralmente, assume-se que as emulsões são instáveis, podendo, portanto, sofrer diversos tipos de alterações como separação gravitacional, floculação, coalescência, inversão de fases, entre outras. Alguns dos principais fatores que afetam estes processos, e, portanto, a estabilidade de uma emulsão, são o tamanho médio das partículas e a sua distribuição, o pH, a pressão osmótica, a viscosidade e a adição de outros compostos (Kowalska *et al.*, 2015).

O estado de agregação das duas fases varia desde líquido a semi-sólido, pelo que os sistemas de emulsões cobrem um grande intervalo de viscosidades desde loções, com baixa viscosidade, até preparações semis-sólidas (cremes), com elevada viscosidade.

Com base na sua estrutura as emulsões podem ser classificadas em:

- Macroemulsões do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), com um tamanho das gotículas entre 0,1 e 5 μm ;
- Nanoemulsões do mesmo tipo que as macroemulsões, no entanto o tamanho das partículas situa-se entre 20 – 100 nm;
- Emulsões micelares ou microemulsões nas quais o tamanho das partículas se situa entre 5 – 50 nm;
- Emulsões múltiplas ou duplas (emulsões de emulsões, água em óleo em água (A/O/A) ou óleo em água em óleo (O/A/O) (**Figura 2**) (Korać *et al.*, 2016).

Uma vez que as duas fases são incompatíveis, a estabilidade física da emulsão é baixa, sendo maximizada com a seleção de um sistema que a estabilize.

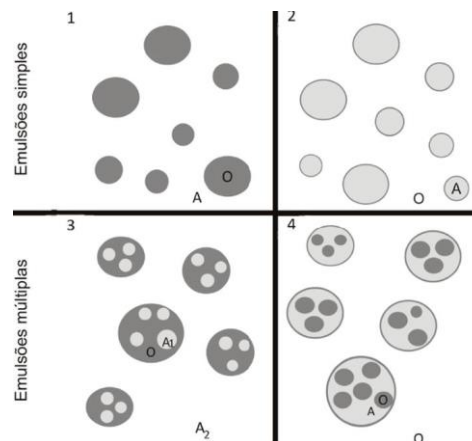


Figura 2 - Tipos de emulsões (Fonte: Pereira & Garcia-Rojas, 2015); 1: emulsão simples O/A; 2: emulsão simples A/O; 3: emulsão múltipla A/O/A; 4: emulsão múltipla O/A/O. A: fase aquosa; O: fase óleo; A₁: fase aquosa interna; A₂: fase aquosa externa.

1.1.1.2 Pomadas

Uma pomada é classificada como um semi-sólido contendo matéria gorda e destinada a ser aplicada externamente (Walters & Brain, 2002).

A preparação de pomadas requiere um controlo cuidadoso de vários parâmetros, especialmente da velocidade de arrefecimento. O arrefecimento rápido cria uma formulação dura, na qual existem diversos pequenos cristais, enquanto o arrefecimento lento resulta na formação de menor quantidade de cristais, com maior dimensão, e num produto mais fluído (Walters & Brain, 2002).

1.1.1.3 Géis

Os géis são caracterizados por conter estruturas contínuas que lhes garantem as propriedades do tipo sólido. Dependendo dos constituintes, os géis podem ser opacos, transparentes, polares, hidroalcoólicos ou não polares. Os géis mais simples são compostos por água à qual são adicionadas gomas naturais, materiais semi-sintéticos, materiais sintéticos ou argilas. A viscosidade de um gel geralmente é dependente da quantidade e da massa molecular do agente espessante (Walters & Brain, 2002).

1.1.2 Constituintes das formulações cosméticas

Uma formulação cosmética é composta por diversos compostos desde reguladores do pH até emulsificantes, ou mesmo compostos com propriedades antimicrobianas. No decorrer deste estudo foram incorporadas nas diversas formulações desenvolvidas óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Thymus zygis* subsp. *zygis*, um macerado de *Calendula officinalis* e produtos apícolas (mel e extrato hidroalcoólico de própolis). A utilização destes produtos teve como objetivo analisar o impacto da utilização dos mesmos em

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

formulações cosméticas através de testes de estabilidade, testes físico-químicos e testes microbiológicos.

Os materiais biológicos anteriormente mencionados serão seguidamente caracterizados de uma forma geral, sendo analisada a descrição do ponto de vista botânico, os principais compostos presentes nas matrizes utilizadas e as consequentes propriedades que podem ser benéficas aquando da sua incorporação num produto cosmético.

1.1.2.1 Fungos

Os fungos são microrganismos não-fotossintéticos, que possuem um modo de nutrição heterotrófica. Estes obtêm os seus nutrientes através da digestão extracelular devido à atividade de enzimas, seguindo-se a absorção dos produtos solubilizados. Assim, os fungos podem ser saprófitos, caso obtenham os seus nutrientes de matéria orgânica morta, parasitas, caso não só obtenham os nutrientes de plantas e animais vivos, mas também causem danos aos hospedeiros, ou podem ser simbióticos mutualistas, caso estabeleçam uma associação com outros organismos vivos, com benefícios mútuos (Hanson, 2008; Miles & Chang, 2004).

Entre os vários tipos de fungos podemos encontrar os cogumelos, classificados como macrofungos, são muito apreciados na alimentação humana devido ao seu sabor, composição nutricional e aroma. Devido às diversas propriedades medicinais que apresentam quando usados diretamente ou de forma indireta, como antioxidantes, antimicrobiológicas, anti-inflamatórias, entre outras, começaram a ser utilizados na indústria cosmética (Taofiq *et al.*, 2016).

O reino *fungi* apresenta várias classes, os cogumelos pertencem maioritariamente à classe *basidiomycetes* (fungos produtores de basidiósporos), no entanto existem alguns

que pertencem à classe *ascomycetes* (fungos que produzem ascósporos) (Guillamón *et al.*, 2010; Miles & Chang, 2004).

Os cogumelos apresentam um corpo frutífero apígeo, ou seja, que cresce acima do solo, podendo ter tamanho suficiente para ser detetado a olho nu e recolhido. De facto, o corpo frutífero deste tipo de fungos é a estrutura que se denomina normalmente de cogumelo, sendo o micélio a parte vegetativa constituída pelas hifas e que pode produzir o corpo frutífero em condições favoráveis (Guillamón *et al.*, 2010; Miles & Chang, 2004).

A maioria dos cogumelos conhecidos caracterizam-se por serem compostos pelo pé, que normalmente se encontra enterrado, no qual pode existir a volva, anel ou cortina, e pelo chapéu, que apresenta na parte inferior o himénio, que se encontra virado para baixo de modo a facilitar a libertação e dispersão dos esporos, quando estes se encontram maduros (**Figura 3**) (Miles & Chang, 2004).

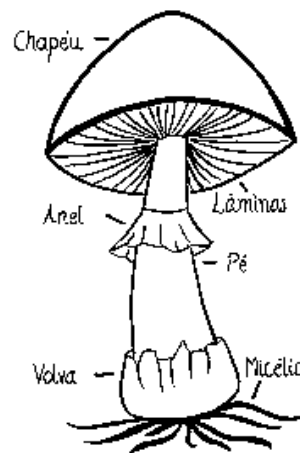


Figura 3 - A estrutura de um cogumelo (Fonte: European Commission, 2014).

Os fungos, em especial os cogumelos, estão atualmente a ser introduzidos em cosméticos, sendo utilizados extratos contendo compostos biologicamente ativos úteis no tratamento de diversas doenças dermatológicas (Hyde *et al.*, 2010; Taofiq *et al.*, 2016).

O fungo *Clitocybe odora* (Bull.) P. Kumm (**Figura 4**), é bastante comum na Europa, podendo ser encontrado entre setembro e novembro debaixo das folhas caducas que se encontram no solo argiloso de florestas com coníferas, castanheiros ou faias (Polese, 2005). O cogumelo *Clitocybe odora* (Bull) P. Kumm apresenta um comprimento entre 2 a 9 cm, sendo considerado um cogumelo pequeno a médio e possui um aroma e um sabor característicos do anis. O chapéu no princípio é convexo com o bordo encurvado; expandindo para uma depressão lisa ou superficial, por vezes apresenta o bordo virado para cima e ondulado. A cor pode variar, mas geralmente é azul-esverdeado pálido; podendo, no entanto, apresentar uma coloração entre o branco e o amarelo pálido ou creme em algumas amostras. O himénio apresenta-se na forma de lâminas, que se encontram bastante próximas e possui uma variedade de cores desde acinzentado a amarelo-rosado (McKnight & McKnight, 1998).



Figura 4 - *Clitocybe odora* (Bull) P. Kumm.

O pé deste fungo possui uma cor amarela pálida, podendo apresentar-se mais escuro na base quando esta se encontra ensopada com água. O pé é cilíndrico, podendo ser alargado no topo ou na base, e apresenta entre 2 a 6 cm de altura e entre 0,4 a 1,0 cm de diâmetro, sendo, por vezes, curvado. O interior é sólido quando jovem, tornando-se oco com o tempo. A superfície pode ser listrada e é constituída por fibras. A base encontra-se muitas vezes coberta com fios macios. Os esporos são não-amilóides, elipsóides a ovóides e apresentam de comprimento entre 6 μm e 8 μm e uma largura entre 3,5 μm e 5,0 μm (McKnight & McKnight, 1998).

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

A análise aos compostos voláteis dos corpos frutíferos de *Clitocybe odora* obtidos por destilação-extração *Likens-Nickerson* (LN) mostrou que o composto maioritário era o *p*-anisaldeído (Rapior *et al.*, 2002). O *p*-anisaldeído é responsável pelo forte aroma a anis deste cogumelo e constituiu 66,8% dos compostos totais voláteis identificados (**Tabela I**).

Tabela I - Composição da fração volátil de *Clitocybe odora* obtida por destilação-extração LN, utilizando como solvente o diclorometano (Fonte: Rapior *et al.*, 2002).

Composto	Percentagem Relativa (%)	Composto	Percentagem Relativa (%)
hexanal	0,2	(E)-nerolidol	0,2
2-(5H) - furanona	2,0	5-fenil-5-metil-hex-2-enal	0,1
ácido 3-metilbutanóico	3,0	5-pentil- γ -lactona	0,1
ácido 2-metilbutanóico	0,2	álcool <i>p</i> -anísico	0,1
benzaldeído	5,2	<i>p</i> -anisaldeído	66,8
1-octen-3-ona	0,3	linalol	0,2
1-octen-ol	3,0	(E)-2-octanal	0,1
3-octanona	11,0	Limoneno	0,4
3-octanol	0,1	<i>n</i> -pentilfurano	0,2

Num estudo realizado com 4 espécies de cogumelos silvestres verificou-se que o *Clitocybe odora* possuía um dos conteúdos em ácido ascórbico mais elevados (172.65

mg/100 g) e que, entre as várias frações ricas em polissacarídeos, a fração solúvel em água apresentava boas propriedades antioxidantes (Vaz *et al.*, 2011). Neste mesmo estudo mostrou-se que os extratos obtidos do micélio *in vitro* e administrados por via intraperitoneal em ratos, inibiram o crescimento do cancro Sarcoma 180 e do tumor de Ehrlich em 70% e 60%, respetivamente.

No entanto, tanto quanto sabemos, na literatura não se encontram descritos quaisquer estudos onde se tenham utilizado extratos de *Clitocybe odora* na preparação de formulações cosméticas, nem a composição dos voláteis extraídos do micélio *in vitro* deste fungo.

1.1.2.2 Produtos apícolas

As abelhas (*Apis mellífera* L.) vivem em colónias, podendo estas ser classificadas de acordo com a sua função. As abelhas obreiras recolhem várias substâncias da natureza que são utilizadas na colónia para alimento e crescimento do enxame, como material de construção do ninho ou para proteção e defesa do mesmo (Mutsaer *et al.*, 2006).

Os produtos apícolas (mel, própolis, pólen, geleia real, veneno de abelhas, entre outros) têm sido utilizados desde os tempos ancestrais com diversas finalidades, tais como o tratamento de feridas, tosse, artrite, esclerose múltipla, entre outras. Este tipo de utilização é denominado apiterapia (Jagua-Gualdrón, 2012; Krell, 1996).

O mel (**Figura 5**) é um fluido doce e viscoso produzido pela *Apis mellífera* L., a partir do néctar das flores. É uma solução supersaturada de açúcares, dos quais a frutose (38% m/m) e glucose (31% m/m) são os principais constituintes (Das *et al.*, 2015). Este contém ainda água, ácidos fenólicos, flavonoides, enzimas, carotenoides, aminoácidos, ácidos orgânicos, vitaminas e minerais que contribuem para as suas propriedades benéficas (Gan *et al.*, 2016). Esta composição é variável e depende em primeiro lugar da origem botânica e geográfica da fonte floral. No entanto, existem outros fatores que

também possuem um papel importante, como os fatores ambientais, a altura do ano na qual é feita a recolha do néctar e o seu processamento (Krell, 1996).



Figura 5 – Mel.

Além deste alimento ser apreciado pelo seu sabor característico e pelo seu valor nutritivo, é também usado devido à sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antimutagénica, antitumoral e antioxidante, sendo ainda utilizado como conservante em frutas e grãos (Jandrić *et al.*, 2015). Também pode ser utilizado na forma de melito, um xarope com efeito farmacológico no qual a solução base é o mel em vez de uma solução de sacarose.

O mel é uma das substâncias mais utilizadas na história da humanidade, e os benefícios da sua utilização são conhecidos há muitos séculos. Registos arqueológicos indicam que o mel era utilizado como veículo em cremes e loções ou para unir os ingredientes em pastas. Existem registos que evidenciam a utilização do mel atualmente em preparações cosméticas por todo o mundo. As mulheres chinesas, por exemplo, misturam o mel com sementes trituradas, como as de laranja, para obter um creme de limpeza. Na região dos Balcãs, em especial em algumas partes da Bósnia e da Herzegovina, são preparados bálsamos com azeite, mel, banha de porco, ervas frescas e

resina de coníferas aquecida, sendo usados para tratar o reumatismo e algumas lesões externas da pele (Burlando & Cornara, 2013).

Por possuir um pH relativamente baixo, é um inibidor do desenvolvimento de bactérias prevenindo a infecção de feridas e escaras. O mel possui ainda a capacidade de reter a água presente num produto pois é higroscópico, restaurando os fatores de hidratação da pele (Krell, 1996).

A possível deterioração das soluções diluídas e a sensação pegajosa das soluções concentradas são o único fator que limitam o seu uso. O mel não deve ser esterilizado ou pasteurizado antes de ser utilizado pois pode perder as suas características benéficas. A variação nos parâmetros físico-químicos de acordo com a estação e o tipo de mel não tem uma importância significativa para o uso industrial (Das *et al.*, 2015).

Os méis monoflorais mais representativos em Portugal são de castanheiro (*Castanea sativa*), rosmaninho (*Lavandula* sp.) e de urze (*Erica* sp.). Durante o presente estudo foi utilizado o mel de rosmaninho português, que apresenta uma cor clara e um aroma floral intenso, encontrando-se na região interior norte e centro e no sul de Portugal, a uma altitude de 400 metros (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2016).

Internacionalmente, os parâmetros de qualidade do mel de rosmaninho resultam da análise qualitativa do mel de *Lavandula angustifolia* (**Tabela II**) (Federação Nacional dos Apicultores de Portugal, 2016).

Tabela II - Parâmetros de qualidade do mel de rosmaninho (Fonte: Decreto-Lei n.º 214/2003).

Parâmetro de qualidade	Limite
Teor de frutose e glucose (total dos dois)	No mínimo 60g/100g
Teor de sacarose	No máximo 15g/100g
Teor de água	No máximo 20%
Teor de matérias insolúveis na água	No máximo 0,1g/100g
Condutividade elétrica	No máximo 0,8 mS/cm
Ácidos livres	No máximo 50 miliequivalentes de ácidos por 1000 g
Índice diastásico (escala de Schade)	No mínimo 8
Teor de hidroximetilfurfural	No máximo 40 mg/kg

A adição do mel à formulação cosmética deve ser feita com o mel líquido à temperatura ambiente para evitar a degradação de substâncias sensíveis ao calor, no entanto é possível aquecer o mesmo até à temperatura de 40 °C facilitando a mistura. O mel deve ser misturado homogeneamente a uma pequena porção do produto antes de ser adicionado ao lote, no entanto é de prever a ocorrência de alterações na consistência e na cor, que podem ser corrigidas com alterações à formulação (Krell, 1996).

A aplicação do mel na pele, não é geralmente utilizado na indústria cosmética devido à sua viscosidade. Este, no geral, é utilizado em produtos como leites de limpeza, cremes hidratantes, géis, pós-solares, entre outros num intervalo de proporção entre 1% e 10%. Contudo, é possível utilizar concentrações mais elevadas caso este seja misturado com emulsionantes, óleos ou agentes gelificantes, podendo-se a utilizar até 70% de mel, mantendo-se a aplicação do cosmético na pele satisfatória para o utilizador (Burlando & Cornara, 2013).

O própolis (por vezes também denominado cola das abelhas) é o nome genérico para a substância resinosa colhida de diversas plantas pelas abelhas. Este é uma substância adesiva e resinosa, recolhida, transformada e utilizada pelas abelhas para

selar furos nos favos de mel, alisar as paredes internas e evitar a entrada de intrusos na colmeia (Burdock, 1998; Das *et al.*, 2015).

A abelha que recolhe o própolis leva-o para o seu ninho nas suas patas traseiras. Esta dirige-se a um local na colmeia no qual o própolis é armazenado e espera até este ser retirado pelas abelhas que o irão utilizar. O própolis é maioritariamente recolhido de manhã e usado à tarde na colmeia (Osés *et al.*, 2015).

Apesar de a composição do própolis variar com o tempo e a altura do ano, este é principalmente constituído por resina (50%), cera (30%), óleos essenciais (10%), assim como polén (10%) e outra matéria orgânica (5%) atuando como um antisséptico efetivo na colmeia (Petelinc *et al.*, 2013). O própolis (**Figura 6**) contém uma quantidade superior de compostos fenólicos relativamente ao mel, possuindo uma maior atividade antioxidante e antimicrobiana (Burdock, 1998).



Figura 6 - Própolis.

As características antibacterianas (Silva *et al.*, 2012), antifúngicas (Freires *et al.*, 2016), antivirais (Amoros *et al.*, 1994), anti-inflamatórias (Silva *et al.*, 2012) e antioxidantes (Moreira *et al.*, 2008) atraíram o interesse da indústria cosmética. Como consequência dos benefícios anteriormente mencionados, o própolis é principalmente utilizado em desodorizantes e em agentes purificantes da pele, sendo ainda utilizado como conservante (Krell, 1996).

O própolis é geralmente utilizado na forma de extrato e a escolha do solvente para a realização deste extrato depende da aplicação final. Por vezes, o solvente deve ser eliminado totalmente ou reduzido, de modo a evitar a alteração na consistência da formulação (Krell, 1996).

1.1.2.3 Óleos essenciais

As plantas aromáticas produzem óleos essenciais em estruturas secretoras especializadas designadas de tricomas glandulares (**Figura 7**). Estes são líquidos voláteis com aromas característicos, constituídos por uma mistura de compostos orgânicos arrastáveis por vapor de água e solúveis em solventes orgânicos e gorduras. Nas plantas aromáticas estes compostos podem estar presentes em um, ou em vários órgãos das plantas, principalmente em flores e folhas, mas, embora menos frequentemente, também em caules, raízes e rizomas (Cunha *et al.*, 2012).

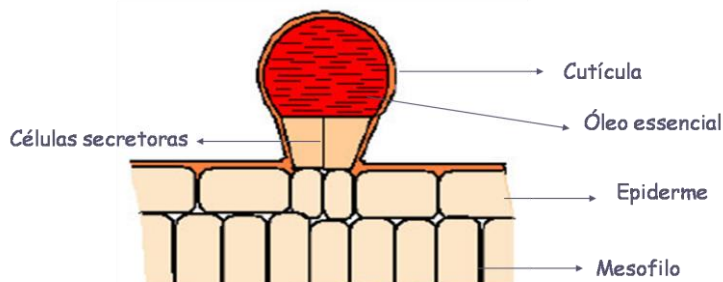


Figura 7 – Estrutura de um tricoma glandular (Fonte: Smiljanic, 2015).

Geralmente os óleos essenciais estão já formados no interior das plantas, mas também podem existir sob a forma de heterósidos, sendo apenas libertados após a respetiva hidrólise (Cunha *et al.*, 2012).

Estes óleos têm sido utilizados desde a antiguidade na formulação de produtos cosméticos, com o objetivo principal de criar um aroma agradável. Diversos estudos têm vindo a comprovar as propriedades dos óleos essenciais, sendo de destacar as

seguintes: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expetorante, relaxante, antisséptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e anti-inflamatória (Nascimento *et al.*, 2007).

As ocorrências de variações genéticas intraespecíficas da espécie vegetal podem alterar o teor do princípio ativo que se encontra presente no óleo. Existem ainda outros fatores que condicionam a composição química dos óleos, afetando assim as suas propriedades, nomeadamente o clima, solo, época e forma de plantio, adubação, uso de agrotóxicos, irrigação, tempo e condições ambientais, proveniência do material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, espécie, colheita e padrões de variação geográfica (latitudes e longitudes) (Nascimento *et al.*, 2007).

No decorrer deste estudo foram utilizados os óleos essenciais de *Mentha pulegium* L. (poejo) e *Thymus zygis* subsp. *zygis* L. (serpão-do-monte), que são plantas espontâneas em Portugal, em particular na região de Trás-os-Montes, Bragança. Adicionalmente, foi feita uma maceração de *Calendula officinalis* em óleo de amêndoas doces, tendo sido incorporada numa das formulações testadas.

A *Mentha pulegium* L. (**Figura 8**) pertence à família *Lamiaceae* sendo mais conhecida como poejo, hortelã-dos-açores ou hortelã-pimenta-mansa. É nativa de África, da Europa e do Próximo Oriente e pode ser encontrada principalmente perto de linhas de água: rios, ribeiros e paúis. Encontra-se em zonas húmidas, sendo muito comum nos Açores e em Portugal Continental. Esta é mais pequena quando comparada com outras mentas (Kumar *et al.*, 2011).



Figura 8 - *Mentha pulegium* L. (poejo) florida (Quinta do poulão).

A *Mentha pulegium* L. (poejo) é uma espécie herbácea, de 20 a 40 cm de tamanho, subprostrada, subglabra a tomentosa, fortemente aromática, de folhas pequenas (8 a 30 mm), elíptico-oblongas, atenuadas na base, curtamente pecioladas, inteiras ou esparsamente dentadas, pilosas (pelo menos na parte virada para o caule). As suas flores surgem em densos verticilastros multifloros numa longa inflorescência espiciforme no prolongamento dos ramos floríferos; cálice da flor de dentes ciliados, os inferiores assovelados, os superiores menos e mais largos; corola de cerca de 5 mm de tamanho, lilacénea, estames excertos; frutos (mericarpós) com 0,7 mm, acastanhados (Franco, 1984).

Brahmi *et al.*, (2016) identificaram, por Cromatografia gasosa (GC) e Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), como componente maioritário do óleo essencial de *Mentha pulegium*, obtido na Argélia, a pulegona, um monoterpene cíclico, apresentando ainda como compostos principais neo-mentol, acetato de neo-mentol e mentona (**Tabela III**). No entanto, existem outros estudos onde o composto maioritário identificado foi distinto: a mentona (Teixeira *et al.*, 2012), o mentol (Marzouk, 2008), a piperitenona (Kokkini *et al.*, 2002) ou a isomentona (Baser & Kürkçüoğlu, 1999). Este facto poderá estar relacionado com distintas condições edafoclimáticas, para além da eventual recolha da planta em diferentes épocas do ano.

Tabela III – Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Mentha pulegium* L. (poejo) (Adaptado de: Brahmi *et al.*, 2016).

Composto	Percentagem relativa (%)	Composto	Percentagem relativa (%)
α -pineno	0,4	<i>trans</i> -isopulegona	1,0
sabineno	0,1	pulegona	70,4
β -pineno	0,2	piperitona	0,2
3-octanona	0,3	acetato de neomentol	3,5
3-octanol	0,7	acetato de mentil	0,1
limoneno	0,9	acetato de iso-metil	0,1
1,8-cineol	0,1	piperitenona	0,2
<i>p</i> -menta-3,8-dieno	0,1	β -cariofileno	0,5
acetato de 3-octanol	0,1	α -humuleno	1,0
pentona	2,7	germacreno D	0,2
<i>iso</i> -mentona	0,5	óxido de cariofileno	0,8
neo-mentol	13,4	epóxido de humuleno II	1,1

A presença de pulegona (**Figura 9**) confere ao óleo essencial citotoxicidade, atribuída à rutura da parede bacteriana no momento em que o óleo essencial atravessa a parede celular e a membrana citoplasmática, danificando as camadas de fosfolípidos, ácidos gordos e polissacáridos (Cherrat *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2012). A citotoxicidade foi comprovada nos testes efetuados por Cherrat *et al.*, (2014) e por Ait-Ouazzou *et al.*, (2012) nos quais referem que o óleo essencial apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*, possivelmente devido à presença de pulegona, a qual é o principal composto antimicrobiano presente no óleo essencial. Devido à sua citotoxicidade, o uso interno deste óleo essencial não é aconselhado (Cunha *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2011).

De acordo com o comité do *Cosmetic Ingredient Review* (CIR) a quantidade de pulegona permitida no óleo essencial de hortelã-pimenta para uso cosmético deve ser igual ou menor a 1% uma vez que este composto foi considerado tóxico. Para além disso a concentração deste óleo essencial deve ser igual ou inferior a 0,2% em

formulações *leave-on* (Boyer *et al.*, 2017). Quando cumprido este requisito considera-se que é seguro utilizar o óleo essencial desta planta em produtos cosméticos. Em relação ao óleo essencial de *Mentha pulegium* não foi encontrada na literatura qualquer informação.

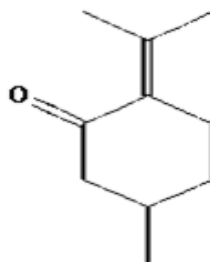


Figura 9 - Estrutura química da pulegona (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2005d).

O género *Thymus* inclui mais de 300 espécies, incluindo híbridos, variedades e ecótipos (Salgueiro, 2007). O *Thymus zygis* é endémico da Península Ibérica, tendo sido já descobertos no mínimo oito quimiótipos nesta região. As variações sazonais e os distintos estágios fenológicos contribuem também para a variabilidade química do óleo essencial do *Thymus zygis* (Ruiz *et al.*, 2016). Em Portugal, o *Thymus zygis* apresenta duas subespécies, *sylvestris* e *zygis*, diferentes na sua composição bioquímica, pelo que deve haver sempre um controlo da planta em relação à composição do seu óleo essencial (Cunha *et al.*, 2009).

O óleo essencial de *Thymus zygis* Loeffl ex L. é uma referência de qualidade no mercado dos óleos essenciais. De acordo com a Farmacopeia Europeia (2002), a droga é constituída pelas partes aéreas floridas dessecadas de *Thymus vulgaris* e/ou *Thymus zygis* e deve conter um mínimo de 1,2% (v/m) de óleo essencial e 0,5% (v/m) de fenóis voláteis, expressos em timol. O óleo essencial do *Thymus zygis* apresenta atividades antimicrobianas, antivirais, anti-enzimáticas, antioxidantes e antifúngicas (Salgueiro, 2007).

O *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* (**Figura 10**) apresenta o nome vulgar de serpão-do-monte ou tomilhinha e pertence à família das *Lamiáceas*, sendo espontâneo em Portugal

Continental e frequentemente encontrado em Trás-os-Montes, no Centro-Este e no Sudoeste (Cunha *et al.*, 2009; Dandlen *et al.*, 2011).



Figura 10 – *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte) da zona de Rebordãos, Bragança.

O *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte) é um subarbusto (caméfito) de 10 a 30 cm de porte, com caules puberentos, eretos ou ascendentes; folhas de 4,5-9 mm x 0,6-1 mm, lineares, subagudas, sésseis, tomentosas, de margens revolutas e esparsamente ciliadas na base. Apresenta inflorescências formadas por verticilastros até 10 cm, espiciformes ou capituliformes, de brácteas semelhantes às folhas e excedendo os verticilastros; cálice com 3 a 4 mm, tomentoso, verde-acinzentado, de dentes superiores tão compridos como largos, geralmente não ciliados e corola ≤ 4 mm esbranquiçada; anteras brancas (Morales, 2014).

De acordo com um estudo realizado por Dandlen *et al.*, (2011), os quatros principais compostos presentes no óleo essencial do *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte), recolhido em Rebordãos, Bragança, Portugal, são o carvacrol (43,6%), o ρ -cimeno (24,1%) e o γ -terpineno (15,8%) (**Tabela IV**).

Tabela IV - Principais compostos do óleo essencial obtido a partir das partes aéreas de *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte) (Adaptado de: Dandlen *et al.*, 2011).

Compostos	Percentagem Relativa (%)	Compostos	Percentagem Relativa (%)
tricicleno	v	α -cadinol	v
α -tujeno	1,6	óxido de β -cariofileno	0,3
α -pineno	0,8	δ -cadieno	v
canfeno	1,0	germacreno D	v
3-octanol	1,0	<i>trans</i> - β -ocimen	1,1
β -micerno	1,0	carvacrol	43,6
α -terpineno	1,4	timol	0,3
ρ -cimeno	24,1	acetato de bornilo	v
β -felandreno	v	α -terpineol	0,1
1,8-cineole	0,2	terpinen-4-ol	0,6
limoneno	1,1	borneol	1,2
γ -terpineno	15,8	cânfora	v
<i>trans</i> -sabineno hidratado	0,6	linalol	3,2
óxido de <i>cis</i> -linalol	v	<i>cis</i> -sabineno hidratado	v
óxido de <i>trans</i> -linalol	v	terpinoleno	0,1

v- vestígios (% <0,05).

A *Calendula officinalis* L. (**Figura 11**) pertence à família *Asteraceae* (compostas), apresentando o nome vulgar de maravilhas ou de calêndula. Esta é uma planta herbácea anual, nativa da Europa Meridional, sendo mais frequentemente encontrada na região do mediterrâneo (Fonseca *et al.*, 2010).

Desde o século XIII que a calêndula é utilizada na Europa para tratar feridas sendo atualmente utilizada mundialmente. Tanto na cultura Indiana e Arábica como na Grécia e Roma antigas, a *Calendula officinalis* era utilizada como pigmento em alimentos, tecidos e cosméticos. As suas pétalas podem ser utilizadas para tingir algodão, lã, linho e seda, uma vez que o extrato de calêndula apresenta na sua composição licopeno e luteína, os quais são responsáveis pela coloração da flor que varia entre o laranja e o amarelo, fazendo do extrato desta planta um corante natural (Efstratiou *et al.*, 2012).

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade



Figura 11 - *Calendula officinalis* florida (Fonte: WaitroseGarden, 2017).

A *Calendula officinalis* é uma planta herbácea anual, cuja altura varia entre 30 a 60 cm, apresenta raízes fasciculadas, ligeiramente amareladas e cilíndricas; o caule é anguloso, curto e sólido, ereto ou prostrado, pubescente; as folhas são ligeiramente denteadas, alternas, lanceoladas, com pelos glandulares em ambas as faces; as folhas inferiores são espatuladas obtusas ou agudas no ápice, com 10-20 cm de comprimento e 1-4 cm de largura. As folhas superiores são oblongas a lanceoladas e mucronadas no ápice, com 4-7 cm de comprimento; as brácteas são involucrais com 7-15 cm de comprimento, revestidas de longos pelos glandulares; inflorescências em capítulos no ápice dos caules, de 3-7 cm de diâmetro, com flores de cores heterogêneas, podendo variar do amarelo ao alaranjado. As flores centrais são tubuladas e estéreis, já as periféricas são liguladas e férteis; apresentam frutos secos tipo aquênio, estreitamente oblongos e curvos (Riley, 2012).

Existem diversos estudos recentemente publicados acerca das propriedades biológicas da *Calendula officinalis* L. tendo sido identificadas diversas classes de compostos fitoquímicos incluindo óleos voláteis (D'Ambrosio *et al.*, 2015), carotenóides (Pintea *et al.*, 2003), triterpenóides (Nicolaus *et al.*, 2016), flavonóides (Fernandes *et al.*, 2013) e saponinas (Riley, 2012).

Devido aos diversos compostos presentes nos extratos de calêndula, estes apresentam diversas propriedades que são uteis tanto na indústria cosmética como na medicina. Entre as propriedades identificadas são de destacar a atividade antioxidante

(Ahmad *et al.*, 2012), anti-inflamatória e antibacteriana (Parente *et al.*, 2011), fungicida (Efstratiou *et al.*, 2012) e regenerante (Tanideh *et al.*, 2013).

De acordo com um estudo publicado por Chandran & Kuttan, (2008) o extrato das flores de *Calendula officinalis* melhorou significativamente as queimaduras induzidas termicamente em ratos quando comparadas com os animais de controlo não tratados. Devido às propriedades mencionadas foi elaborado neste estudo um macerado desta espécie, o qual foi utilizado no desenvolvimento de uma formulação regenerante.

A composição em carotenóides é a principal responsável pela cor das flores que podem ser amarelas, ricas em xantofilas, ou cor-de-laranja, contendo maior quantidades de hidrocarbonetos. Os carotenóides presentes na calêndula, os quais pertencem a grupo de compostos exógenos bioativos não enzimáticos, são considerados pró-vitaminas, pois estes são convertidos em vitamina A (Efstratiou *et al.*, 2012).

De acordo com um estudo realizado em 2012 por Efstratiou *et al.*, os extratos metanólicos e etanólicos das pétalas de *Calendula officinalis* apresentam atividade antimicrobiológica contra diversas espécies de bactérias e fungos (**Tabela V**). Ambos os extratos apresentam uma atividade antifúngica comparável à de um antibiótico *standard*, o Fluconazole, nomeadamente contra algumas espécies de *Candida* e de *Aspergillus* apresentando ainda atividade contra a *Exophiala dermatitidis*. Relativamente à atividade microbiana dos mesmos extratos, ambos possuem efeitos antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. De uma forma geral, o extrato de metanol inibe mais o crescimento bacteriano quando comparado com o extrato etanólico. Contudo, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* o extrato etanólico apresentou uma melhor atividade antibacteriana do que o extrato metanólico.

Tabela V - Atividade antibacteriana de extratos das pétalas de *Calendula officinalis*
 (Adaptado de: Efstratiou *et al.*, 2012).

Bactérias	Dimensão da zona de inibição/ (mm)		
	Extrato metanólico	Extrato etanólico	Ciprofloxacina
<i>Bacillus subtilis</i> NCTC 10400	22 ± 1	18 ± 2	47 ± 3
<i>Bacillus. subtilis</i> [JEM7]	14 ± 1	10 ± 1	39 ± 3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NCTC 27853	19 ± 2	13 ± 1	42 ± 2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> [JEM16]	12 ± 1	10 ± 1	40 ± 2
<i>Bacillus cereus</i> NCTC 7464	14 ± 1	16 ± 2	38 ± 3
<i>Bacillus cereus</i> [JEM8]	15 ± 2	10 ± 1	36 ± 3
<i>Escherichia coli</i> (UUC collection)	10 ± 1	9 ± 1	44 ± 1
<i>Escherichia coli</i> (Ampicillin resistant)	13 ± 1	10 ± 1	44 ± 1
<i>Escherichia coli</i> [JEM1]	21 ± 2	14 ± 1	36 ± 2
<i>Escherichia coli</i> [JEM4]	14 ± 2	14 ± 1	35 ± 2
<i>Escherichia coli</i> [JEM17]	22 ± 1	18 ± 1	35 ± 3
<i>Staphylococcus aureus</i> MSSA 25923	18 ± 2	28 ± 2	42 ± 1
<i>Staphylococcus aureus</i> [JEM18]	22 ± 2	19 ± 2	30 ± 2
<i>Klebsiella aerogenes</i> NCTC 9528	19 ± 1	13 ± 1	39 ± 2
<i>Klebsiella aerogenes</i> [JEM2]	14 ± 1	12 ± 1	40 ± 3
<i>Enterococcus faecalis</i> NCTC 775	14 ± 1	18 ± 2	42 ± 3
<i>Enterococcus faecalis</i> [JEM10]	13 ± 1	15 ± 1	36 ± 2
<i>Bacillus pumilis</i> [JEM15]	14 ± 1	13 ± 1	41 ± 1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> [JEM19]	16 ± 1	14 ± 1	45 ± 3

De acordo com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) as flores secas de calêndula devem ser utilizadas inteiras ou cortadas, totalmente abertas e retiradas do receptáculo. Existem diversos tipos de preparações que podem ser realizados nomeadamente: extratos líquidos utilizando como solvente etanol (40-50% v/v) na proporção 1:1 ou 1:1.8-2.2 ou um óleo vegetal na proporção 1:10, e pomadas utilizando como solvente vaselina ou um óleo vegetal na proporção 1:5 ou 1:25 (Committee on herbal medicinal products (HMPC), 2008).

É recomendada a utilização de produtos derivados desta planta no tratamento de sintomas de inflamações leves da pele, para curar pequenas feridas e no tratamento de pequenas inflamações na boca ou garganta, no entanto é de notar que não deve ser utilizada por pessoas que apresentem hipersensibilidade a plantas da família das

Asteráceas, grávidas ou crianças com menos de 12 anos (Committee on herbal medicinal products (HMPC), 2008).

1.1.3 Estabilidade dos produtos cosméticos

Os testes de estabilidade aos cosméticos têm como função garantir que um produto cosmético possui as mesmas características químicas, físicas e microbiológicas que apresentava quando elaborado, considerando que este se encontra adequadamente acondicionado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004). A elaboração dos estudos da estabilidade de produtos cosméticos contribui para:

- Orientar o desenvolvimento da formulação e a escolha do material de acondicionamento adequado;
- Estimar o prazo de validade e fornecer informações para a sua confirmação (**Figura 12**);
- Auxiliar na monitorização da estabilidade organoléptica, físico-química e microbiológica, produzindo informações sobre a confiabilidade e segurança dos produtos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004).

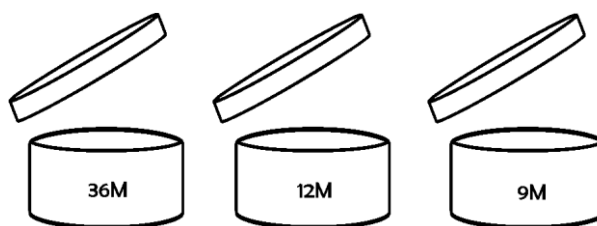


Figura 12 - Modo de indicação do prazo de validade (Fonte: Rodrigues, 2015).

Os testes de estabilidade devem ser elaborados sobre condições que permitam fornecer as informações desejadas no menor tempo possível. Para tal, as amostras devem ser armazenadas sob condições que acelerem a ocorrência de possíveis mudanças que ocorram no prazo de validade. No entanto, é necessário ter atenção para

que essas condições não sejam tão extremas que provoquem alterações que não sejam possíveis de ocorrer após o produto ter sido introduzido no mercado (Isaac *et al.*, 2008).

A estabilidade de um produto cosmético é influenciada por diversos fatores externos aos quais o produto se encontra exposto (tempo, temperatura, luz, ar, humidade, microrganismos, acondicionamento e vibração) e/ou por fatores internos, ou seja, relacionados com a formulação, principalmente a interação química e/ou física dos ingredientes entre si ou com o material de acondicionamento primário (alteração do pH, reações de oxidação-redução, reações de hidrólise) (Isaac *et al.*, 2008). As amostras são avaliadas em relação a uma amostra de referência e geralmente são definidos os limites de aceitação para cada um dos parâmetros avaliados (Isaac *et al.*, 2008).

Nas formulações elaboradas por Aswal *et al.*, (2013) foi analisado o pH, a viscosidade, a homogeneidade e a aparência das emulsões preparadas, assim como a testes de estabilidade acelerada, nos quais as amostras são colocadas a diferentes condições de temperatura e humidade relativa. Prestes & Rigon, (2009) procederam adicionalmente a testes de centrifugação e analisaram as características organolépticas das emulsões desenvolvidas (brilho, cor e odor). Devem ainda ser realizados ensaios para a avaliação de possível crescimento microbiano tal como elaborado por Mishra *et al.*, (2014) para além de outros parâmetros conforme o objetivo e o tipo de formulação. A interpretação dos dados obtidos depende dos critérios previamente estabelecidos pelo formulador.

Para avaliar a estabilidade das diversas formulações desenvolvidas procedeu-se à realização de diversos testes, nomeadamente a determinação do pH no dia em que foram elaboradas as formulações e após quatro dias, testes de vibração, com recurso a um vórtex, e a colocação das amostras durante quinze dias numa estufa a 40°C e com 75% de humidade relativa (H.R.). Adicionalmente foi determinada a viscosidade e a densidade de cada uma das formulações.

1.1.4 Toxicidade dos produtos cosméticos

Para além da determinação da estabilidade dos produtos cosméticos, é de extrema importância a avaliação da segurança dos mesmos. Na Europa, a avaliação da segurança de um produto cosmético é feita através do controlo individual dos seus ingredientes, nomeadamente no que se refere à sua estrutura química, perfil de toxicidade e padrões de exposição (Vinardell, 2015). Deve-se ter em especial consideração os produtos cosméticos utilizados em grupos de risco, como crianças, grávidas, pessoas idosas, entre outros, assim como a sua utilização a longo prazo, uma vez que determinados produtos podem ser utilizados mais frequentemente durante uma grande parte da vida humana.

A possível interação entre os ingredientes também deve ser avaliada com base em experiências realizadas anteriormente, podendo ser avaliada através da realização de testes *in-vitro* ou testes de compatibilidade com a pele. A toxicidade sistémica resultante de absorção percutânea, por acidente ou por ingestão oral já prevista (como em produtos de higiene oral ou batons) deve também ser considerada (COLIPA - The European Cosmetics Association, 2004).

Tradicionalmente, os estudos de toxicidade eram elaborados através do estudo do perfil de toxicidade em animais das substâncias em estudo, com recurso à mesma rota de exposição que a utilizada em humanos (tópica, oral ou por inalação) (Vinardell, 2015). No entanto, desde 2013, na Europa passou a ser obrigatória a avaliação de ingredientes cosméticos com recurso a métodos alternativos que não utilizem animais. Como tal, estão a ser desenvolvidos métodos tais como a cultura de células, de tecidos e de órgãos, modelos matemáticos, utilização de bactérias e organismos unicelulares, entre outros.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade, não é possível determinar absolutamente o risco que uma determinada amostra apresenta para a população humana, pois é muito difícil extrapolar para os seres humanos os resultados de toxicidade obtidos para os organismos utilizados nos testes laboratoriais ou até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies.

Contudo, os resultados destas análises providenciam informação relevante para se proceder ou não a outro tipo de testes.

Ao se elaborar a avaliação da segurança dos ingredientes não devem ser considerados apenas os resultados toxicológicos, mas também se deve ter em conta os seguintes parâmetros:

- Tipo de produto no qual o ingrediente vai ser incorporado
- Método de aplicação
- Concentração do ingrediente no produto
- Quantidade de produto utilizado em cada aplicação
- Frequência de aplicação
- Local de aplicação do produto
- Duração do contacto (produto *leave-in* versus produto exaguável)
- Tipo de consumidor

Existem dois tipos de testes de toxicidade: os testes de toxicidade aguda e os testes de toxicidade crónica. Nos primeiros são avaliados os efeitos baseando-se na exposição com concentrações relativamente elevadas (mg/L) da substância a analisar, no máximo por 96 horas. Neste caso, a toxicidade pode ser expressa de dois modos: concentração letal que pode causar a morte de 50% dos animais no grupo de teste (LC₅₀, mais utilizada na determinação da toxicidade por inalação) ou pela dose letal que mata 50% da população num dado período de tempo (LD₅₀, mais utilizada na determinação da toxicidade por ingestão). Os testes de toxicidade crónica investigam a exposição a longo prazo, desde apenas algumas semanas até o ciclo de vida inteiro da espécie em teste, sendo utilizadas concentrações relativamente baixas (µg/L). A toxicidade pode ser expressa como concentração sem efeito observado (NOEC) ou como a concentração mais baixa na qual foi observado o efeito (LOEC). Estes dados são obtidos através da análise da taxa de sobrevivência, crescimento e reprodução (Libralato *et al.*, 2016).

Devido à tendência de limitar a utilização de animais em testes laboratoriais e considerando que a *Artémia* é um crustáceo de água salgada cujas larvas são sensíveis a

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

diversas substâncias, os bioensaios com *Artemia salina* L. podem ser úteis para prever, num teste simples e rápido, a toxicidade aguda de diversos compostos sendo um guia para os testes posteriormente realizados (Logarto Parra *et al.*, 2001).

As principais vantagens da utilização de crustáceos de água salgada nos testes de toxicidade são (Libralato *et al.*, 2016):

- Rapidez;
- Relação custo-efeito;
- A disponibilidade de náuplios eclodidos a partir de ovos comerciais, ou seja, a homogeneidade da população e a disponibilidade durante todo o ano sem ser necessário fazer culturas;
- Elevada adaptabilidade a diversas condições;
- Fácil manipulação e manutenção em condições laboratoriais;
- Pequeno tamanho o que permite a utilização de placas de Petri;
- Existência de bom conhecimento acerca da sua biologia e ecologia.

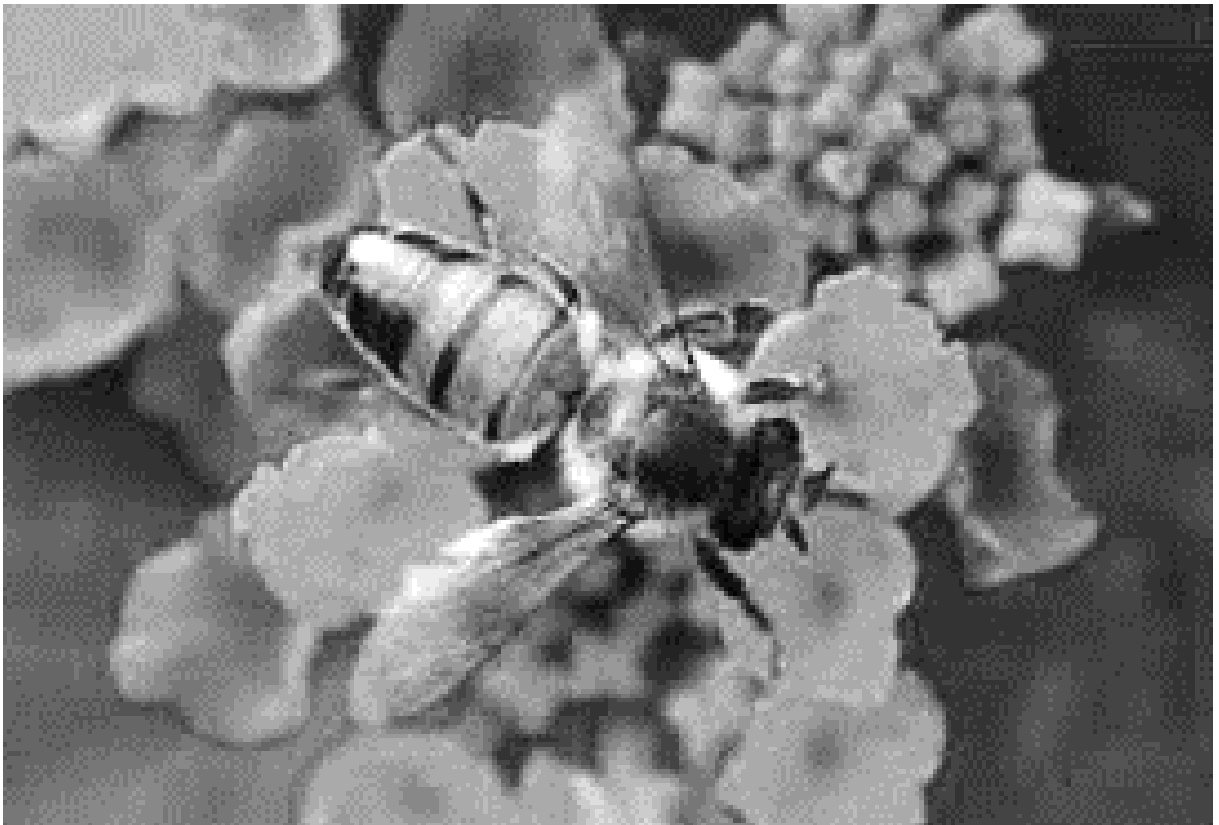
No entanto, a produção de ovos pode refletir a ocorrência de variações genéticas causadas pela origem geográfica dos crustáceos, a qual raramente é conhecida apesar de serem utilizados ovos certificados nos testes de toxicidade. Esta pode ter consequências no crescimento, sobrevivência e reprodução das espécies de *Artemia salina*, especialmente a salinidade e a temperatura (Libralato *et al.*, 2016).

A segunda variável a ter em conta é iniciar os testes de toxicidade com náuplios (**Figura 13**) pertencentes à mesma classe de idade, uma vez que algumas fases são mais sensíveis que outras.



Figura 13 - As diferentes fases de crescimento da *Artemia salina* (Fonte: Neli Martín, 2017).

Durante este estudo foram realizados testes de toxicidade aguda tanto aos óleos essenciais obtidos como ao extrato de *Clytocybe odora*, tendo sido determinado o valor de LC₅₀.



Objetivos

2 Objetivos

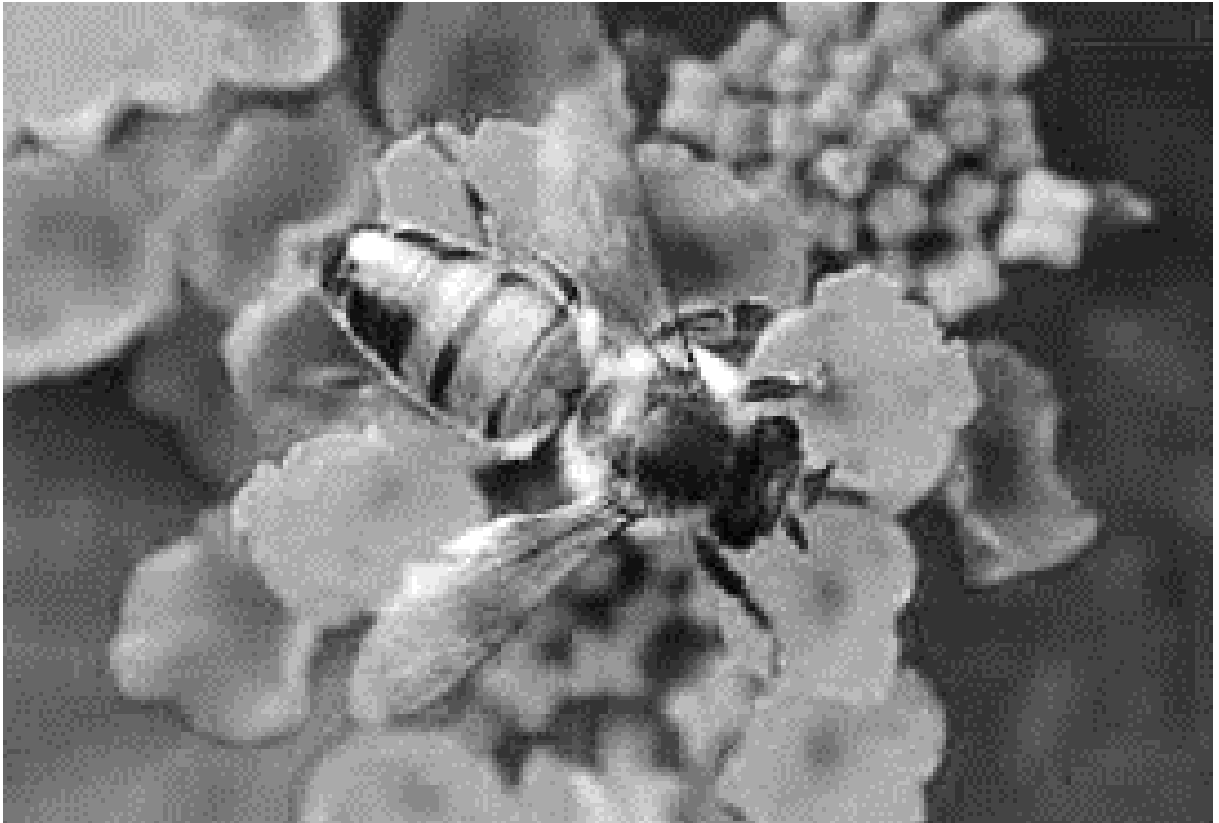
Este estudo teve como principal objetivo a comparação da estabilidade, toxicidade, dos parâmetros físico-químicos e da capacidade de inibição do crescimento microbiano de duas formulações cosméticas distintas, às quais foram incorporados dois produtos apícolas distintos (mel de *Lavandula ssp.* e extrato hidroalcoólico de própolis) e óleos essenciais de duas plantas medicinais e aromáticas (*Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e *Mentha pulegium* L.). Foi também analisada a composição volátil de uma cultura *in vitro* de *Clytocibe odora* e, de acordo com a informação relativa à bioatividade dos seus compostos maioritários e da toxicidade da mesma, foi avaliada a sua potencial incorporação em formulações cosméticas futuramente.

Para atingir os objetivos pretendidos foram realizados os seguintes procedimentos:

- Recolha, identificação e desenvolvimento de uma cultura *in vitro* em meio sólido de *Clytocibe odora*, utilizando dois meios de cultura com composição diferente (meio Potato dextrose agar e meio sólido *Melin-Norkans* incompleto);
- Extração de voláteis dos micélios obtidos nas diferentes culturas utilizando uma destilação-extração de *Likens-Nickerson* (LN);
- Identificação dos compostos voláteis nas amostras de cultura *in vitro*;
- Desenvolvimento de duas formulações cosméticas de aplicação tópica com dois produtos apícolas (mel e extrato hidroalcoólico de própolis) e dois óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais (*Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e *Mentha pulegium* L.);
- Análises de estabilidade das formulações e testes físico-químicos relevantes;
- Realização de ensaios com *Artemia Salina* para determinar o valor de LC₅₀ dos óleos essenciais utilizados e dos voláteis obtidos a partir do micélio de *Clytocibe odora* assim como para determinar a toxicidade dos mesmos na concentração utilizada nas formulações desenvolvidas.

Objetivos

- Determinação do potencial irritativo ocular através do teste HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane) das formulações desenvolvidas.



Materiais e métodos

3 Materiais e métodos

3.1 Recolha dos corpos frutíferos de *Clitocybe odora* (Bull.) e desenvolvimento da cultura do micélio *in vitro*

Os corpos frutíferos do fungo *Clitocybe odora* (Bull.) (**Figura 14**) foram recolhidos em dois habitats distintos: no pinhal e no carvalhal, na zona de Bragança, Portugal. A identificação taxonómica foi realizada de acordo com Moser (1983), tendo sido posteriormente congelados a -20 °C.



Figura 14 – Exemplo de um corpo frutífero recolhido.

Os fungos anteriormente recolhidos foram esterilizados superficialmente com uma solução de álcool a 70% e cortados ao meio recorrendo a um bisturi estéril, numa câmara de fluxo laminar em condições de assepsia, tendo sido retirado o micélio que se encontrava no interior do chapéu e pé dos mesmos. O micélio foi incorporado em placas de Petri (duas para cada meio) com dois tipos de meios de cultura diferentes: meio sólido *Melin-Norkans* incompleto (MMN incompleto; **Anexo 7.1**) e meio *Potato Dextrose Agar* (Biolab) (PDA; **Anexo 7.2**). As placas foram fechadas com parafilme e armazenadas a 20-25 °C, no escuro.

Com a incubação, o crescimento das hifas resultou na produção de micélio indiferenciado na superfície e no interior da cultura.

3.2 Determinação da curva de crescimento do micélio

Na determinação da curva de crescimento as placas de Petri anteriormente mencionadas, foram devidamente marcadas e divididas em quatro partes (R1, R2, R3 e R4) para efetuar as medições do crescimento do micélio (**Figura 15**).

As medições do raio de crescimento foram efetuadas de 8 em 8 dias, em três réplicas, durante 81 dias, tendo sido feita uma média dos valores obtidos e uma representação dos mesmos em função do tempo, obtendo-se assim a curva de crescimento.

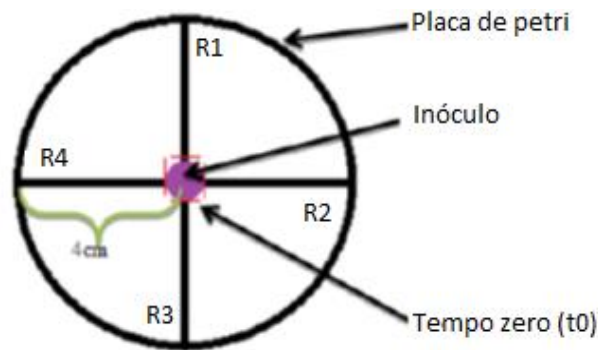


Figura 15 - Esquema representativo do procedimento utilizado para a determinação das curvas de crescimento do micélio de *Clitocybe odora* (Adaptado de: Pinto, 2012).

3.3 Preparação do micélio

Após a identificação da fase estacionária recolheu-se uma pequena porção de micélio das placas de Petri anteriormente preparadas, com recurso a um bisturi estéril. A porção do micélio foi transferida para novas placas de Petri com os meios anteriormente mencionados, nas quais foi incorporada uma folha de celofane na superfície do meio, a folha de celofane foi previamente lavada no micro-ondas duas vezes com água potável até esta entrar em ebulição e posteriormente autoclavada duas vezes em água destilada.

Este passo teve como objetivo a promoção do crescimento do micélio na parte superior da folha de celofane, de modo a separar o micélio do meio de crescimento para posterior extração.

3.4 Extração de voláteis

Os compostos voláteis presentes no micélio de *Clytocibe odora*, localizados na superfície da folha de celofane, foram extraídos num destilador *Likens-Nickerson* (LN), durante três horas, tendo-se utilizado como solvente pentano p.a (Carlo Erba reagents) previamente destilado (**Figura 16**).



Figura 16 - Destilação-extração *Likens-Nickerson* de *Thymus zygis* L. subsp.. *zygis*.

A temperatura da extração do pentano foi ajustada à sua temperatura de ebulição (36 °C) e o condensador (Heto HMT 200) ajustado à temperatura constante de 5 °C. Após a extração dos voláteis, foi recolhido o pentano destilado com os compostos dissolvidos no mesmo, seguidamente o extrato obtido foi concentrado utilizando um evaporador rotativo (Rotavapor R 110, Sotel) e a amostra foi recolhida num vial com rolha de teflon, colocada a -20 °C e posteriormente analisada. O mesmo procedimento foi utilizado para a obtenção dos voláteis das inflorescências de *Mentha pulegium* L.,

recolhido na Quinta do Poulão e das partes aéreas de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*, recolhido em Rebordões (aldeia dos arredores de Bragança). A análise de todas as amostras obtidas foi efetuada por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS) e por Cromatografia Gasosa (GC) (Pinto, 2012).

3.5 Análise dos voláteis

A análise dos voláteis foi elaborada com recurso à Cromatografia Gasosa (GC) e à Cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC/MS) tendo sido identificados os compostos presentes em cada amostra e a percentagem correspondente.

3.5.1 Cromatografia Gasosa

As amostras dos voláteis obtidos a partir da destilação-extração LN foram analisadas por GC, num cromatógrafo de gás Perkin Elmer 8700, equipado com dois detetores de ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados (software TurboChrom™ Workstation da Perkin Elmer) e uma coluna de sílica fundida: DB-1, de fase imobilizada de metilsilicone (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25µm). A temperatura do forno seguiu a seguinte ordem: 45-175 °C a 3 °C por minuto, subindo depois até aos 300 °C a uma velocidade de 15°C por minuto, temperatura mantida isotérmica durante 10 minutos; a temperatura do injetor e do detector foi de 290 °C e 300 °C, respetivamente; foi usado hidrogénio como gás de arrastamento com uma velocidade de 30cm/s; foram utilizados volumes de injeção de amostra de 0,2µL, com uma repartição de fluxo de 1:50.

A composição percentual dos compostos constituintes do óleo essencial foi definida pelo método da normalização, através da integração das áreas dos picos, sem a utilização de fatores de correção. Os valores apresentados equivalem ao valor médio de duas injeções.

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

3.5.2 Cromatografia gasosa-espectrometria de massa

Para uma análise qualitativa, recorreu-se a Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/MS). Utilizou-se um cromatógrafo Perkin Elmer Clarus 600, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30m x 0,25mm d.i., espessura de filme 0,25 μ m) ligado a um espectrómetro de massa Perkin Elmer Turbomass Clarus 600T. A temperatura do forno é igual à referida anteriormente, a do injetor foi programada para 300 °C, a linha de transferência para os 280 °C e a câmara de ionização para os 220 °C. A velocidade linear do gás de arrastamento, hélio, foi de 30 cm/s. As amostras foram injetadas com uma repartição de fluxo de 1:40, utilizando uma energia de ionização de 70eV, uma corrente de ionização de 60 μ A e uma gama de massas 40-300u. Foram injetados volumes de 0,1 μ L e o tempo de varrimento foi de 1s.

A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos respetivos índices de retenção, relativos à série n-alcanos C₇-C₁₇ na coluna DB-1, e espectros de massa com os de padrões comerciais e de compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e ainda com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida nos laboratórios do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar Lisboa, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.

3.6 Extração de óleos essenciais

Recolheram-se as inflorescências de *Mentha pulegium* L. (poejo) na Quinta do Poulão e as partes aéreas de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* em Rebordãos. O material recolhido foi utilizado para extrair o óleo essencial de cada espécie com recurso a um Clevenger. Para tal pesou-se 70-80 g de cada amostra que foi colocada num Erlenmeyer com 800 g de água ultrapura, o material foi deixado 3 horas a destilar após a água se encontrar em ebulição (**Figura 17**). Seguidamente recolheu-se, determinou-se o rendimento, identificou-se e armazenou-se o óleo essencial a -20 °C.



Figura 17 - Destilação com recurso a um Clevenger de *Thymus zygis* L. subsp.. *zygis*.

3.7 Maceração de *Calendula officinalis* L.

As flores de *Calendula officinalis* L. foram recolhidas na cidade de Bragança (zona “Além do Rio”), tendo sido secas durante 7 dias a 30 °C numa estufa. Posteriormente, estas foram maceradas com óleo de amêndoas doces (Cmd Chemicals), na proporção 1:3,1 (g/g), durante 2 horas, em banho-maria. O macerado obtido foi filtrado e guardado num frasco de vidro âmbar, à temperatura ambiente, até ser incorporado na formulação.

3.8 Elaboração do extrato hidroalcoólico de própolis

O extrato de própolis foi obtido utilizando um banho de ultrassons (2510 Branson). Foram colocados 10 g de amostra num Erlenmayer com 100 mL de etanol a 70%, tendo estado num banho de ultrassons a 26 °C durante 30 minutos. Posteriormente a amostra foi filtrada e guardada num frasco escuro (**Figura 18**) a -20 °C (Trusheva *et al.*, 2007).

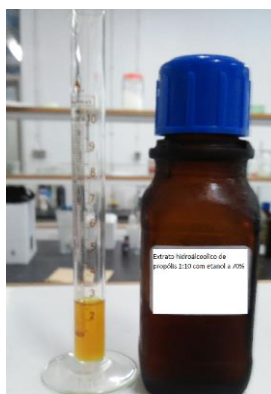


Figura 18 - Extrato hidroalcoólico de própolis.

3.9 Análise do extrato de própolis

Para a análise do extrato de própolis foi feita a quantificação dos compostos fenólicos tendo sido utilizados métodos espectroscópicos. Adicionalmente foi determinado o conteúdo balsâmico do mesmo. Todas as análises foram realizadas em triplicado.

3.9.1 Conteúdo balsâmico

Foram evaporados até à secura, em vácuo, 2 mL do extrato de própolis obtido, calculando-se a percentagem de conteúdo balsâmico nos extratos como a razão entre a massa de extrato seco e a massa de própolis utilizada na extração do mesmo.

3.9.2 Fenóis totais

Uma alíquota do extrato etanólico (0,2 mL) foi adicionada a 0,4 mL de reagente de Folin-Ciocalteu. Posteriormente adicionou-se 0,6 mL de uma solução de carbonato de

sódio (20%) e ajustou-se o volume final para 5 mL com água desionizada. A solução foi posteriormente guardada no escuro durante duas horas à temperatura ambiente. Seguidamente foi medida a absorvância da mesma a 760 nm num espectrofotómetro. Para o branco foi utilizado o mesmo procedimento, tendo-se substituído a alíquota da solução de trabalho por etanol 70%. O padrão utilizado foi o ácido gálico num intervalo de concentrações entre 0,025 mg/mL e 0,3 mg/mL.

3.9.3 Flavonas e flavonóis

O conteúdo em flavonas e flavonóis foi determinado com recurso a um espectrofotómetro. A uma alíquota (1 mL) de extrato etanólico de própolis foi adicionado 0,5 mL de uma solução de cloreto de alumínio (5% de cloreto de alumínio em metanol). O volume de 25 mL foi ajustado com metanol. A solução foi guardada durante 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Seguidamente foi medida a absorvância da mesma a 415 nm num espectrofotómetro. Para a medição do branco efetuou-se o mesmo procedimento tendo-se substituído a solução de trabalho por etanol a 70%. Para a obtenção da curva de calibração foram utilizadas soluções de quercetina, no intervalo de concentrações entre 0,005 a 0.25 mg/mL.

3.9.4 Flavanonas e di-hidroflavonóis

A uma alíquota (1 mL) de extrato etanólico de própolis adicionou-se 2 mL da solução de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP) (1 g de DNP em 2 mL de ácido sulfúrico 96%, perfazendo com metanol para um volume final de 100 mL). Esta solução foi aquecida a 50 °C durante 50 minutos, num banho de água com agitação). Após o arrefecimento da solução, esta foi misturada com 7 mL de uma solução de hidróxido de potássio (10% em metanol). De seguida retirou-se 0,5 mL da solução para um novo tubo onde se adicionou 24,5 mL de metanol, para perfazer um volume final de 25 mL.

A avaliação da intensidade do complexo formado foi medida a 486 nm no espectrofotómetro. A determinação do branco foi preparada segundo os mesmos procedimentos, tendo-se utilizado etanol 70% em substituição da solução de trabalho. O padrão utilizado para a obtenção da curva de calibração foi a naringenina, preparando-se com recurso ao protocolo acima descrito, tendo-se utilizado um intervalo de concentrações entre 0,1 mg/mL e 2,50 mg/mL.

3.10 Desenvolvimento e otimização de duas formulações cosméticas de aplicação tópica

Foi elaborada uma emulsão (**Tabela VI**) para aplicação nos pés (emulsão 1) cuja composição foi retirada do Formulário galénico português, o que garante a validação a mesma. Os componentes oleosos, vaselina branca (CMD chemicals) e lanolina (BDH PROLABO), foram fundidos em banho maria até a mistura oleosa atingir a temperatura de 75 °C. A ureia (Merck) foi dissolvida em água destilada, sendo esta aquecida até 75 °C. Após o aquecimento, a parte aquosa foi adicionada à parte oleosa com agitação contínua, obtendo-se uma emulsão água/óleo. Posteriormente, o ácido salicílico (Sigma) foi incorporado, por espatulação.

Tabela VI - Composição de uma emulsão para gretas nos pés (emulsão 1).

Componentes	% (m/m)
Ureia	10
Lanolina	10
Água destilada	12
Vaselina branca	63
Ácido salicílico	5

Foi ainda elaborada uma outra emulsão (emulsão 2), tendo como base uma adaptação da formulação descrita por Aswal *et al.*, (2013), com propriedades regenerantes destinada a ser utilizada em feridas (**Tabela VII**). Para tal, a fase oleosa, composta por macerado de *Calendula officinalis* L. em óleo de amêndoas doces (Cmd Chemicals), álcool cetílico (FarmaQuímica Sur S. L.) e manteiga de karité (FarmaQuímica Sur S. L.), foi aquecida a 75 °C. O glicerol (laboratório MaiaLab) foi dissolvido em água, constituindo esta mistura a fase aquosa que foi aquecida em banho-maria até 75 °C. Após o aquecimento, a fase aquosa foi adicionada à fase oleosa com agitação contínua, até a emulsão arrefecer.

Tabela VII - Composição de uma emulsão regenerante (emulsão 2).

Componentes	% (m/m)
Manteiga de karité	63,4
Álcool cetílico	3,1
Macerado de flores de calêndula em óleo de amêndoas doces	6,1
Glicerol	4,6
Água destilada	22,8

Formulação adaptada de: (Aswal *et al.*, 2013).

3.11 Incorporação de produtos apícolas e de óleos essenciais nas formulações

Foi testado o efeito na estabilidade e na capacidade de conservação das emulsões, de dois produtos apícolas diferentes (extrato hidroalcoólico de própolis e dois méis de rosmaninho (*Lavandula sp.*) provenientes de duas zonas de Portugal diferentes, a amostra 114 é proveniente do Norte (Macedo de Cavaleiros - Podence), enquanto que a amostra 22 foi recolhida no Sul (Odemira - São Martinho Amoreiras), sendo identificadas neste estudo por MAC e OD respetivamente e de óleos essenciais de duas espécies diferentes (*Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e *Mentha pulegium* L.) obtidos por extração com Clevenger, pelo procedimento anteriormente mencionado.

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade

Para tal elaboraram-se várias preparações às quais foi adicionado um dos óleos essenciais anteriormente extraídos e um produto apícola. Foi ainda elaborado, para cada tipo de emulsão, uma preparação sem a incorporação de nenhum produto apícola, sendo esta considerada como referência e utilizada para comparar os diversos parâmetros medidos (**Tabelas VIII e IX**).

A introdução do óleo essencial e dos produtos apícolas na emulsão 1 foi realizada no passo de espatulação enquanto na emulsão 2 foi elaborada após o arrefecimento da mesma, tendo sido utilizado o óleo essencial na concentração de 1/1,7 % m/m (óleo essencial/ preparação). Relativamente aos produtos apícolas utilizou-se mel de *Lavandula sp.* na proporção de 1:50 (v/m) e de 1:20 (v/m) assim como 5% (m/v) de extrato hidroalcoólico de própolis

Tabela VIII - Tipos de compostos incorporados na emulsão 1

Emulsão	Óleo essencial		Produto apícola				
	<i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	<i>Mentha pulegium</i>	Mel MAC		Mel OD	Extrato de própolis	
			1:50	1:20	1:50	1:20	5% (v/m)
FC1	X						
FC2	X			X			
FC3	X		X				
FC4	X					X	
FC5	X				X		
FC6	X						X
FC7		X					
FC8		X		X			
FC9		X	X				
FC10		X				X	
FC11		X			X		
FC12		X					X

Tabela IX - Tipos de compostos incorporados na emulsão 2

Emulsão	Óleo essencial		Produto apícola				
	<i>Thymus zygis</i> subsp. <i>zygis</i>	<i>Mentha pulegium</i>	Mel MAC		Mel OD	Extrato de própolis	
			1:50	1:20	1:50	1:20	5% (v/m)
F1	X						
F2	X			X			
F3	X		X				
F4	X					X	
F5	X				X		
F6	X						X
F7		X					
F8		X		X			
F9		X	X				
F10		X				X	
F11		X			X		
F12		X					X

3.12 Testes físico-químicos

3.12.1 Medição do pH

Foi utilizada uma fita de medição do pH (daygraphica), colocada diretamente em contacto com a preparação a testar, o pH foi determinado por comparação visual do padrão de cores.

3.12.2 Viscosidade

Foi utilizado um viscosímetro rotativo Myr (**Figura 19**) com um *splindle* L4 tendo sido analisados 5 gramas de amostra que se encontravam num banho de água à temperatura de 25 °C (**Figura 20**).



Figura 19 - Viscosímetro rotativo Myr.



Figura 20 - Amostras em banho de água regulado à temperatura de 25 °C.

A viscosidade foi registada utilizando quatro velocidades de rotação distintas na seguinte sequência: 0,3 rpm, 0,4 rpm, 0,5 rpm, 0,6 rpm e 1 rpm. Após 5 minutos foi

novamente medida a viscosidade utilizando a sequência inversa das velocidades de rotação mencionadas anteriormente.

3.12.3 Densidade relativa

A densidade relativa foi determinada, utilizando um picnómetro, através da seguinte expressão

$$d_{relativa} = \frac{m_1}{m_2 - m_3},$$

sendo m_1 a massa da amostra, m_2 a massa do picnómetro com a amostra ao lado e m_3 a massa do picnómetro com a amostra no seu interior.

3.12.4 Teste com luz

As amostras (5 g) foram submetidas a condições extremas de luminosidade, numa embalagem de plástico transparente, com recurso a uma lâmpada daylight, encontrando-se a lâmpada 16 horas ligada e 8 horas desligada, durante 15 dias, com o objetivo de detetar sinais de instabilidade à exposição à luz. A ocorrência de separação de fases ou a alteração da coloração dos produtos é indicativa da instabilidade do produto.

3.12.5 Teste de vibração mecânica

Utilizaram-se 5 g de cada amostra que foram submetidos a vibração num agitador vórtex durante 10 segundos. Este procedimento tem como objetivo replicar as condições

de transporte, indicando se os movimentos de vibração do mesmo podem modificar a amostra.

3.13 Teste de estabilidade acelerado

No teste de estabilidade acelerado, as amostras (3 g) foram armazenadas à temperatura de $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ a $75\% \pm 5\%$ de humidade relativa (H.R.) durante duas semanas. Após este período as características organoléticas de cada emulsão (cor, aroma, separação de fases e a ocorrência de liquidação) foram analisadas tendo sido comparadas com as da emulsão de referência (com o óleo essencial, mas sem a introdução de um produto apícola).

3.14 Atividade antimicrobiana das emulsões

Testou-se o efeito da inibição dos produtos cosméticos elaborados no crescimento de estipes bacterianas e em fungos, nomeadamente *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia Coli* e *Candida Albicans*. Após a elaboração dos respetivos meios de cultura (**Anexos 7.4 e 7.5**) estes foram autoclavados a 125 °C durante 20 minutos e posteriormente colocados em placas de Petri estéreis (10 mL). Em cada uma das placas foram colocados 0,1 mL do inóculo correspondente a cada microrganismo e espalhado utilizando um espalhador. Seguidamente cada placa foi dividida em quatro partes tendo-se colocado em cada quadrante uma porção da formulação a testar, e no centro um círculo de papel com antibiótico (Clorofenicol e Fluconazol nas placas inoculadas com bactérias e com fungos respetivamente). Foram adicionalmente selecionadas 2 placas de Petri por cada meio, uma apenas com o microrganismo inoculado e uma outra, sem inóculo, colocada ao ar durante 10 minutos.

Por fim todas as placas de Petri nas quais foram inoculadas bactérias foram guardadas a 37°, as placas que continham leveduras foram guardadas a 25°C. As placas foram observadas 2, 4 e 6 dias após a inoculação, tendo-se verificado se existia halo de inibição em cada uma, o que permitiu observar se ocorria inibição do crescimento microbiano por parte das formulações cosméticas elaboradas.

3.15 Teste de contaminação microbiana

Testou-se a existência de contaminação microbiana em todas as formulações elaboradas tanto de bactérias como de leveduras. Após a elaboração dos respetivos meios de cultura (**Anexos 7.4 e 7.5**), estes foram autoclavados a 125°C durante 20 minutos e posteriormente colocados em placas de Petri estéreis (0,1 mL). No centro de cada placa de Petri foi colocado aproximadamente 0,2 g de cosmético. Por fim as placas com meio de cultura bacteriano foram guardadas a 37°C e as placas com meio de cultura de leveduras foram guardadas a 25°C.

As placas de Petri foram observadas 2, 4 e 6 dias após terem sido colocadas na estufa, tendo-se observado se existiam colónias microbianas em desenvolvimento, sendo este um sinal indicativo de que a formulação se encontrava contaminada com o microrganismo correspondente ao meio de cultura elaborado.

3.16 Teste espectrofotométricos

As amostras **FC1-FC12** foram diluídas em ciclohexano (Riedel de Haën, AlliedSignal) numa proporção de 1/100 (m/v) e posteriormente submetidas a uma análise espectrofotométrica, tendo sido traçado o espectro, na região do UV-Visível,

entre 210 e 600 nm. Cada espectro foi comparado com o espectro obtido para a amostra de referência (sem a introdução de qualquer produto apícola).

3.17 Estudo de toxicidade dos extratos

Foi determinado o valor da concentração letal média, LC_{50} , dos dois óleos essenciais utilizados e dos extratos de *Clytocibe odora* obtidos. Para tal foi utilizado um crustáceo, *Artemia salina* L., tendo sido utilizados 800 μ L de suspensão com *Artemia salina* em 250 mL de água salgada artificial (solução de incubação) na qual esta foi incubada durante 24 horas à temperatura de 24°C e com uma intensidade luminosa de 2730 cd (center 337 mini lightmeter). A solução de incubação (**Anexo 7.3**) era constituída por NaCl (continente), sulfato de magnésio (Merck), cloreto de sódio (Panreac química Sau), cloreto de potássio (Panreac química Sau), cloreto de magnésio (Fluka) e hidrogenocarbonato de sódio (Merck).

Após 24 horas, foram colocados aproximadamente 10 crustáceos em cada poço utilizando uma pipeta descartável. Foram ainda adicionados diferentes volumes das amostras a analisar, previamente dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 250 mg/L, e posteriormente dissolvidas de modo a obter as concentrações desejadas (1,0, 0,4, 0,3, 0,2, e 0,1 mg/mL). Para completar o volume final de 6 mL em cada um dos poços foi utilizada a solução de incubação na concentração de 99,6%. Os crustáceos de água salgada presentes numa mistura de água artificial e DMSO serviram como controlo. Após 24 horas, foi calculada a taxa de sobrevivência (%) e determinada a concentração necessária da substância utilizada para matar 50% dos organismos (LC_{50}).

3.18 Potencial ocular irritativo das formulações

Foram obtidos ovos fertilizados de galinha, com peso entre 50 e 60 g, tendo sido incubados durante 10 dias a 37,5°C e com 46% de H.R. Os ovos foram incubados na posição horizontal tendo sido rodados 90° a cada 90 minutos. No dia 10 deu-se início à experiência, os ovos foram iluminados para assegurar a fertilidade dos mesmos e verificar a posição da camara de ar. A casca foi removida com um bisturi e uma pinça e a membrana interior foi cuidadosamente removida, para revelar a membrana cório-alantoide. A ocorrência de heperemia, hemorragia ou coagulação foi documentada durante um período de 300 segundos, após a aplicação das emulsões (0,3 g), e o efeito foi comparado com o dos controlos: 0,9 % NaCl (negativo) e 1 % NaOH (positivo).

Os efeitos irritantes observados foram classificados por pontuação de acordo com o tempo no qual foram detetados: menos de 30 segundos (heperemia: 5; hemorragia: 7; formação de coágulos: 9); entre 30 e 120 segundos (heperemia: 3; hemorragia: 5; formação de coágulos: 7); entre 120 e 300 segundos (heperemia: 1; hemorragia: 3; formação de coágulos: 5). Caso não fosse observado qualquer efeito após 5 minutos, a pontuação seria 0 (Mansur *et al.*, 2016).

Cada formulação foi classificada de acordo com o valor médio da soma da pontuação obtida: não irritante/pouco irritante, IS=0-4,99; moderadamente irritante, IS=5-8,99; severamente irritante, IS=9-21 (Mansur *et al.*, 2016).

Na **Figura 21** encontra-se esquematizado o trabalho experimental desenvolvido.

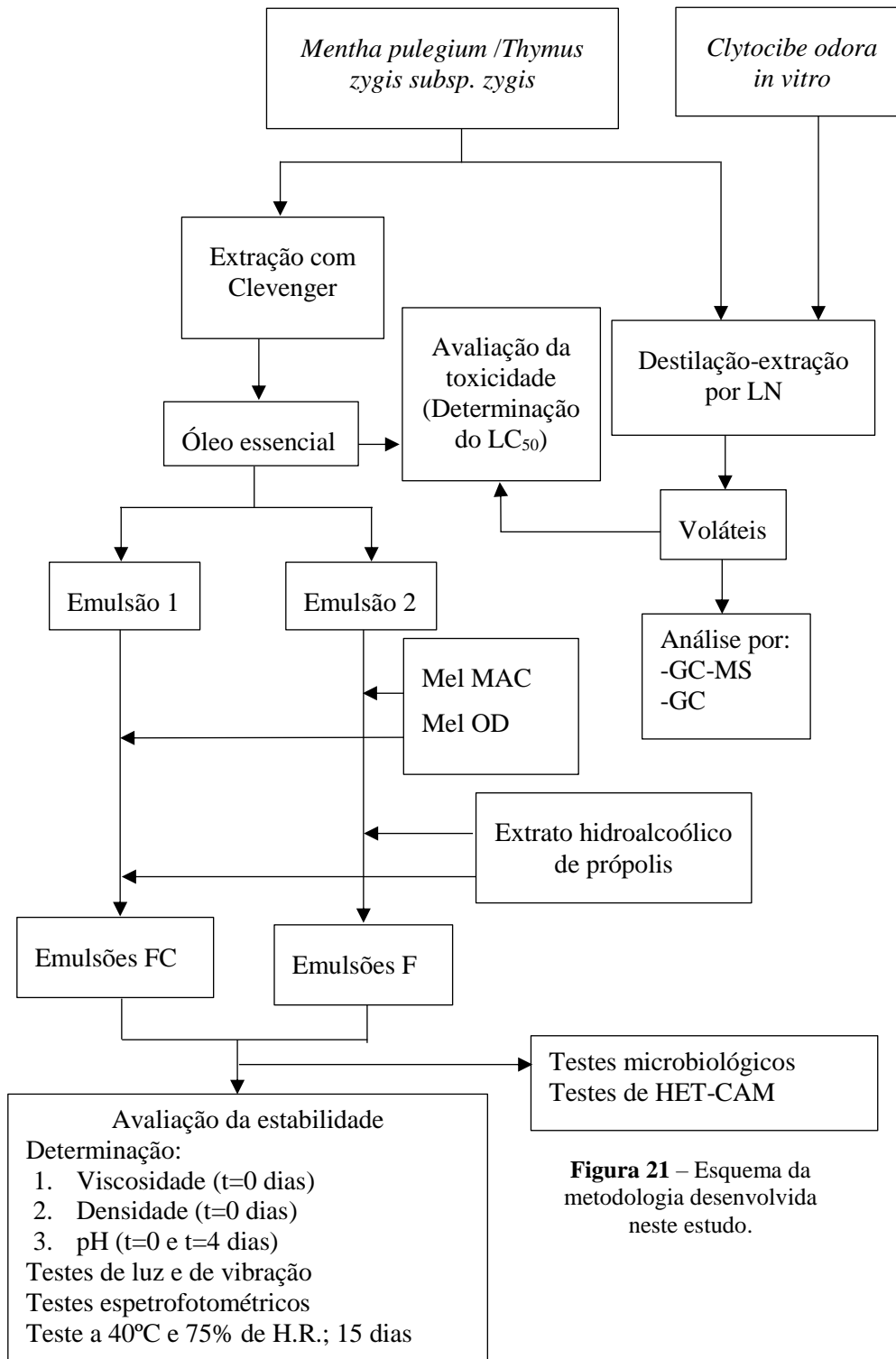


Figura 21 – Esquema da metodologia desenvolvida neste estudo.

Desenvolvimento de formulações cosméticas utilizando produtos apícolas e voláteis de cogumelos silvestres: determinação da estabilidade e toxicidade



Resultados e discussão

4 Resultados e Discussão

Durante o desenvolvimento deste estudo foi feita a comparação do crescimento do fungo *Clitocybe odora in vitro*, nos meios PDA e MMN incompleto. Pelo que foi possível apurar, até ao presente momento não foi realizado qualquer estudo acerca do crescimento *in vitro* do fungo *Clitocybe odora*. Posteriormente, e com o objetivo de escolher um composto para futuramente ser incorporado numa formulação cosmética, procedeu-se à extração e análise dos voláteis do micélio obtido do meio que apresentou melhores resultados.

Com o objetivo de avaliar o efeito de dois produtos apícolas em formulações cosméticas, foi utilizado um extrato hidroalcoólico de própolis e dois méis de *Lavandula spp.* em duas emulsões cosméticas de aplicação tópica tendo-se utilizado ainda óleo essencial de *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* subsp. *zygis*, os quais tinham como objetivo a conservação das emulsões. As emulsões obtidas foram avaliadas através de testes de estabilidade e físico-químicos. Foram também elaborados testes microbiológicos com o objetivo de tentar avaliar a capacidade antimicrobiana e conservante dos óleos essenciais utilizados nas formulações testadas. Adicionalmente foi determinado o potencial ocular irritativo de cada uma das emulsões através do teste de *Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane* (HET-CAM).

Foi feita a avaliação da toxicidade, através da determinação do valor de LC₅₀, dos óleos essenciais de *Mentha pulegium*, *Thymus zygis* subsp. *zygis* e do voláteis extraídos da cultura *in vitro* do fungo *Clitocybe odora* em *Artemia salina*.

4.1 Avaliação do crescimento do micélio de *Clytocibe odora* em dois meios de cultura diferentes

O crescimento dos fungos filamentosos pode ser medido através do crescimento das hifas sobre o meio de cultura, o qual está diretamente relacionado com o tempo de crescimento. As velocidades lineares de crescimento podem ser comparadas servindo como base para determinar quais as melhores condições de crescimento por técnicas mais exatas. No entanto, o crescimento linear não é uma medição exata do crescimento, uma vez que não considerada o padrão e frequência do mesmo e, conseqüentemente, a densidade de crescimento. Para além disso, existe a possibilidade de o crescimento poder ocorrer em três dimensões num substrato semissólido. Esta última característica pode ser evitada colocando uma folha de celofane permeável na superfície do agar, o que no entanto, condiciona a utilização de nutrientes pelo fungo (Miles & Chang, 2004).

Neste estudo foi feita a medição do crescimento do fungo *Clitocybe odora* através da média do raio da circunferência de crescimento, tendo-se inoculado o fungo em dois meios de cultura diferentes sem a utilização de uma folha de celofane.

O crescimento do micélio em meio sólido pode ser avaliado através da medição da área, volume ou do raio médio da circunferência de crescimento. O crescimento do fungo em função do tempo resulta numa curva do tipo sigmoide que pode ser dividida em várias fases, de acordo com as fases de crescimento (**Figura 21**).

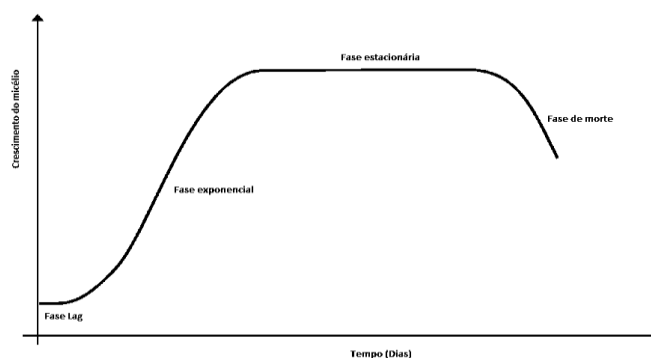


Figura 21 - Fases de crescimento dos fungos (Adaptado de: Staube & Muller, (2016)).

A primeira fase, a fase lag, é caracterizada por apresentar menores taxas de crescimento e a sua duração depende do tipo de inóculo e do meio de cultura. Na fase exponencial ocorre um crescimento exponencial dos microrganismos e é caracterizada por uma taxa de crescimento máxima. Na fase estacionária a velocidade de crescimento é igual à velocidade de morte da população, nesta fase a taxa de crescimento é nula. Na fase de morte a velocidade de morte da população é superior à velocidade de crescimento, sendo geralmente acompanhada de autólise (Montini, 2001).

As amostras de micélio recolhidas no campo foram inoculadas em dois meios de cultura distintos (em triplicado), PDA e MMN incompleto, tendo-se avaliado o crescimento do micélio através do registo da média do seu raio de crescimento em função do período de incubação. As curvas de crescimento obtidas encontram-se representadas na **Figura 22**.

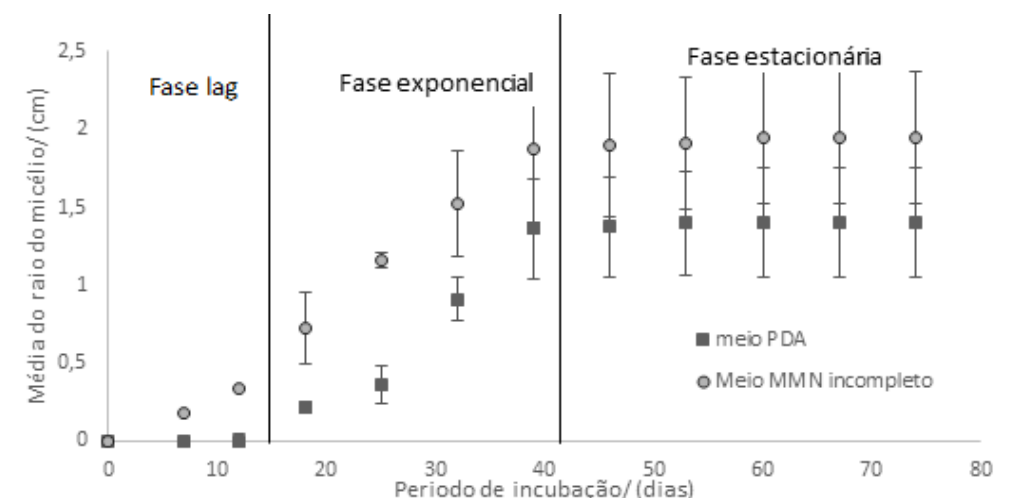


Figura 22 - Curva de crescimento do fungo *Clitocybe odora* em dois meios de cultura diferentes (PDA e MMN incompleto) (n=2).

Através da análise da **Figura 22**, pode-se notar que para ambos os meios de cultura (PDA e MMN incompleto) existe uma fase lag no crescimento do micélio, correspondendo à fase de adaptação deste ao meio. A partir do dia 18 verifica-se a existência da fase exponencial, nos dois meios de cultura, durante a qual a amostra que apresentou maior crescimento foi a inoculada em meio MMN incompleto. A fase exponencial dura até aproximadamente o dia 42, após o qual se verifica a fase estacionária.

Através da comparação do crescimento médio das culturas nos meios ensaiados, é possível verificar que o cogumelo *Clitocybe odora* apresentou uma taxa de crescimento mais elevada quando foi inoculado no meio MNM incompleto.

4.2 Identificação dos compostos voláteis dos extratos

4.2.1 Compostos voláteis extraídos do micélio de *Clitocybe odora*

Tendo em conta os resultados descritos na secção anterior, escolheu-se o meio MMN incompleto para a inoculação do *Clitocybe odora* com o objetivo de identificar quais os compostos presentes nos voláteis deste fungo, para a sua futura incorporação numa formulação cosmética. Os compostos voláteis, produzidos pelo micélio inoculado em meio MMN incompleto, foram extraídos utilizando um aparato de *Likens-Nickerson* (LN) e posteriormente analisados por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).

Na **Tabela X** apresentam-se os compostos voláteis produzidos pelo micélio de *Clitocybe odora* que foram identificados por GC e GC/MS. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos respetivos índices de retenção, relativos à série de *n*-alcanos C₇-C₁₇ em coluna DB-1, e os espectros de massa com os de padrões comerciais e de compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório. Para além disso, foi também utilizada uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida nos laboratórios do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar Lisboa, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, CBV, DBV, 1749-016 Lisboa, Portugal.

Tabela X - Composição da fração volátil de *Clitocybe odora* em meio MMN incompleto, obtida com um aparato de *Likens-Nickerson*.

Família	Componentes	RI	Percentagem relativa de área
Hidrocarbonetos monoterpénicos	α -Pineno	930	1,4
	Sabinene	958	0,5
	β -Pineno	963	v
	β -Mirceno	975	v
	p-Cimeno	1003	0,1
	<i>Limoneno</i>	1009	3,5
Monoterpenos oxigenados	1,8-Cineole	1005	2,1
	Fenchona	1050	v
	Cânfora	1102	0,8
	p-Mentona	1120	0,6
	Pulegona	1210	0,4
	Neral	1210	2,7
	Geranial	1240	2,8
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	β -Cariofileno	1414	0,5
	α -Curcumeno	1474	1,1
	γ -Cadineno	1500	1,8
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	trans-Nerolidol	1549	1,7
	Espatuleno	1551	21,1
	Óxido de β -cariofileno	1561	8,5
	Cedrol	1574	0,4
	Ledol	1580	2,5
	T-Cadinol	1616	3,5
Outros	Hexacosano	2600	5,0
	Nonacosano	2900	0,7
% de Identificação			61,7
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos monoterpénicos			5,5
Monoterpenos oxigenados			9,4
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos			3,4
Sesquiterpenos oxigenados			37,7
Outros			5,7

RI = Índice de Retenção em relação a *n*-alcanos C7-C17 em coluna DB-1; v- vestígios (% <0,05).

Foi possível identificar quase todos os compostos detetados no extrato obtido do *Clitocybe odora*, à exceção do composto eluído ao minuto 53,21. No total, identificaram-se vinte e quatro compostos constituindo 61,7% da área cromatográfica

correspondente à totalidade dos compostos voláteis presentes. Os compostos maioritários identificados na amostra foram o espatulenol e o óxido de β -cariofileno correspondendo respetivamente a 21,1 % e a 8,5 % da área cromatográfica da totalidade dos compostos extraídos.

A amostra é maioritariamente constituída por compostos do tipo sesquiterpenos oxigenados, correspondendo a 37,7 % dos compostos extraídos. Em relação aos hidrocarbonetos monoterpénicos e aos hidrocarbonetos sesquiterpénicos foram identificados 5,5 % e 3,4 % respetivamente da percentagem total de compostos presentes. Adicionalmente identificaram-se 9,4 % de monoterpénos oxigenados e 5,7 % dos compostos identificados não pertencem a nenhum dos grupos mencionados.

Rapior *et al.*, (2002) identificou o *p*-anisaldeído como o composto volátil maioritário presente em extratos de corpos frutíferos *in vivo*. A diferença entre os resultados obtidos nos estudos, *in vivo* e *in vitro*, poderá estar relacionada com as condições de stresse às quais o fungo *Clitocybe odora* é submetido quando cresce num meio de cultura. Esta hipótese está de acordo com vários estudos que mostram que os perfis dos componentes voláteis podem ser alterados não só pela espécie e variedade, mas também pelas condições de cultivo/*habitat* (Cho *et al.*, 2008; Cardoso *et al.*, 2011). Foi também descrito por Pinto *et al.*, (2013) que a composição química do fungo *Lepista nuda* (Bull. ex Fr.) Cooke varia de acordo com o local no qual o corpo frutífero se desenvolve. Para além disso, é de notar que, apesar da folha de celofane colocada entre o meio de cultura e o micélio do *Clitocybe odora* ser porosa, a absorção de nutrientes pelo mesmo é limitada, condicionando o seu crescimento e consequentemente a produção de compostos voláteis pelo micélio (Miles & Chang, 2004).

O espatulenol, que foi identificado como o composto volátil maioritário produzido pelo micélio de *Clytocibe odora in vitro*, é um sesquiterpeno oxigenado (**Figura 23**) aplicado em diversas áreas tais como a alimentação, medicina, indústria cosmética e de produção de detergentes (Paksoy *et al.*, 2016). O espatulenol apresenta uma moderada

atividade citotóxica (Areche *et al.*, 2009), tendo sido reportado como um imunoinibidor em linfócitos ativados (Ziaei *et al.*, 2011), para além de possuir potencial como agente anti-cancerígeno (Sivasubramanian & Brindha, 2013) e de possuir propriedades antibacterianas (Santos *et al.*, 2012).

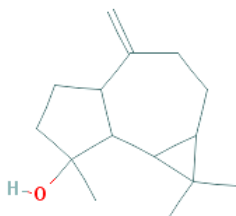


Figura 23 - Estrutura química do composto spatulenol (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2014).

O segundo composto maioritário produzido pelo micélio de *Clitocybe odora in vivo* foi o óxido de β -cariofileno (**Figura 24**), que apresenta um forte aroma amadeirado, sendo usado como aditivo na indústria cosmética e em alimentos. O óxido de β -cariofileno apresenta atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anticarcinogénica e ainda propriedades analgésicas (Fidyt *et al.*, 2016).

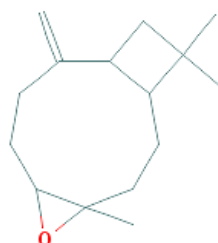


Figura 24 - Estrutura química do composto óxido de β -cariofileno Fonte: National Center for Biotechnology Information, 2004).

O crescimento de uma cultura *in vitro* é independente da estação do ano, sendo apenas necessário utilizar as condições ótimas de temperatura e luz para permitir o crescimento do micélio, o qual pode ser obtido na quantidade desejada. Como tal, a

obtenção de voláteis de uma cultura *in vitro* do *Clitocybe odora* pode ser feita na altura do ano desejada e na quantidade pretendida. Para além disto, e tendo em consideração as características biológicas reportadas para os compostos maioritários que foram identificados nos voláteis produzidos pelo micélio de *Clitocybe odora*, podemos considerar a cultura *in vitro* deste fungo como uma potencial fonte de compostos bioativos para a incorporação em formulações cosméticas.

Durante o período em que foi realizado este trabalho não foi possível explorar esta possibilidade, dado que não foi possível a obtenção da quantidade necessária de micélio de *Clitocybe odora*. No futuro, a incorporação dos compostos bioativos, extraídos do micélio deste fungo, em formulações cosméticas pode vir a ser estudada, uma vez que não foi encontrada na literatura informação relativa a este ponto.

Para além da extração e análise dos compostos voláteis produzidos pela cultura *in vitro* do micélio de *Clitocybe odora* foram ainda extraídos e analisados por GC e GC/MS os compostos voláteis do *Mentha pulegium* e do *Thymus zygis* subsp. *zygis*.

4.2.2 Compostos voláteis de *Mentha pulegium* (Poejo)

Na **Tabela XI** apresentam-se os compostos voláteis (óleo essenciais) extraídos por destilação-extração Likens-Nickerson da amostra de *Mentha pulegium*, identificaram-se trinta e um compostos, constituindo 97% da fração volátil. Os compostos maioritários identificados na amostra foram a pulegona, a piperitenona e a *p*-mentona, correspondendo respetivamente a 51,3%, 26,3% e a 6,8% da área cromatográfica total dos compostos identificados. O cromatograma obtido encontra-se no **Anexo 7.7**. Não foram encontrados estudos relativos à composição dos voláteis (óleos essenciais) presentes no *Mentha pulegium in vivo*, extraídos com uma destilação-extração num aparato LN.

Tabela XI - Composição da fração volátil (óleos essenciais) de *Mentha pulegium*.

Família	Componentes	RI	Percentagem relativa de área
Hidrocarbonetos monoterpénicos	α -Pinenos	930	1,0
	Canfeno	938	v
	Sabinene	958	0,3
	β -Pinenos	963	0,8
	β -Mirceno	975	0,5
	<i>p</i> -Cimeno	1003	0,1
	Limoneno	1009	3,8
	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	v
	γ -Terpineno	1035	v
	Terpinoleno	1064	0,1
Monoterpenos oxigenados	Fenchona	1050	0,5
	Linalool	1074	1,3
	Cânfora	1102	0,3
	<i>p</i> -Mentona	1120	7,4
	<i>iso</i> -Mentona	1126	0,5
	<i>cis</i> -Isopulegona	1134	1,0
	Terpinen-4-ol	1148	0,4
	α -Terpineol	1159	0,4
	Metilchavicol	1163	0,1
	Pulegona	1210	51,3
	Piperitona	1211	0,8
	<i>trans</i> -Anetole	1254	0,3
	Piperitenona	1289	23,6
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	Óxido de piperitenona	1330	0,2
	β -Bourboneno	1379	0,1
	β -Cariofileno	1414	0,1
	γ -Muuroloeno	1469	0,5
Outros	3-Octanol	974	0,8
	2-Nonanona	1058	v
	Naftaleno	1139	0,4
% de Identificação			97
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos monoterpénicos			6,6
Monoterpenos oxigenados			88,5
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos			0,7
Sesquiterpenos oxigenados			0
Outros			1,2

 RI = Índice de Retenção em relação a *n*-alcanos C7-C17 em coluna DB-1; v- vestígios (% <0,05).

A amostra é maioritariamente constituída por monoterpenos oxigenados, consttuindo 88,5% da área cromatográfica correspondeste à totalidade dos compostos identificados, não tendo sido identificado nenhum sesquiterpeno oxigenado. A percentagem relativa da área cromatográfica relativa aos hidrocarbonetos monoterpénicos e aos hidrocarbonetos sesquiterpénicos, correspondeu a 6,6% e a 0,7% respetivamente.

Em 2012, Teixeira *et al.* realizaram um estudo acerca da composição química do óleo essencial de *Mentha pulegium*, recolhido em Santarém, Portugal, no qual identificaram como compostos predominantes a *p*-mentona, a pulegona e o neo-menthol, correspondendo a 35,9%, 23,2% e 9,2% dos compostos presentes no óleo essencial respetivamente. As diferenças entre o resultado do estudo realizado por Teixeira *et al.*, (2012) e os resultados obtidos neste estudo poderão dever-se ao método de extração dos compostos. Este aspeto foi verificado por Kiran Babu *et al.*, (2016) aquando da comparação dos voláteis obtidos de *Lavandula angustifolia* recorrendo a várias técnicas de extração. Uma explicação alternativa para as diferenças observadas é o local e as condições edafoclimáticas da *Mentha pulegium* recolhido em Bragança e em Santarém serem distintas, para além do fato de as mentas apresentarem uma grande capacidade de hibridação entre elas e conseqüentemente a informação genética e o perfil dos poejos recolhidos em Bragança e em Santarém são distintos.

A pulegona (**Figura 9**) é um monoterpeno presente nas plantas, como a *Mentha piperita* L. (hortelã pimenta) e a *Mentha spicata* L. protegendo-as contra predadores. Utiliza-se para melhorar o aroma dos produtos cosméticos e como aromatizante na indústria alimentar, possuindo um aroma agradável (National Toxicology Program., 2011).

Alguns estudos indicam que a ingestão de elevadas doses do óleo essencial de *Mentha pulegium* causa toxicidade severa, e possivelmente a morte, o que ocorre devido

os metabolitos obtidos da metabolização de pulegona no citocromo P-450 (National Toxicology Program., 2011).

A piperitenona (**Figura 25**) é um derivado da mentona. Esta é a molécula precursora do óxido de piperitenona, um composto que se sabe ser um inseticida, um larvicida, um agente antiviral e antitumoral (Gañán *et al.*, 2015).

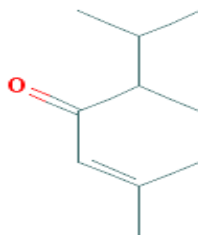


Figura 25 - Estrutura química do composto piperitenona (Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2005).

A *p*-mentona, ou mentona (**Figura 26**), é uma cetona presente no óleo essencial de diversas espécies botânicas tais como *Mentha piperita* L. e *Satureja calaminta* L. Scheele entre outras, sendo utilizada na perfumaria e na indústria cosmética e apresentando um odor fresco e mentolado (National Center for Biotechnology Information., 2004b).

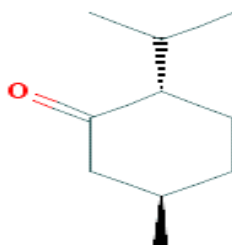


Figura 26 - Estrutura química do composto mentona (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2004b).

4.2.3 Compostos voláteis do *Thymus zygis* subsp. *zygis* (serpão-do-monte)

Para além da análise dos voláteis obtidos de amostras de *Mentha pulegium*, foram extraídos e analisados os voláteis de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*, tendo-se obtido os

resultados apresentados na **Tabela XII**. O cromatograma obtido encontra-se no **Anexo 7.6**.

Na amostra de voláteis analisada neste estudo foram identificados trinta e quatro compostos, o que corresponde a 96,6% da área cromatográfica da totalidade dos compostos identificados. Os compostos maioritários (**Tabela XII**) foram o carvacrol (59,2%), o γ -terpineno (14,8%), o p -cimeno (9,5%), o β -cariofileno (3,4%) e o linalol (2,1%). Estes resultados estão de acordo com um estudo onde também se identificaram o carvacrol, o γ -terpineno, o p -cimeno e o linalol como os compostos maioritários presentes num extrato de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* recolhido na zona de Rebordões (Bragança) (Dandlen *et al.*, 2011).

Tabela XII - Composição da fração volátil de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*.

Família	Componentes	RI	Percentagem relativa de área
Hidrocarbonetos monoterpénicos	α -Tujeno	924	0,7
	α -Pineno	930	0,3
	Canfeno	938	0,3
	β -Mirceno	975	1,1
	α -Felandreno	995	0,1
	Δ^3 -Careno	1000	v
	α -Terpineno	1002	1,1
	p -Cimeno	1003	9,5
	Limoneno	1009	0,3
	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1027	0,1
	γ -Terpineno	1035	14,8
	Terpinoleno	1064	0,1
	Monoterpenos oxigenados	1,8-Cineole	1005
Hidrato de <i>trans</i> -Sabineno		1037	0,5
Hidrato de <i>cis</i> -Sabineno		1066	0,1
Linalool		1074	2,1
Cânfora		1102	0,1
Borneol		1134	1,2
Terpinen-4-ol		1148	0,7
<i>cis</i> -Dihidrocarvona		1159	v
Formato de bornilo		1200	0,1
p -Cimen-7-ol		1265	0,1
Timol		1275	0,6
Carvacrol		1286	59,2
Acetato de carvacrilo		1330	v

Tabela XIII - Composição da fração volátil de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* (continuação).

Família	Componentes	RI	Percentagem relativa de área
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos	β -Bourboneno	1379	v
	β -Cariofileno	1414	3,4
	α -Humuleno	1447	0,1
	γ -Muuroloeno	1469	0,1
	γ -Cadineno	1500	0,1
	δ -Cadineno	1505	0,1
Sesquiterpenos oxigenados	Óxido de β -cariofileno	1561	0,3
Outros	1-Octen-3-ol	961	0,2
	3-Octanona	961	0,7
	3-Octanol	974	0,2
% de Identificação			98,6
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos monoterpénicos			28,4
Monoterpenos oxigenados			65,30
Hidrocarbonetos sesquiterpénicos			3,8
Sesquiterpenos oxigenados			0,3
Outros			1,1

RI = Índice de Retenção em relação a n-alcános C7-C17 na coluna DB-1; v- vestígios (% <0,05).

A amostra é maioritariamente constituída por compostos do tipo monoterpenos oxigenados, correspondendo a 65% da área cromatográfica total dos compostos identificados. Os hidrocarbonetos monoterpénicos, os hidrocarbonetos sesquiterpénicos e os sesquiterpenos oxigenados correspondem a 28,4%, 3,8% e 0,3% da área cromatográfica total dos compostos identificados, respetivamente.

O carvacrol que é o componente maioritário presente nos voláteis do *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* é um fenol monoterpénico e isómero do timol, sendo biossintetizado a partir do γ -terpineno, através do ρ -cimeno (**Figura 27**), pelo que em geral estes quatro compostos estão sempre presentes em amostras contendo carvacrol (Baser, 2008), tal como se verificou neste estudo.

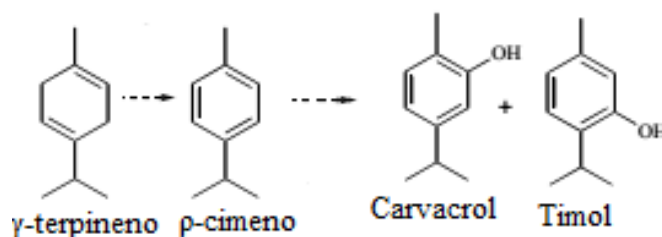


Figura 27 - Síntese de carvacrol e timol a partir de γ -terpineno (Adaptação de: Baser, 2008).

O carvacrol (Figura 28) apresenta atividade antimicrobiana nas membranas celulares bacterianas, atividade antiespasmódica, efeitos antimutagénicos e antitumorais assim como propriedades antioxidantes (Baser, 2008).

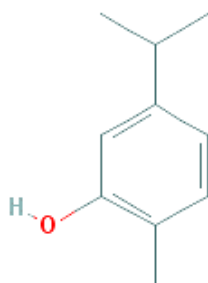


Figura 28 - Estrutura química do composto carvacrol (Fonte: National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database, 2005a).

O composto γ -terpineno (Figura 29) encontra-se presente em inúmeras espécies, entre as quais a *Salvia officinalis*, sendo utilizado na indústria alimentar como aditivo, na cosmética em produtos capilares e de higiene pessoal, assim como em detergentes da loiça e em amaciadores de roupa (National Center for Biotechnology Information., 2004a).

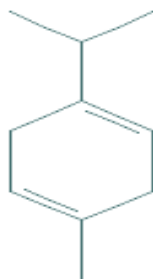


Figura 29 - Estrutura química do composto γ -terpineno (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2004a).

O *p*-cimeno (**Figura 30**), um hidrocarboneto aromático e incolor é utilizado como aditivo alimentar devido ao seu sabor cítrico e fresco (National Center for Biotechnology Information., 2004c).

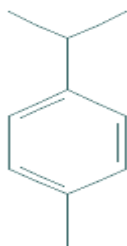


Figura 30 - Estrutura química do composto *p*-cimeno (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2004c).

O β -cariofileno (**Figura 31**) um sesquiterpeno bicíclico presente no óleo essencial de diversas espécies, apresenta-se como um líquido amarelo pálido que é usado como aditivo alimentar. Está incluído na classe dos agentes anti-inflamatórios e antipiréticos (National Center for Biotechnology Information., 2005a).

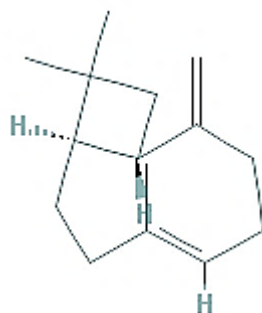


Figura 31 - Estrutura química do composto β -cariofileno (Fonte: National Center for Biotechnology Information., 2005a).

De modo a beneficiar das propriedades do *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e da *Mentha pulegium* nas formulações cosméticas desenvolvidas foi feita uma hidrodestilação das plantas, obtendo-se o óleo essencial, o qual foi incorporado em cada uma das formulações. O rendimento médio de extração dos óleos essenciais foi de 0,65% (v/m) para o *Mentha pulegium* e de 0,9% (v/m) para o *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*.

4.3 Análise ao extrato hidroalcoólico de própolis

O própolis é maioritariamente constituído por resina (flavonóides e ácidos fenólicos), representando cerca de 50% da composição do mesmo. Na sua constituição estão ainda incluídos a cera de abelhas, o pólen, óleos essenciais, aminoácidos, vitaminas, sais minerais e detritos insolúveis em quantidades residuais. Contudo, é de notar que a composição do própolis é variável dependendo das espécies de plantas que se encontram no redor da colmeia, da localização geográfica da mesma e das condições climáticas do local (Falcão *et al.*, 2010). É de notar que os efeitos verificados na saúde humana são independentes da origem geográfica e da composição do própolis utilizado.

Os compostos fenólicos (flavonas/ flavonóis, flavanonas/ dihidroflavonóis e os fenóis totais) são considerados como os principais compostos bioativos do própolis. Deste modo, para avaliar as características do extrato hidroalcoólico do própolis utilizado nas formulações cosméticas foram quantificados os diferentes grupos de compostos fenólicos utilizando os métodos quantitativos que provaram ser mais informativos do que a quantificação dos compostos individualmente (Falcão *et al.*, 2010).

O conteúdo balsâmico, ou seja, o rendimento de extração, e o conteúdo fenólico do extrato de própolis obtido utilizando 70% de etanol/água encontram-se na **Tabela XIV**.

Tabela XIV – Conteúdo balsâmico e fenólico do extrato de própolis.

	Conteúdo fenólico			
	Conteúdo balsâmico (%)	Fenóis totais (%)	Flavonas e flavonóis (%)	Flavanonas e dihidroflavonóis (%)
Média	31,05 ±1,52	1,08±0,20	0,94±0,63	2,40±7,13x10 ⁻⁴

O conteúdo balsâmico do própolis é uma característica importante do mesmo, uma vez que uma elevada percentagem de conteúdo balsâmico indica que o própolis apresenta uma baixa concentração de ceras e de matéria insolúvel em etanol, e consequentemente contém uma elevada percentagem de compostos bioativos. A determinação do conteúdo balsâmico deve ser determinada utilizando própolis extraído com etanol a 70% (Falcão, 2013).

Foi proposto por Popovaa *et al.*, (2007) diversos valores mínimos de modo a avaliar a qualidade do própolis do tipo *poplar*, tendo como base amostras da Europa do Norte e Central: 45% de conteúdo balsâmico, 21% para os fenóis totais, 4% para o valor total de flavonas e flavonóis assim como 4% para o total de flavanonas e dihidroflavonóis. Falcão *et al.*, (2013) analisaram diversas amostras de própolis recolhido em seis regiões diferentes em Portugal, tendo identificado a existência de dois tipos de própolis. O própolis *poplar* mais comum em regiões temperadas (norte, costa central e Açores),

revelou um elevado conteúdo em compostos fenólicos e uma elevada bioatividade (própolis tipo 1). O segundo (própolis do tipo 2) apresenta uma cor verde escura, é menos rico em compostos fenólicos e conseqüentemente menos bioativo sendo encontrado no centro interior, sul e na Madeira (**Tabela XV**).

Tabela XV - Proposta para estandardização do própolis Português.

	Própolis tipo 1^a	Própolis tipo 2^a	Europa do Norte e Central^b
Conteúdo balsâmico (%)	Mínimo 65	Mínimo 45	45
Fenóis totais (%)	Mínimo 18	Mínimo 6	21
Flavonas/Flavonóis (%)	Mínimo 3	Mínimo 2	4
Flavanonas/Dihidroflavonois (%)	Mínimo 5	Mínimo 3	4

a - Falcão *et al.*, (2013); b - Popovaa *et al.*, (2007)

Considerando que o própolis utilizado para obter o extrato hidroalcoólico de própolis é proveniente do Norte de Portugal, Trás-os-Montes, de acordo com os critérios propostos por Falcão *et al.*, (2013) o conteúdo fenólico e o conteúdo balsâmico do mesmo, deve ser comparado com o do própolis do tipo 1. O conteúdo fenólico e o conteúdo balsâmico obtidos na análise do extrato de própolis foram inferiores ao proposto tanto por Falcão *et al.*, (2013) como por Popovaa *et al.*, (2007). Esta diferença pode dever-se tanto à degradação dos compostos fenólicos presentes no extrato hidroalcoólico com o tempo (Falcão *et al.*, 2013) e conseqüentemente uma menor percentagem obtida ao quantificar os mesmos, como ao local de local de recolha do mesmo, uma vez que a biodiversidade do local no qual o apiário se localiza altera a qualidade química do própolis.

4.4 Análise da estabilidade da emulsão 1

A influência da utilização de produtos apícolas na estabilidade de formulações cosméticas foi avaliada utilizando dois méis diferentes (o mel OD, procedente de Odemira – São Martinho Amoreiras e o mel MAC, recolhido em Macedo de Cavaleiros – Podence) e o extrato hidroalcoólico de própolis.

Seguidamente são apresentados os resultados obtidos para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 1 como emulsão base e adicionando posteriormente óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e os dois produtos apícolas testados.

4.4.1 Emulsão 1 contendo óleo de essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*

Na **Tabela XVI** encontram-se representados os valores do pH das formulações cosméticas no dia em que foram elaboradas e quatro dias depois. Apresentam-se ainda os valores obtidos para a densidade relativa, bem como os resultados dos testes de luz e de vibração.

Tabela XVI - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 1, com incorporação de óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e produtos apícolas.

	pH t=0 dias	pH t= 4 dias	Densidade relativa t=0 dias	Testes de luz	Teste de vibração
FC1	4,1	4,1	0,61	Cor: beje; Aroma: <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	Sem alterações
FC2	4,1	4,1	0,60	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC3	4,1	4,1	0,54	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC4	4,1	3,6	0,62	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC5	4,1	3,6	0,52	Cor: M; Aroma: N	Sem alterações
FC6	4,1	3,6	0,60	Cor: M; Aroma: M	Sem alterações

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado

Como se pode observar na **Tabela XVI**, a formulação controlo (**FC1**) apresentou um valor de pH igual a 4,1. Durante muito tempo pensou-se que os produtos cosméticos deveriam ter um pH próximo de 5,5, que era considerado como o valor do pH da pele humana. No entanto, estudos recentes têm vindo a demonstrar que o pH da pele pode apresentar valores compreendidos entre 4,0 e 5,96, dependendo de diversos fatores, como por exemplo a localização (Leonardi *et al.*, 2002; Paye *et al.*, 2009). De facto, para formulações cosméticas para o antienvhecimento, nas quais se incorporam ácidos polihidroxiados, é sugerido que a formulação deverá ter um valor de pH que pode chegar até 3,5 (Green & SABherwal, 2014). Verificou-se ainda que a incorporação de produtos apícolas (**FC2-6**) não alterou o valor do pH das formulações cosméticas. Deste modo, tendo em consideração o valor do pH, podemos considerar que as várias formulações cosméticas preparadas são adequadas para uso tópico.

Contudo, após quatro dias, as emulsões nas quais foi incorporado o mel MAC na concentração 1:20 (v/m) e 1:50 (v/m) e a emulsão com o extrato hidroalcoólico de própolis (**FC4**, **FC5** e **FC6** respetivamente) apresentaram um pH mais baixo, ao contrário do verificado para as restantes emulsões, nas quais o pH se manteve constante. Uma possível explicação para esta alteração poderia ser uma contaminação microbiana das amostras em causa, o que provoca o aumento da acidez das mesmas. No entanto, considerando que a atividade da água (um dos fatores que regula o crescimento microbiano) do mel e do extrato de própolis é inferior a 0,95, fator de referência a partir do qual é possível ocorrer o crescimento de microrganismos (Chirife *et al.*, 2006; Machado *et al.*, 2016; U.S. Food and Drug Administration, 2015), esta explicação é pouco provável. Considerando que foi utilizada uma fita medidora de pH, é possível que tenha ocorrido um erro experimental ao determinar o pH através da comparação das cores.

Adicionalmente, foi medida a densidade relativa de cada emulsão, tendo-se obtido valores bastante próximos, tal como se pode observar na **Tabela XVI**, pelo que se pode concluir que a densidade relativa, ou seja, a relação entre a densidade absoluta das

emulsões e a densidade da água, não é significativamente modificada pela incorporação dos produtos apícolas e óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* nas formulações cosméticas.

Um dos parâmetros a avaliar num teste de estabilidade é o comportamento do cosmético e da embalagem em relação ao transporte. Este parâmetro, no caso de ser utilizado um transporte terrestre, pode ser avaliado através da realização de um teste de vibração. Todas as amostras foram submetidas ao referido teste, não tendo sido verificadas quaisquer alterações (**Tabela XVI**), o que pode indicar a estabilidade das emulsões relativamente a este parâmetro, pelo que se pode concluir que as emulsões podem ser transportadas por transporte terrestre sem ocorrer alterações nas mesmas.

Além dos testes de vibração foram ainda efetuados testes de luz, que têm como objetivo analisar a ocorrência de alterações em formulações cuja embalagem pode permitir a passagem de luz e a ocorrência de possíveis alterações na formulação ou entre a embalagem e o cosmético. A luz utilizada neste teste deve simular a intensidade à qual o cosmético irá provavelmente ser posteriormente exposto (Marx, 2004). Neste teste, submeteram-se as formulações cosméticas durante 15 dias à radiação emitida por uma lâmpada *daylight*. As alterações foram avaliadas através da comparação da cor e do aroma das diversas formulações cosméticas com as apresentadas pela formulação de referência **FC1**.

Entre as amostras analisadas, aquelas que apresentaram alterações foram as amostras **FC5** e a **FC6**, com 1:50 (v/m) de amostra do mel OD e com 5% (m/v) de extrato hidroalcoólico de própolis respetivamente. Na amostra **FC5** ocorreu alteração na cor da amostra enquanto na amostra **FC6** ocorreram alterações na cor e no aroma da mesma quando comparadas com a amostra **FC1** quando sujeita às mesmas condições. Contudo, é de realçar que a amostra **FC6** apresentava alterações na cor e no aroma quando comparada com a amostra **FC1**, antes da realização do teste, devido à adição do extrato hidroalcoólico, o que é expectável uma vez que este apresenta um aroma forte e

uma cor amarela característica. É de notar que a alteração ocorrida na emulsão **FC5** não foi observada na emulsão **FC4**, pelo que possivelmente esta está relacionada com a concentração de mel MAC utilizado.

É sabido que a viscosidade é um dos fatores que podem influenciar a estabilidade das emulsões. O movimento Browniano, ou seja, o movimento aleatório de partículas como consequência dos choques com as moléculas pertencentes ao meio, pode destruir a estrutura em rede que estabiliza a emulsão alterando a viscosidade da mesma (Franc, 1985). Assim, para além do pH e da densidade, foi ainda medida a viscosidade de cada emulsão a 25°C, tendo-se obtido o gráfico apresentado na **Figura 32**.

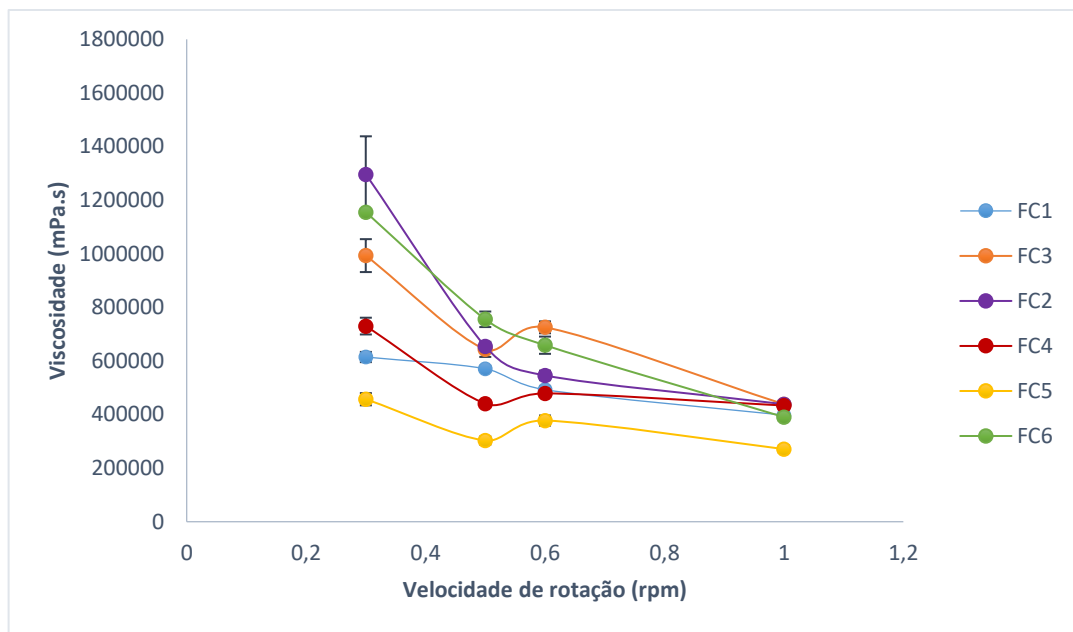


Figura 32 - Dependência da viscosidade com a velocidade de rotação do *spindle* para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 1 como base.

Pela análise da **Figura 32**, podemos verificar que a viscosidade das formulações ensaiadas é variável, dependendo da velocidade de rotação do *spindle*, e que diminui à medida que a velocidade de rotação aumenta. Este tipo de comportamento é frequentemente observado em formulações cosméticas (Abd *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2007). Para além disso, verifica-se que os valores de viscosidade são diferentes para as

curvas de carga e descarga, traduzindo um comportamento que é dependente do tempo. Este é o comportamento característico de fluídos não-Newtonianos tixotrópicos (Knowlton, 2000) sendo também frequentemente observado em diversas formulações cosméticas, incluindo emulsões (Manço *et al.*, 2015). Este tipo de comportamento é bastante valorizado em formulações cosméticas uma vez que facilita a aplicação e espalhamento do produto (Gaspar & Maia Campos, 2003). Deste modo, é possível obter uma formulação cosmética com uma viscosidade elevada, mas que, ao ser aplicada pressão, como acontece ao apertarmos a sua embalagem, diminui a viscosidade e o produto flui com maior facilidade.

Foi ainda possível observar que, de uma forma geral, para a velocidade de rotação do *spindle* mais elevada (1,0 rpm), os valores de viscosidade das várias formulações ensaiadas foram semelhantes. No entanto, este comportamento modifica-se à medida que a viscosidade é medida utilizando menores velocidades de rotação do *spindle*. De facto, para a menor velocidade de rotação do *spindle* (0,3 rpm), verifica-se a existência de dois grupos de emulsões: um grupo constituído pela emulsão controlo (**FC1**) e pelas emulsões onde se incorporou o mel OD (**FC4** e **FC5**), que apresentam uma menor viscosidade, e outro grupo formado pelas emulsões onde se incorporou o mel MAC (**FC2** e **FC3**) e pela emulsão com extrato de própolis (**FC6**), que se caracterizam por uma maior viscosidade. Estes resultados sugerem que, para a menor velocidade de rotação do *spindle*, a incorporação do mel OD não influencia a viscosidade da formulação controlo, enquanto que a incorporação do mel MAC e do extrato de própolis provocam um aumento no valor da mesma. A maior viscosidade das formulações onde se incorporou o mel MAC e o extrato de própolis poderão estar relacionadas com a elevada viscosidade do mel MAC em relação ao mel OD e também à incorporação de material sólido, como é o caso do extrato de própolis, na formulação controlo.

Para além dos testes já mencionados, as formulações cosméticas foram submetidas durante 15 dias a condições extremas de temperatura e humidade: 40°C e 75% de humidade relativa (H.R.). Foram comparados o aroma, a cor das formulações, assim

como a ocorrência ou não de separação de fases e de liquidificação entre as formulações **FC2-FC6** e a formulação base **FC1**. Os resultados obtidos encontram-se apresentados na **Tabela XVII**.

Tabela XVII – Resultados do teste a 40°C e 75% de H.R. das amostras possuindo como base a emulsão 1 e óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*.

	Cor	Aroma	Separação de fases	Liquidificação
FC1	Amarelo	<i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	+	-
FC2	N	N	+	-
FC3	N	N	+	-
FC4	N	N	+	-
FC5	N	N	+	-
FC6	M	M	+	-

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado; + = Ocorrência; - = Não ocorreu

Através da análise da **Tabela XVII**, pode-se concluir que apenas a formulação **FC6** (com óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e extrato hidroalcoólico de própolis) quando comparada com a formulação **FC1** nas mesmas condições, apresentava alterações a nível da cor, apresentando uma cor mais escura, e do aroma, o qual era o característico do extrato de própolis. No entanto, é de sublinhar que a formulação apresentava já estas características quando comparada com a formulação **FC1** antes de ambas terem sido submetidas a este teste.

Em todas as amostras verificou-se a ocorrência de separação de fases, o que se deve possivelmente à diferença na densidade das duas fases sob a influência da gravidade (Smaoui *et al.*, 2013). Apesar de não se ter verificado liquefação das amostras, a ocorrência de separação de fases indica que as formulações não são estáveis, no entanto, esta instabilidade não está relacionada com a utilização de produtos apícolas, uma vez que este fenómeno ocorreu também na emulsão **FC1**, na qual não foi utilizado qualquer produto apícola. Considerando que a formulação 1 foi adaptada da literatura, seria expectável que esta fosse estável, o que, contudo, não se verificou. Uma possível explicação para a instabilidade das emulsões preparadas poderá ser a velocidade de

preparação com que as duas fases da emulsão foram misturadas, uma vez que este é um fator que influencia algumas características importantes das mesmas, nomeadamente as propriedades reológicas (viscosidade) e o tamanho das partículas, as quais estão diretamente relacionadas com a estabilidade das emulsões (Bernatoniene *et al.*, 2010). Estes resultados sugerem que, durante a preparação artesanal de formulações cosméticas, a etapa de mistura das duas fases que compõem a emulsão base poderá influenciar negativamente a estabilidade das formulações cosméticas, dada a dificuldade de manter uma velocidade de mistura que origine uma viscosidade ótima, assim como de obter partículas que apresentem um tamanho uniforme.

Para além do óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis* foi também utilizado o óleo essencial de *Mentha pulegium* usando como formulação base a emulsão 1.

4.4.2 Emulsão 1 contendo óleo essencial de *Mentha pulegium*

Na **Tabela XVIII** apresentam-se os resultados obtidos para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 1 como emulsão base e adicionando posteriormente óleo essencial de *Mentha pulegium* e os dois produtos apícolas testados.

Tabela XVIII - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 1, com incorporação de óleo essencial de *Mentha pulegium* e produtos apícolas.

	pH t=0 dias	pH t=4 dias	Densidade relativa t=0 dias	Teste de luz	Teste de vibração
FC7	4,1	3,6	0,70	Cor: beje; Aroma: <i>Mentha pulegium</i>	Sem alterações
FC8	4,1	4,1	0,60	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC9	4,1	3,6	0,60	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC10	4,1	3,6	0,50	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC11	4,1	4,1	0,60	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
FC12	4,1	3,6	0,48	Cor: M; Aroma: M	Sem alterações

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado

Como se pode observar na **Tabela XVIII**, a formulação cosmética **FC7** que apenas contém o óleo essencial de *Mentha pulegium*, e que serve de controlo, apresentava um pH de 4,1. A introdução de produtos apícolas na formulação base 1 (**FC8-FC12**) não alterou o pH inicial das formulações, apresentando todas estas um pH que é indicado para emulsões tópicas. No entanto, após quatro dias, verificou-se uma diminuição do pH em todas as emulsões exceto nas formulações **FC8** e **FC11**, as quais continham mel MAC na concentração 1:20 (v/m) e mel OD na concentração 1:50 (v/m), respetivamente. Este comportamento já tinha sido identificado quando se incorporou o óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* na formulação base 1 e poderá estar relacionado com o método utilizado para a determinação do pH.

Adicionalmente foi medida a densidade relativa de cada formulação, tendo-se verificado que o valor obtido para a formulação **FC12**, a qual apresenta extrato hidroalcoólico de própolis, é inferior à obtida para a emulsão base, **FC7**. Relativamente às restantes formulações as densidades relativas também foram relativamente próximas quando comparadas com a emulsão base.

Todas as amostras foram submetidas ao teste de vibração, não tendo sido verificadas quaisquer alterações, o que pode indicar a estabilidade das emulsões relativamente a este parâmetro. Quando submetidas ao teste de luz, das cinco emulsões comparadas, apenas foram verificadas alterações na emulsão **FC12**, onde se incorporou o extrato hidroalcoólico de própolis, para além do óleo essencial de *Mentha pulegium*. A alteração verificada está possivelmente relacionada com a característica do extrato utilizado, uma vez que esta alteração já tinha sido verificada nos resultados dos testes efetuados com a formulação **F6**.

As várias formulações cosméticas foram colocadas numa estufa a 40 °C e com uma H.R. de 75%, obtendo-se os resultados apresentados na **Tabela XIX**. Através da análise da **Tabela XIX**, pode-se concluir que apenas a emulsão **FC12**, a qual possuía óleo essencial de *Mentha pulegium* e extrato hidroalcoólico de própolis, apresentava

alterações a nível da cor e do aroma quando comparada, nas mesmas condições, com a emulsão de controlo **FC7**. É de realçar, no entanto que a diferença na cor e no aroma das duas preparações já tinha sido verificado antes de se ter procedido à realização deste teste.

Tabela XIX - Resultados dos testes utilizando 40°C e 75% de H.R. das amostras possuindo como base a emulsão 1 e óleo essencial de *Mentha pulegium*.

	Cor	Aroma	Separação de fases	Liquefação
FC7	Beje	<i>Mentha pulegium</i>	+	-
FC8	N	N	+	-
FC9	N	N	+	-
FC10	N	N	+	-
FC11	N	N	+	-
FC12	M	M	+	-

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado; + = Ocorrência; - = Não ocorreu

A modificação na cor e aroma na preparação deve-se à incorporação na mesma de extrato hidroalcoólico de própolis, o qual apresenta uma cor amarelo-torrado e um aroma que lhe é característico. Como tal as alterações ocorridas já eram expectáveis. Esta hipótese é reforçada pelas alterações verificadas antes e depois de se proceder ao mesmo teste, na amostra **FC6**, a qual possuía na formulação extrato hidroalcoólico de própolis.

Em todas as amostras **FC7-FC12** verificou-se a ocorrência de separação de fases, o que não era expectável de ocorrer uma vez que a composição da formulação base foi consultada num prontuário farmacêutico, e consequentemente validada. Uma possível explicação para a falta da estabilidade é a velocidade de agitação durante o processo de preparação do cosmético, a qual é um fator que afeta a viscosidade e o tamanho das partículas, as quais estão diretamente relacionadas com a estabilidade das preparações. (Bernatoniene *et al.*, 2010).

Adicionalmente mediu-se a viscosidade de cada emulsão a 25°C utilizando diferentes velocidades de rotação do *spindle*, tendo-se obtido o gráfico apresentado na **Figura 33**.

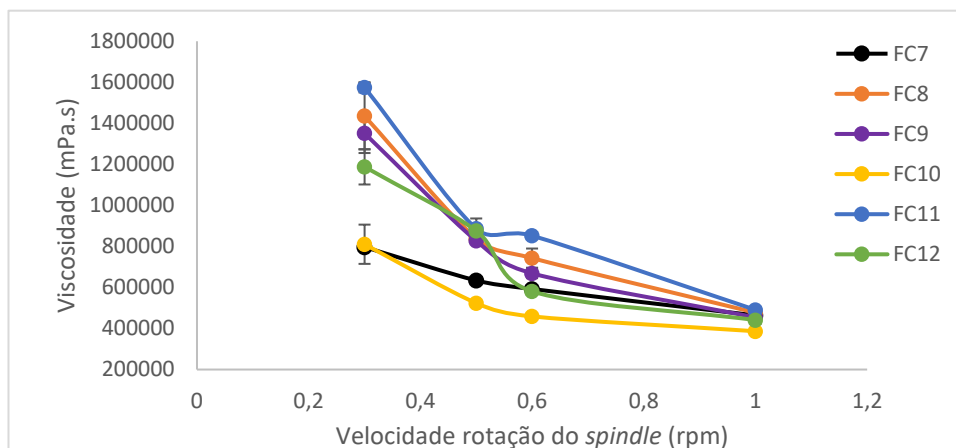


Figura 33 - Dependência da viscosidade com a velocidade de rotação do spindle para as formulações cosméticas preparadas utilizando a emulsão 2 como base.

Pela análise da **Figura 33** podemos verificar que, tal como foi verificado para as formulações cosméticas que tinham por base a emulsão 1 (**FC1-FC7**), a viscosidade das formulações ensaiadas é variável, dependendo da velocidade de rotação do *spindle*, e diminui à medida que a velocidade de rotação aumenta. Para além disso, verifica-se que os valores de viscosidade são diferentes para as curvas de carga e descarga, traduzindo um comportamento que é dependente do tempo. Este comportamento é característico de fluídos não-Newtonianos tixotrópicos (Knowlton, 2000).

A maior viscosidade das formulações nas quais se incorporou o mel MAC e o extrato hidroalcoólico de própolis poderão estar relacionadas com a elevada viscosidade do mel MAC em relação ao mel OD e também à incorporação de material sólido, como é o caso do extrato de própolis, na formulação controlo.

Comparando a **Figura 33** com a **Figura 32**, pode-se observar que o comportamento de todas emulsões é similar, verificando-se que para maiores valores de velocidade de

rotação do *spindle* os valores de viscosidade obtidos diminuem. Verificou-se também a existência de dois grupos distintos, quando utilizada a velocidade de rotação de 0,3 rpm, independentemente do tipo de óleo essencial testado.

Adicionalmente verificou-se que tanto o extrato hidroalcoólico de própolis como o mel MAC afetam a viscosidade das emulsões aumentando-a ao contrário do mel OD, com o qual não se verifica qualquer alteração na viscosidade em relação ao controlo. As alterações verificadas possivelmente devem-se à viscosidade do mel MAC ser superior à do mel OD e à existência de partículas em suspensão no extrato hidroalcoólico de própolis, o que condiciona a viscosidade medida (Barthelmes *et al.*, 2003).

4.5 Análise da estabilidade da emulsão 2

Durante este estudo foram também avaliadas as características de formulações cosméticas preparadas tendo por base a emulsão 2, que consistia num creme para feridas, tendo-se posteriormente incorporado óleos essenciais de *Thymus zygis L. subsp. zygis* ou de *Mentha pulegium* e produtos apícolas.

4.5.1 Emulsão 2 contendo óleo de essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis*

Na **Tabela XX** encontram-se representados os valores do pH das formulações cosméticas no dia em que foram elaboradas e quatro dias depois. Apresentam-se ainda os valores obtidos para a densidade relativa, bem como os resultados dos testes da luz e de vibração.

Como se pode observar na **Tabela XX**, a formulação cosmética **F1**, tendo por base a emulsão 2 e incorporando apenas o óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis*

apresentava um pH de 4,7. A introdução de produtos apícolas na formulação 2 (F2-F6) não alterou o pH inicial das formulações. Deste modo, tendo em consideração o valor do pH, podemos considerar que as várias formulações cosméticas preparadas são adequadas para uso tópico.

Tabela XX – Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 2, com incorporação de óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e produtos apícolas.

	pH t=0 dias	pH t= 4 dias	Densidade relativa t=0 dias	Teste de luz	Teste de vibração
F1	4,7	3,6	0,55	Cor: beje; Aroma: <i>Thymus zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>	Sem alterações
F2	4,7	3,6	0,56	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
F3	4,7	4,4	0,48	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
F4	4,7	3,6	0,60	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
F5	4,7	3,6	0,52	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
F6	4,7	3,6	0,59	Cor: M; Aroma: M	Sem alterações

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado

Foi feita a medição do pH dos dois méis assim como do extrato hidroalcoólico de própolis tendo-se obtido o valor de 4,4 e de 5 respetivamente. Uma vez que estes dois valores são muito próximos do pH da formulação de referência (F1), 4,7, era expectável que não ocorresse uma variação significativa no pH das emulsões aquando da incorporação dos produtos apícolas nas mesmas.

Contudo, após quatro dias todas a formulações apresentaram uma tendência para baixar o pH, demonstrando que este é instável. Esta alteração pode dever-se ao processo de degradação dos compostos presentes no óleo de amêndoas doces frequentemente designado por lipólise e que resulta num aumento da proporção de ácidos gordos livres, provocando assim um aumento na acidez do óleo e consequentemente da emulsão (Savian *et al.*, 2011). De modo a evitar a ocorrência deste fenómeno poderiam ser

utilizados ácido ascórbico (vitamina C) e tocoferol (vitamina E), os quais são agentes antioxidantes com efeito sinérgico (Burgess, 2005) evitando deste modo a oxidação dos lípidos presentes no óleo e conseqüentemente aumentando a estabilidade da formulação.

Adicionalmente foi medida a densidade relativa de cada formulação, tendo-se obtidos valores bastante próximos, pelo que se pode concluir que, tal como ocorre com o pH, a densidade relativa não é alterada pela utilização dos produtos apícolas testados.

Todas as amostras foram submetidas ao teste de vibração, não tendo sido verificadas quaisquer alterações, o que pode indicar a estabilidade das emulsões relativamente a este parâmetro. Como tal, pode-se concluir que é possível fazer o transporte terrestre de todas as emulsões (**F1-F6**).

Quando submetidas ao teste de luz, apenas a formulação **F6** apresentou alterações relativamente à formulação **F1**, que serve de controlo. As alterações na cor e no aroma já tinham ocorrido antes de se proceder ao teste de luz, sendo devidas à utilização do extrato hidroalcoólico de própolis. Estas alterações tinham sido identificadas anteriormente nas emulsões **FC6** e **FC12**, as quais apresentavam na composição o mesmo extrato.

Para além do pH e da densidade foi ainda avaliada a viscosidade de cada formulação cosmética. Através de uma simples análise visual foi evidente a maior viscosidade das formulações **F1-F7**, relativamente às formulações preparadas anteriormente **FC1-FC12**. Como tal, e como o equipamento utilizado apenas permite obter leituras de viscosidade até 2×10^6 mPa.s, não foi possível determinar o comportamento das diferentes formulações. Deste modo, não foi possível determinar se a incorporação dos produtos apícolas testados alteraria ou não a viscosidade da emulsão de referência. A elevada viscosidade apresentada por estas formulações cosméticas pode dever-se à presença da manteiga de karité, que se encontra no estado semissólido à temperatura utilizada para a preparação das formulações.

Para além dos testes já mencionados as formulações foram submetidas durante 15 dias a condições extremas de temperatura e humidade, 40°C e 75% de humidade relativa (H.R.). Foram comparados o aroma e a cor das formulações com produtos apícolas na composição (**F2-F6**) com a formulação de controlo **F1**, a qual possuía apenas óleo essencial, tendo-se obtido os resultados apresentados na **Tabela XXI**.

Tabela XXI – Resultados obtidos quando submetidas as amostras, com óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis* e utilizando como base a emulsão 2, a 40°C e 75% de H.R..

	Cor	Aroma	Separação de fases	Liquefação
F1	Amarela	Tomilho	+	+
F2	N	N	+	+
F3	N	N	+	+
F4	N	N	+	+
F5	N	N	+	+
F6	M	N	+	+

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado; + = Ocorrência; - = Não ocorreu

Através da análise da **Tabela XXI**, pode-se concluir que apenas a emulsão **F6**, a qual possuía óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis* e extrato hidroalcoólico de própolis, apresentou alterações a nível da cor para um amarelo mais escuro quando comparada, nas mesmas condições, com a emulsão de controlo (**F1**). É de realçar, no entanto, que a diferença na cor e no aroma das duas preparações já tinha sido verificada antes de se ter procedido à realização deste teste, pelo que se pode concluir que a alteração verificada ocorreu devido à presença do extrato hidroalcoólico de própolis, o qual apresenta uma cor característica.

Todas as amostras apresentaram separação de fases, o que se deve possivelmente à diferença de densidade das duas fases sob a influência da gravidade (Smaoui *et al.*, 2013). Verificou-se ainda a ocorrência de liquefação de todas as amostras, o que pode estar relacionado com a passagem de água da fase interna para a fase externa. De acordo com Smaoui *et al.*, (2013), uma outra possível razão para a ocorrência de liquefação está relacionada com a diminuição da viscosidade. É de realçar que apesar de poder ter

ocorrido uma aparente diminuição na viscosidade, os valores da mesma continuam a ser superiores aos quais o viscosímetro rotativo utilizado permite registar.

A ocorrência da liquefação e da separação de fases em todas as amostras, incluindo a emulsão base, indica que as emulsões preparadas são instáveis, apesar de a formulação da emulsão 2 ter sido adaptada da literatura. Tal como se verificou com a formulação 1, a instabilidade das formulações cosméticas preparadas poderá estar relacionada com a velocidade com que as duas fases da emulsão são misturadas (Bernatoniene *et al.*, 2010).

Foram ainda preparadas formulações cosméticas tendo por base a emulsão 2, com incorporação de óleo essencial de *Mentha pulegium* e de produtos apícolas (**F7-F12**).

4.5.2 Emulsão 2 contendo óleo de essencial de *Mentha pulegium*

Na **Tabela XXII** apresentam-se os valores do pH das formulações cosméticas no dia em que foram elaboradas e quatro dias depois. Apresentam-se ainda os valores obtidos para a densidade relativa, bem como os resultados dos testes da luz e de vibração.

Tabela XXII - Testes de estabilidade das formulações cosméticas preparadas com base na emulsão 2, com incorporação de óleo essencial de *Mentha pulegium* e produtos apícolas.

	pH t=0 dias	pH t=4 dias	Densidade relativa t=0 dias	Teste da luz	Teste de vibração
F7	4,7	4,7	0,50	Cor: amarela; Aroma: <i>Mentha pulegium</i>	Sem alterações
F8	4,7	4,4	0,58	Cor: N; Aroma: N	Sem alterações
F9	4,7	4,1	0,50	Cor: M; Aroma: N	Sem alterações
F10	4,7	4,1	0,60	Cor: M; Aroma: N	Sem alterações
F11	4,7	4,1	0,56	Cor: M; Aroma: N	Sem alterações
F12	4,7	4,1	0,47	Cor: M; Aroma: M	Sem alterações

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado.

Como se pode observar na **Tabela XXII**, a formulação cosmética **F7**, que foi preparada tendo por base a emulsão 2 com a incorporação de óleo essencial de *Mentha pulegium* apresentou um pH de 4,7. A introdução de produtos apícolas nas formulações cosméticas (**F8-F12**) não alterou o pH inicial das formulações, pelo que se pode concluir, considerando apenas este parâmetro que as emulsões podem ser aplicadas topicamente.

Através da comparação dos valores do pH das formulações, tendo como base a emulsão 2, no tempo 0 com óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis* (**Tabela XX**) e com óleo essencial de *Mentha pulegium* (**Tabela XXII**) verifica-se que todas as formulações possuem o pH de 4,7, pelo que se pode concluir que a utilização destes dois óleos essenciais assim como dos produtos apícolas não altera o pH inicial da emulsão 2.

Após 4 dias verificou-se uma diminuição do pH das emulsões, tal como tinha sido verificado nas emulsões **F1-F6**, possivelmente devido ao aumento da proporção de ácidos gordos livres resultante da lipólise dos compostos presentes no óleo de amêndoas doces. É de notar que a variação do pH após quatro dias das emulsões com óleo essencial de *Mentha pulegium* foi menos elevada quando comparada com a das emulsões com óleo essencial de *Thymus zygis L. subsp. zygis*, possivelmente devido ao poder antioxidante do *Mentha pulegium* ($2,94 \pm 0,05$ mmol Fe/100 g de peso fresco) ser superior ao poder antioxidante do *Thymus vulgaris* ($3,47 \pm 0,38$ mmol Fe/100 g de peso fresco) (Derakhshani *et al.*, 2012)

Mediu-se a densidade relativa de cada formulação, tendo-se obtido valores localizados no intervalo 0,47-0,6, pelo que se pode concluir que, tal como ocorre com o pH, a densidade relativa não é alterada pela utilização dos produtos apícolas testados.

Tal como ocorreu com as emulsões **F1-F6**, quando submetidas ao teste de vibração as amostras com óleo essencial de *Mentha pulegium* (**F7-F12**) não sofreram quaisquer alterações, o que pode indicar a estabilidade das mesmas. Verificou-se ainda que como

tinha sido observado nas formulações nas quais era utilizada a emulsão 2 com óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*, a viscosidade de cada emulsão, a 25°C, era superior a 2x10⁶ mPa.s, o que reforça a ideia de que a diferença de viscosidades entre a emulsão 1 e a 2 se deve à formulação das mesmas e não aos óleos essenciais ou aos produtos apícolas utilizados.

Após submetidas as amostras a 40°C e com uma humidade relativa de 75%, a cor e o aroma das amostras foram comparados com a amostra de referência sem qualquer produto apícola (**F7**), tendo-se obtido os resultados apresentados na **Tabela XXIII**.

Tabela XXIII - Resultados obtidos quando submetidas as amostras com óleo essencial de *Mentha pulegium* a 40 °C e 75% de H.R..

	Cor	Aroma	Separação de fases	Liquefação
F7	Amarelo claro	<i>Mentha pulegium</i>	+	+
F8	N	N	+	+
F9	N	N	+	+
F10	N	N	+	+
F11	N	N	+	+
F12	N	M	+	+

Cor e aroma: N - Normal; M – Modificado; + = Ocorrência; - = Não ocorreu

Através da análise dos resultados apresentados na **Tabela XXIII**, conclui-se que a amostra com extrato hidroalcoólico de própolis foi a única que apresentou alterações nomeadamente no aroma, apresentando o mesmo aroma que o extrato de própolis. No entanto, esta alteração não está relacionada com as condições utilizadas, mas com o produto apícola, uma vez que já tinha sido anteriormente verificada.

Tal como ocorreu com as amostras **F1-F6**, nas amostras nas quais foi utilizada a emulsão 2 como a formulação base, observou-se a ocorrência de separação de fases e de liquefação, o que apoia a conclusão anterior, de que a emulsão 2 é instável, possivelmente devido à velocidade de agitação utilizada, a qual influencia a viscosidade das emulsões e consequentemente a estabilidade das mesmas (Bernatoniene *et al.*, 2010).

É de realçar que os dois produtos apícolas testados não apresentam a capacidade de atuar a nível da estabilidade das duas emulsões base testadas. No entanto, o óleo essencial de *Mentha pulegium* pareceu modificar de forma positiva a estabilidade das formulações obtidas utilizando como base a emulsão 2.

4.6 Testes espectrofotométricos

No dia seguinte à elaboração das formulações cosméticas, procedeu-se ao registo dos respetivos espectros UV-Visível com o objetivo de determinar se alguma das formulações apresentava capacidade de bloquear os raios UV solares, encontrando-se os resultados nas Figuras 34 e 35.

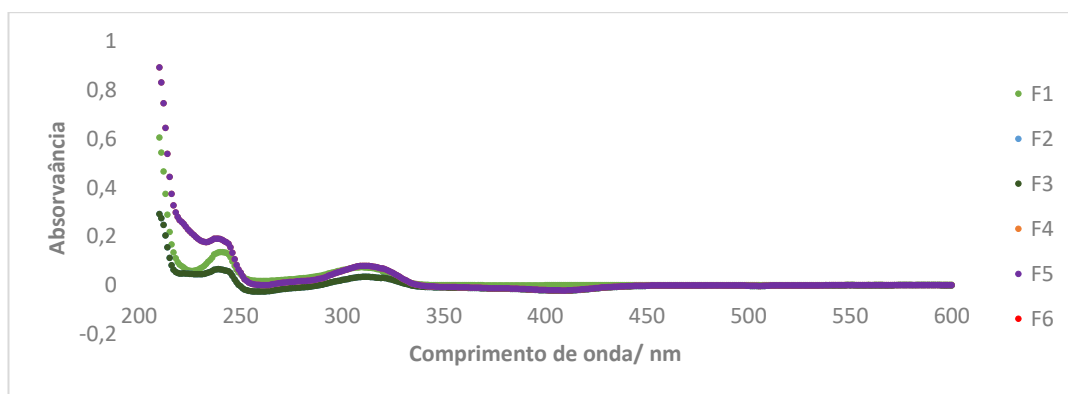


Figura 34 - Espectro UV-Vis das emulsões F1-F6.

Pela análise da **Figura 34**, pode-se observar que nos seis espectros as bandas de absorção encontram-se na mesma posição, verificando-se a existência de dois picos máximos de absorção, a 223 nm e a 311 nm. Estes dois picos devem-se aos compostos existentes na formulação base utilizada, os quais apresentam possivelmente os grupos funcionais dienos e aldeídos/ cetonas, os quais apresentam bandas típicas dos comprimentos de onda mencionados anteriormente.

Contudo, pode-se concluir que a incorporação do mel OD (formulações **F4** e **F5**), independentemente da concentração, nas formulações provoca um efeito hipercrómico em comparação com a formulação **F1**. Esta alteração deve-se possivelmente à alteração na proporção de alguns compostos, o que se traduz numa alteração na intensidade das bandas.

Em relação à utilização do mel MAC (**F2** e **F3**) e do extrato hidroalcoólico de própolis (**F6**) não foram identificadas alterações no espectro UV-Vis quando comparado com o espectro da formulação controlo **F1**.

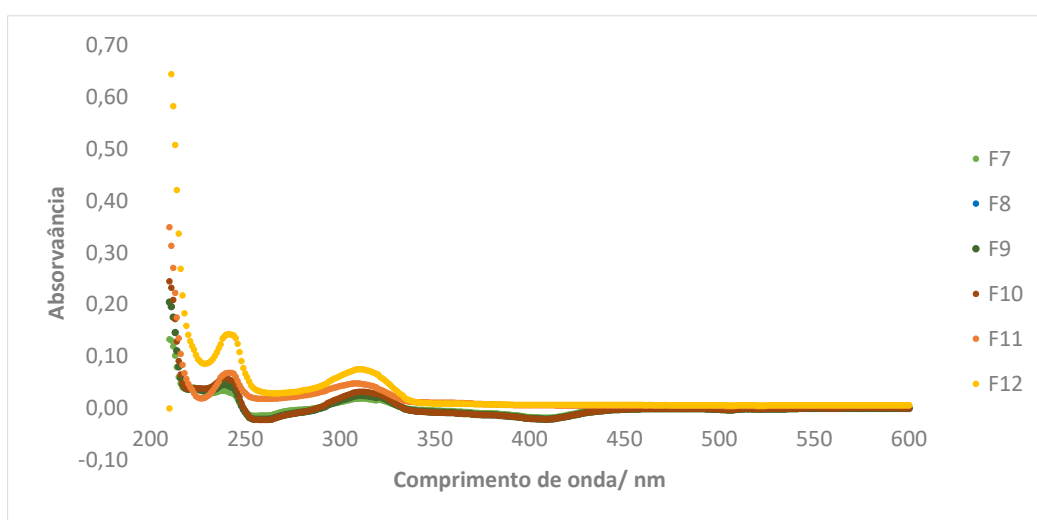


Figura 35 – Espectro UV-Vis das emulsões **F7-F12**.

Na **Figura 35** pode-se observar o espectro UV-Vis das emulsões **F7-F12**. Em todos os espectros das emulsões testadas as bandas de absorção encontram-se na mesma posição que as bandas de absorção das emulsões **F1- F6**, o que reforça a conclusão de que os picos observados se devem à composição da formulação base utilizada e não dos produtos apícolas incorporados.

Verifica-se a existência de um efeito hipercrómico para a amostra **F12** em comparação com a amostra **F7**, o qual está possivelmente relacionado com o aumento

da intensidade de alguns compostos provenientes do extrato hidroalcoólico de própolis (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004).

Em relação às formulações **FC1-FC12**, tal como se pode observar um exemplo na **Figura 36** dos espectros feitos consecutivamente da formulação **FC1**, o espectro UV-Vis não apresenta bandas bem definidas como observado nos espectros das **Figuras 34** e **35**. Uma possível explicação está relacionada com dois dos componentes da emulsão base 2, a ureia, a qual apresenta bandas de absorção a 260 nm e 280 nm, e o ácido salicílico que apresenta uma banda de absorção a 260, ocultarem as bandas de absorção da emulsão.

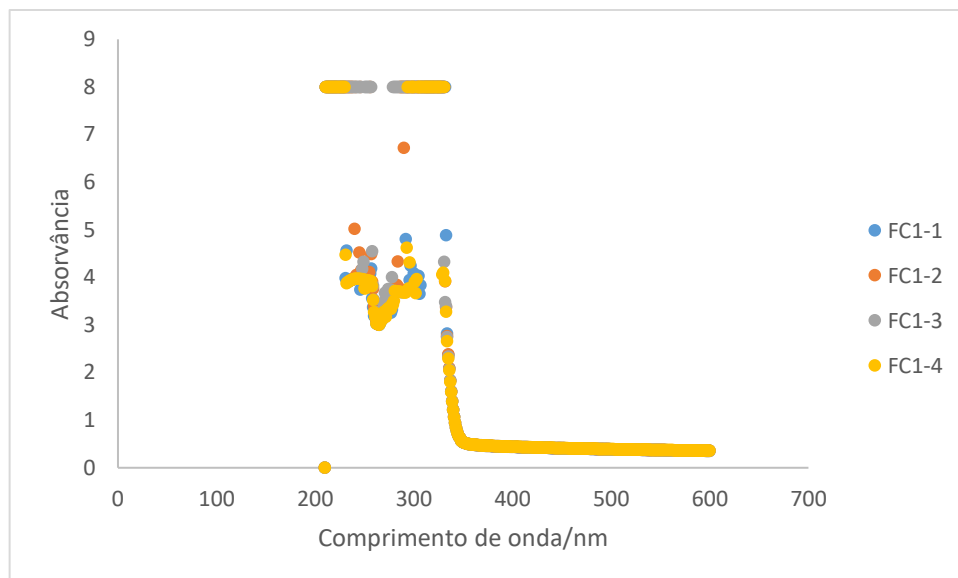


Figura 36 - Espectros UV-Vis da emulsão **FC1**.

4.7 Atividade antimicrobiana das emulsões

A pele e as mucosas têm, entre outras funções, o papel de defesa do organismo de ataques microbianos. Contudo, estas podem ser danificadas aumentando a probabilidade de ocorrer uma infecção microbiana ao ser utilizado um produto cosmético. Deste modo,

é importante avaliar a possível contaminação microbiana das diversas formulações cosméticas preparadas.

A presença de microrganismos no produto cosmético identificados como espécies patogénicas para a pele, como leveduras indesejáveis ou bactérias aeróbias mesófilas pode indicar uma falha no processo de fabrico do mesmo (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2015). De acordo com a ISO 17516:2014 - Cosmetics - Microbiology - Microbiological limits 1 g de formulação não deve conter *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* nem *Candida albicans*.

Neste estudo procedeu-se à análise microbiológica das formulações desenvolvidas, tendo-se testado as mesmas quanto a uma possível contaminação fúngica e/ou bacteriana. Não foi observado qualquer crescimento microbiano em nenhuma das amostras, pelo que se pode assim concluir que as mesmas não se encontravam contaminadas, sendo o uso das mesmas considerado seguro e uma indicação de que o sistema preservantes utilizado com os óleos essenciais foi eficaz. A ausência de contaminação microbiana nas diversas formulações cosméticas preparadas poderá estar relacionada com a atividade antimicrobiana reportada na literatura para alguns dos seus componentes.

Deste modo, procedeu-se à avaliação da atividade antimicrobiana de cada uma das formulações, tendo-se verificado que tanto as formulações **F1-F12**, como as formulações **FC1-FC12**, apresentavam atividade fungistática contra o fungo *Candida albicans* e bacteriostática contra *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e a *Escherichia coli* (gram-negativa), possivelmente devido às características dos óleos essenciais utilizados como preservantes. Sendo, contudo, inferior à atividade observada tanto para o clorofenicol como para o fluconazol.

De acordo com o descrito na literatura tanto o óleo essencial de *Mentha pulegium* como o óleo essencial de *Thymus zygis* L. *subsp. zygis* apresentam atividade antimicrobiana contra a *Candida albicans* (Brahmi *et al.*, 2016; Mahboubi & Haghi,

2008; Nikolić *et al.*, 2014; Pina-Vaz *et al.*, 2004). De acordo com o reportado por Pina-Vaz *et al.*, (2004) o óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* é um forte potencial fungicida contra este fungo devido ao dano provocado na membrana celular. Este autor reportou ainda que os compostos carvacrol, timol e ρ -cimeno, presentes no óleo essencial demonstraram apresentar igualmente atividade fungicida. Em relação ao óleo essencial de *Mentha pulegium* não é conhecido o seu mecanismo de ação.

Apesar de estar referenciado na literatura a atividade antifúngica dos dois produtos apícolas utilizados (Estevinho *et al.*, 2011; Freires *et al.*, 2016; Ota *et al.*, 2001; Tobaldini-Valerio *et al.*, 2016) não se verificou que a utilização dos mesmos afetou os resultados obtidos.

Em relação às bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva), *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e *Escherichia coli* (gram-negativa) verificou-se a existência, para todas as formulações de atividade bacteriostática, a qual se deve possivelmente à utilização dos óleos essenciais. Contudo, é de realção que a actividade observada é inferior à do antibiótico utilizado como referência.

Foi reportado na bibliografia que o óleo essencial de *Mentha pulegium* apresenta atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa* (Jiang *et al.*, 2011; Nikolić *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2012). De acordo com Kaloustian *et al.*, (2008) o óleo essencial de *Thymus zygis*, tanto do quimiotipo timol como do quimiotipo carvacrol, é eficaz contra as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Os estudos mencionados reforçam a conclusão de que o óleo essencial utilizado é possivelmente o responsável pela atividade antibacteriana.

Em relação aos testes microbianos com *Bacillus subtilis*, verificou-se que todas as formulações apresentavam atividade superior à bacteriostática, apresentando-se a zona de inibição do crescimento na **Tabela XXIV**.

Todas as formulações demonstraram apresentar forte atividade bacterioestática contra *Bacillus subtilis*, o que se deve provavelmente aos óleos essenciais utilizados. Na literatura não foi encontrada informação acerca de testes antibacterianos elaborados com o óleo essencial de *Thymus zygis* em *Bacillus subtilis*, contudo sabe-se que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* é bactericida em relação a esta estirpe (Soković *et al.*, 2010).

Tabela XXIV – Actividade antimicrobiana das formulações **F1-F12**, (n=3).

Amostra	Diâmetro (mm) da zona de inibição	Amostra	Diâmetro (mm) da zona de inibição
F1	2	FC1	1
F2	2	FC2	2
F3	2	FC3	2
F4	2	FC4	2
F5	1	FC5	1
F6	1	FC6	1
F7	1	FC7	1
F8	2	FC8	2
F9	1	FC9	2
F10	2	FC10	1
F11	1	FC11	2
F12	2	FC12	2

É de realçar que não se notaram alterações consideráveis quando incorporados os produtos apícolas, pelo que se pode concluir que a sua incorporação, nas concentrações utilizadas, não afeta de forma significativa os resultados microbiológicos obtidos.

4.8 Estudo de toxicidade dos extratos

De acordo com o Regulamento (EC) nº 1223/2009 de 30 de novembro, relativo aos produtos cosméticos, é proibida a comercialização de produtos cosméticos cuja formulação final, ingredientes ou a combinação de ingredientes tenham sido ensaiados em animais.

O princípio dos três R's (a redução, o refinamento e a substituição) encontra-se na base de toda a legislação europeia que regula atualmente os testes em animais. A redução tem como base a aplicação correta do desenho experimental e da análise estatística. O refinamento engloba a otimização das técnicas experimentais, o conhecimento que os efeitos adversos dos protocolos implicam assim como a implementação de medidas que diminuam o desconforto animal. A substituição passa pela utilização de *softwares* e de testes *in vitro* em vez da elaboração de testes nos quais são utilizados animais (Guhad, 2005).

No decorrer deste estudo foram avaliadas duas formulações diferentes, as **emulsões FC e F**, obtidas a partir das formulações base 1 e 2, respetivamente. Nas **Tabelas XXIV e XXV** encontra-se o resumo da avaliação da segurança biológica dos ingredientes, com base em valores obtidos a partir de estudos existentes na literatura, para cada um dos componentes das duas formulações, nomeadamente a dose letal média (LD₅₀) determinada por via oral, por via dérmica e por inalação e os valores de concentração letal média (LC₅₀) determinada em diversos organismos aquáticos.

Na emulsão 1 foram utilizados como ingredientes a vaselina, a lanolina, a ureia e o ácido salicílico, tal como descrito na **Seção 3.10**, e novamente apresentado na **Tabela XXV**.

Resultados e discussão
Tabela XXV - Resumo dos valores de toxicidade para cada um dos componentes da emulsão 1.

CAS	Ingrediente	Toxicidade oral aguda (LD ₅₀)	Toxicidade dérmica aguda (LD ₅₀)	Toxicidade por inalação (LC ₅₀)	Toxicidade aquática (LC ₅₀)	Referências
8009-03-8	Vaselina	Ratos: > 5000 mg/kg	Ratos: > 2000 mg/kg	-	<i>Pimephales promelas</i> (peixe): > 100 mg/L; 96 h <i>Daphnia magna</i> (crustáceo): > 10000 mg/L; 48 h Algas: > 100 mg/L; 72 h	(CHEM-SUPPLY PTY LTD, 2015) (The good scents company, 2017a)
8006-54-0	Lanolina	Ratos: > 3200 mg/kg	Rato: > 1600 mg/kg	-	-	(GCF, 2012)
57-13-6	Ureia	Ratos: 8400 mg/kg	Ratos: 8200 mg/kg	-	<i>Poecilia reticulata</i> (peixe): 16200-18300 mg/L; 96h <i>Daphnia magna</i> (crustáceo): 3910 mg/L; 48 h <i>Scenedesmus quadricauda</i> (alga): > 10,000 mg/L	(Merck Millipore, 2017) (SRP, 2003)
69-72-7	Ácido salicílico	Ratos: 900 mg/kg	Ratos: > 2000 mg/kg	Ratos: > 900 mg/m ³ , 1 h	<i>Leuciscus idus</i> (peixe): 96 mg/L; 24h <i>Daphnia magna</i> (crustáceo): 105 mg/L; 24h	(Garon, 2013)

A vaselina é uma combinação complexa de hidrocarbonetos obtida a partir da desparafinação de óleo parafínico residual (European Commission, 2014b). A lanolina é um derivado refinado de secreção sebácea de ovelha (European Commission, 2014a). A ureia é um composto produzido no fígado a partir da amónia através da perda do grupo amina dos aminoácidos (National Center for Biotechnology Information, 2017). O ácido salicílico é um ácido fraco produzido sinteticamente e pode ser encontrado em plantas (National Center for Biotechnology Information, 2017b) .

De acordo com os dados indicados na tabela anterior, observa-se que o ácido salicílico é o composto que apresenta menor valor de LD₅₀ quando testado em ratos por via oral. É de salientar que este composto é utilizado no tratamento de algumas doenças

quando tomado por via oral. A vaselina e a lanolina, apresentam valores de LD₅₀ por via oral superiores a 5000 mg/kg e a 3200 mg/kg respetivamente.

A toxicidade dérmica aguda dos quatro reagentes foi determinada em ratos, tendo-se obtido valores superiores a 1600 mg/Kg. Em relação à toxicidade por inalação, o valor de LC₅₀ do ácido salicílico em ratos foi superior a 900 mg/m³, tendo sido necessária 1 hora para se verificar o efeito pretendido. Pode-se concluir que nenhum dos reagentes utilizados é tóxico quando a via de exposição é a via dérmica aguda, tendo em conta que os valores de LC₅₀ encontram-se aproximadamente entre 2000 mg/Kg e 5000 mg/Kg (International Labour Organization, 2009).

A toxicidade aquática de três dos compostos foi testada em diversos tipos de organismos aquáticos da cadeia alimentar, nomeadamente peixes, crustáceos e algas. Os valores obtidos foram bastantes díspares uma vez que estes animais são biologicamente muito distintos.

Na **Tabela XXVI** encontram-se os valores obtidos na literatura da toxicidade oral aguda, da toxicidade dérmica aguda, da toxicidade por inalação e da toxicidade em organismos presentes no meio aquático de cada um dos reagentes utilizados na emulsão 2.

A manteiga de karité é um óleo vegetal obtido a partir da semente de *Butyrospermum parkii* (European Commission, 2014d). O álcool cetílico é um surfactante não iónico, podendo ser obtido a partir de óleos vegetais como de palma ou de coco, ou ainda como produto final na indústria petrolífera (National Center for Biotechnology Information, 2017a). O óleo de amêndoas doces é um óleo vegetal obtido a partir da semente madura da amêndoa doce, *Prunus amygdalus* var. *dulcis* (European Commission, 2014c). A glicerina é um líquido vegetal transparente sem odor, podendo ser obtido como um subproduto da produção de biodiesel ou de óleos naturais (Christoph *et al.*, 2006).

Resultados e discussão

Tabela XXVI - Resumo dos valores de toxicidade para cada um dos reagentes utilizados na emulsão 2.

CAS	Reagente	Toxicidade oral aguda (LD ₅₀)	Toxicidade dérmica aguda (LD ₅₀)	Toxicidade por inalação (LC ₅₀)	Toxicidade em organismos aquáticos (LC ₅₀)	Referências
194043-92-0	Manteiga de karité	Ratos:>5 000 mg/kg	Ratos:>2 000 mg/kg	-	<i>Daphnia magna</i> :> 100 mg/mL; 48 h <i>Brachydanio rerio</i> : > 10 000 mg/mL; 96 h	(Interchimie, 2015)
36653-82-4	Álcool cetílico	Ratos:5000 mg/kg Ratinhos:3200 mg/kg	Coelhos:> 2600 mg/kg	Ratos:2220 mg/m ³ /6H	<i>Brachydanio rerio</i> (peixe):1,1 mg/L; 96 h <i>Desmodesmus subspicatus</i> (alga):235 mg/L; 96 h <i>Daphnia magna</i> (crustáceo):1,7 mg/L; 48 h	(ChemIDplus, 2017)
8007-69-0	Óleo de amêndoas doces	Ratos:> 5000 mg/kg	Coelhos:> 5000 mg/kg	-	-	(The good scents company, 2017b)
56-81-5	Glicerol	Ratinhos:4090 mg/kg Ratos:12600 mg/kg	Coelhos:10000 mg/kg	Ratos:> 570 mg/m ³ /1h	<i>Carassius auratus</i> (peixe):>5000 mg/L; 24 h <i>Daphnia magna</i> :> 10000 mg/L; 24 h	(Science lab, 2013) (OECD SIDS, 2002)

De acordo com os dados recolhidos na literatura, a determinação do valor de LD₅₀ no teste de toxicidade oral aguda do álcool cetílico, do óleo de amêndoas doces e do glicerol foi elaborado com ratos.

Relativamente à toxidade por inalação, o valor de LD₅₀ para o glicerol foi superior a 570 mg/m³/1h, tendo-se testado esta substância em ratos. Em relação ao álcool cetílico e ao glicerol, verifica-se que estes compostos foram testados em diversos tipos de microrganismos aquáticos tendo-se observado que os valores são muito dispares.

Tal como verificado anteriormente, nenhum dos reagentes utilizados é toxico quando a via de exposição é a dérmica, uma vez que os valores de LC₅₀ se encontram

aproximadamente entre 2000 mg/Kg e 5000 mg/Kg (International Labour Organization, 2009).

De acordo com o Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) 2015, The SCCS'S Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation 9th Revision a avaliação do risco é feita através da determinação da margem de segurança (MoS). A margem de segurança é definida como a relação entre a dose experimental mais elevada que não produz qualquer efeito sistémico (NOAEL – Non Observed Adverse Effect Level) e a dose diária absorvida (SED – Systemic Exposure Dose) à qual o utilizador é exposto através da equação 1 (Tabela XXVI):

$$\text{MoS} = \frac{\text{NOAEL (mg/kg /dia)}}{\text{SED (mg/kg /dia)}} \quad \text{Equação 1}$$

Considerando que a área de aplicação de um creme para os pés é de 1170 cm², que este é aplicado nos pés entre uma a duas vezes por dia, que o fator de retenção é 1, e que a exposição média estimada é de 1,2 g/dia (Bremmer *et al.*, 2006), então a exposição diária estimada será de 20 mg/ kg de peso corporal/ dia.

Assim, o SED para a formulação 1 (Tabela XXVII) foi calculado utilizando a equação 2:

$$\text{SED (mg/kg/dia)} = A \text{ (mg/kg/dia)} \times \frac{C (\%)}{100} \times \frac{DA (\%)}{100} \quad \text{Equação 2}$$

Onde A é a exposição diária estimada ao produto cosmético; C corresponde à concentração do ingrediente em estudo no produto cosmético final; DA é a absorção dérmica.

Tabela XXVII - Avaliação da margem de segurança dos reagentes presentes na formulação 1.

CAS	Ingrediente	C (%)	A (%)	SED (mg/kg/dia)	NOAEL (mg/kg/dia)	MoS	Referências
8009-03-8	Vaselina	63	100*	12,6	3000 (ratos, dois anos)	238	(GlaxoSmithKline US, 2013)
8006-54-0	Lanolina	10	100*	2	-	nc	-
57-13-6	Ureia	10	100*	2	2250 (ratos, 12 meses)	1500	(PCL sales, 2013)
69-72-7	Ácido salicílico	5	100*	1	150 (ratos)	3000	(European chemical agency, 2015)

*De acordo com a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE), quando não existem dados acerca da absorção dérmica, a mesma é considerada 100%; nc= não calculado.

O valor de MoS no mínimo de 100 indica que o ingrediente cosmético é considerado seguro para ser utilizado. Este valor é o fator utilizado para extrapolar os resultados obtidos num grupo de animais para a população humana. Os valores de MoS calculáveis para os três ingredientes que constituem a formulação base 1, são todos superiores a 100, o que indica que os mesmos são considerados seguros na formulação cosmética e consequentemente esta também o é.

Em relação à formulação base 2 não é possível avaliar o valor de MoS dos ingredientes desta, uma vez que tem como objetivo ser aplicada em pequenas feridas e queimaduras e como tal não tem uma frequência e área de aplicação exatas. De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), este produto é considerado tanto um cosmético como um medicamento, tendo de cumprir, de modo a poder ser colocado no mercado, os regulamentos existentes para ambos (*U.S. Food and Drug Administration*, 2016).

A *Artemia salina* L. é um crustáceo de água salgada bastante resistente, sendo utilizado com propósitos educacionais e em testes de toxicidade, uma vez que se reproduz rapidamente e o seu ambiente natural pode ser facilmente replicado. Considerando a tendência de limitar a utilização de animais em testes laboratoriais os testes de toxicidade utilizando *Artemia salina* L. podem ser úteis para prever, num teste simples e rápido, a toxicidade de compostos puros e de extratos complexos, sendo um guia para posteriormente proceder a outros testes. Como tal, este crustáceo foi utilizado para determinar qual a concentração que provoca a morte de 50% da população de *Artemia salina* L. (LC₅₀) quando utilizado o óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* e de *Mentha pulegium*, assim como os voláteis obtidos a partir da cultura *in vitro* de *Clitocybe odora*.

A toxicidade de uma planta e dos seus extratos na *Artemia salina* está relacionada com a composição química da mesma, e conseqüentemente com o efeito biológico dos compostos. Este estudo é de extrema importância para avaliar a necessidade da realização de estudos mais aprofundados dos extratos utilizados, como a determinação da citotoxicidade em culturas de células, toxicidade cutânea (ocular e irritação cutânea), entre outros. Deste modo, e apesar do teste de letalidade da *Artemia salina* não permitir determinar o mecanismo de ação dos extratos testados, é feita uma primeira avaliação da citotoxicidade, sendo uma ferramenta para avaliar a citotoxicidade das plantas e para avaliar a necessidade de efetuar estudos adicionais.

O DMSO é um solvente frequentemente utilizado em ensaios que têm como finalidade a avaliação da citotoxicidade de extratos obtidos a partir de diversos produtos naturais uma vez que o mesmo apresenta uma baixa toxicidade em *Artemia salina*. De acordo com Thong *et al.*, (2013) o DMSO apresenta um valor de LC₅₀ de 8,5%, enquanto que o metanol, o etanol e o Tween 20 apresentam um valor de LC₅₀ em *Artemia salina* de 6,4%, 3,4% e 2,5% respetivamente. Estes valores evidenciam a baixa toxicidade do DMSO para a *Artemia salina*. Conseqüentemente, e tendo em conta que o

DMSO é um excelente solvente no qual é possível dissolver óleos essenciais, este foi utilizado para elaborar os testes de toxicidade tendo sido utilizado como solvente.

Previamente foi elaborado um ensaio com diferentes concentrações de DMSO (0,4-9,0 % v/v) com o objetivo de avaliar o efeito do mesmo na *Artemia salina* nas condições utilizadas neste estudo e para evitar a presença de falsos positivos. Para tal foi determinada a percentagem de mortalidade e representada em função da percentagem de DMSO (v/v) utilizada (**Figura 37**).

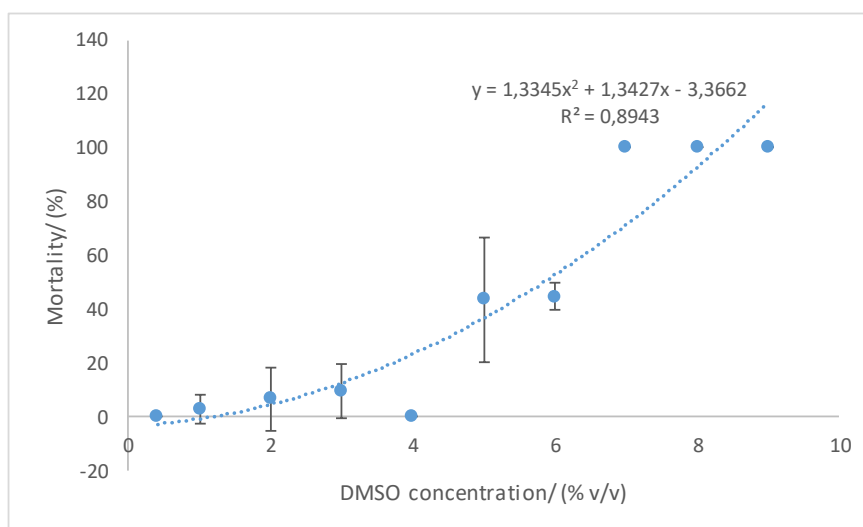


Figura 37 - Toxicidade do DMSO, expressa como a média das percentagem de mortalidade de *Artemia salina* (n=3).

Pode-se observar que quanto maior a percentagem de DMSO utilizada, maior a percentagem de mortalidade de *Artemia salina* L. evidenciando o efeito deste solvente nos crustáceos utilizados. O valor de LC₅₀ obtido para o DMSO foi de 5,33%, o qual se encontra relativamente próximo do descrito por Thong *et al.*, (2013). Segundo Barahona-Gomariz *et al.*, (1994), o DMSO apresenta uma baixa toxicidade para a *Artemia salina* L., no entanto verificou-se que os náuplios eram bastante sensíveis ao mesmo, sugerindo uma relação entre a mortalidade e a concentração do solvente.

Uma vez que se observou uma percentagem de mortalidade nula para 0,4% (v/v) de DMSO, esta foi a concentração selecionada para a dissolução dos extratos a testar. Esta concentração está de acordo com a concentração máxima tolerável de 1,25% (v/v) sugerida para a dissolução de amostras em DMSO (Thon *et al.*, 2013). Para a avaliação da citotoxicidade dos extratos, utilizaram-se concentrações de óleos essenciais entre 1 e 0,1 mg/mL, que se encontram na gama da concentração utilizada nas formulações cosméticas.

Os valores de LC₅₀ dos voláteis de *Clitocybe odora* e dos óleos essenciais de *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* foram inferiores a 100 µg/mL (**Tabela XXVIII**). Tendo em consideração a classificação proposta por Medeiros & Filho, (2016), um extrato apresenta toxicidade elevada caso os valores de LC₅₀ se encontrem entre 0-500 µg/mL, toxicidade moderada caso se encontrem entre 500-1000 µg/mL e baixa toxicidade ou nenhuma caso o valor de LC₅₀ seja superior a 1000 µg/mL. Deste modo, e tendo em conta este critério, pode-se concluir que os extratos obtidos são biologicamente ativos contra a *Artemia salina*, apresentando uma toxicidade elevada para a mesma.

Tabela XXVIII - Resultados obtidos dos valores de LC₅₀ obtidos no teste de toxicidade aguda com *Artemia salina*.

	Voláteis de <i>Clitocybe odora</i>	Óleo essencial de <i>Mentha pulegium</i>	Óleo essencial de <i>Thymus</i> <i>zygis</i> L. subsp. <i>zygis</i>
LC ₅₀ (µg/mL)	< 100	< 100	< 100

De acordo com o reportado num estudo realizado por Badisa *et al.*, (2003) evidenciou-se a elevada citotoxicidade contra a *Artemia salina* L. de um extrato metanólico de *Mentha pulegium*, que apresentou um valor de LC₅₀=347,3 µg/mL o que se encontra de acordo com os resultados obtidos neste estudo. Considerando que de

acordo com Sutil *et al.* (2006), a pulegona apresenta uma elevada toxicidade ($LC_{50}=300$ $\mu\text{g/mL}$) relativamente à *Artemia salina* é possível que a presença deste composto, o qual segundo Mata *et al.*, (2007) é o composto maioritário no óleo essencial de *Mentha pulegium*, tenha contribuído para a elevada toxicidade apresentada por este óleo essencial.

No desenvolvimento de cada formulação, a concentração de cada um dos óleos essenciais utilizados foi de $7,86 \times 10^{-6}$ g/g (óleo essencial/creme), pelo que a concentração do óleo de *Mentha pulegium* na formulação cosmética é inferior a 0,2%. Mesmo considerando que o óleo essencial é constituído 90% por pulegona, a concentração desta nas formulações cosméticas é inferior a 1% pelo que se pode concluir as formulações estão de acordo com o recomendado pelo comité do *Cosmetic Ingredient Review* (CIR).

A análise da composição do extrato obtido a partir micélio *in vitro* de *Clitocybe odora*, descrita na **Seção 4.2.1**, mostrou que o espatulenol é o composto maioritário detetado, tendo contribuído com 21,1% da área cromatográfica total dos compostos identificados. Considerando que o espatulenol é o composto maioritário que compõe o extrato de *Clitocybe odora* obtido e tendo em conta que o mesmo é considerado citotóxico (Areche *et al.*, 2009) é possível que o valor de LC_{50} obtido para a *Artemia salina* se deva à presença deste composto.

De acordo com os resultados obtidos por Dandlen *et al.*, (2011), o composto maioritário presente no óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* é o carvacrol, o qual foi também o composto maioritário detetado na composição dos voláteis desta espécie, descrita na **seção 4.2.3**. Apesar de não terem sido encontrados na literatura valores de LC_{50} em *Artemia salina*, existem diversos estudos que reportam a toxicidade deste composto (Ipek *et al.*, 2005; Monzote *et al.*, 2009; Tasdemir *et al.*, 2006), o que permite inferir o seu contributo para a elevada toxicidade verificada para o óleo essencial de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*.

4.9 Potencial ocular irritativo das formulações

Para além da citotoxicidade, avaliada através do ensaio com *Artemia salina*, pretendeu-se também determinar o potencial irritativo das formulações cosméticas preparadas. Deste modo, utilizou-se o teste HET-CAM (*Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane*), que fornece informação acerca do potencial ocular irritativo de uma dada substância, bem como dos efeitos que a mesma pode provocar na membrana ocular (Eiras *et al.*, 2017). Este método é baseado na similaridade entre a membrana corioalantóica (CAM) de um ovo de galinha com embrião e os tecidos mucosos vascularizados dos olhos de coelhos e de humanos (Barile, 2010).

Este método tem o potencial de refinar e reduzir a utilização de animais usados em testes de irritação da mucosa ocular, reduzindo também a dor e o sofrimento dos coelhos pela sua exclusão dos referidos testes (Barile, 2010). Pode também ser utilizado como um teste preliminar antes de se decidir quanto à necessidade de ser feito um estudo animal mais aprofundado (Scheel *et al.*, 2011).

O princípio do teste HET-CAM baseia-se na medição do potencial de ser induzida uma reação indesejada na membrana corioalantóide do ovo de galinha pela substância em análise. Aquando da avaliação do efeito deve-se verificar se ocorre hemorragia, coagulação ou heperemia dos vasos sanguíneos e avaliar a toxicidade da substância tendo como base o índice de irritação (IS) (De Araújo *et al.*, 2014; *National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods*, 2006).

De acordo com Mansur *et al.* (2006), e tal como descrito mais detalhadamente na **Seção 3.17**, os efeitos irritantes observados são classificados quantitativamente, tendo em consideração o tempo no qual foram detetados, possibilitando o cálculo do IS da formulação cosmética testada.

De acordo com o *Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* (ICCVAM), os resultados obtidos neste teste só são considerados válidos caso o controlo positivo seja considerado severamente irritante (IS=9-21) e o controlo negativo não seja considerado irritante (IS=0-4,99).

Nos ensaios realizados, verificou-se que quando se aplicou o controlo negativo (NaCl 0,9% (m/v)) na membrana não foi observada qualquer alteração na mesma durante o período de 300 segundos, o que corresponde a uma situação de não irritabilidade (IS=0). Pelo contrário, para o controlo positivo (NaOH 1% (m/v)) foi observada heperemia, hemorragia e coagulação dos vasos sanguíneos em poucos segundos (~2 segundos) (**Figura 38 A e B** respetivamente), correspondendo a uma situação de irritabilidade severa (IS=21). Assim, considerando os critérios descritos anteriormente, bem como os resultados obtidos para os controlos negativo e positivo, poderemos considerar como válidos os resultados obtidos com o teste HET-CAM para as formulações cosméticas preparadas e que são descritos de seguida.

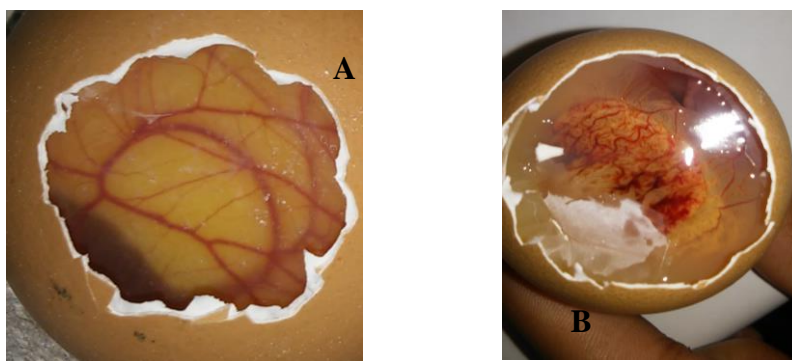


Figura 38 - Teste de toxicidade das soluções controlo; (A – Controlo negativo; B – Controlo positivo).

Na **Tabela XXIX** encontram-se os valores do IS obtidos para as formulações **F1-F12**.

Tabela XXIX - Valores de IS para as formulações F1-F12.

Formulação	Hemorragia	Heperemia	Coagulação	IS	Classificação
F1	-	-	-	0	Não irritante
F2	-	-	-	0	Não irritante
F3	-	-	-	0	Não irritante
F4	-	-	-	0	Não irritante
F5	-	-	-	0	Não irritante
F6	-	-	-	0	Não irritante
F7	-	-	-	0	Não irritante
F8	-	-	-	0	Não irritante
F9	-	-	-	0	Não irritante
F10	-	-	-	0	Não irritante
F11	-	-	-	0	Não irritante
F12	-	-	-	0	Não irritante

Quando aplicadas as formulações mencionadas na câmara não se verificou a ocorrência de hemorragia, coagulação ou heperemia dos vasos sanguíneos, o que sugere que as formulações serão seguras.

Na **Tabela XXX** encontra-se os valores do IS obtidos para as formulações **FC1-FC12**.

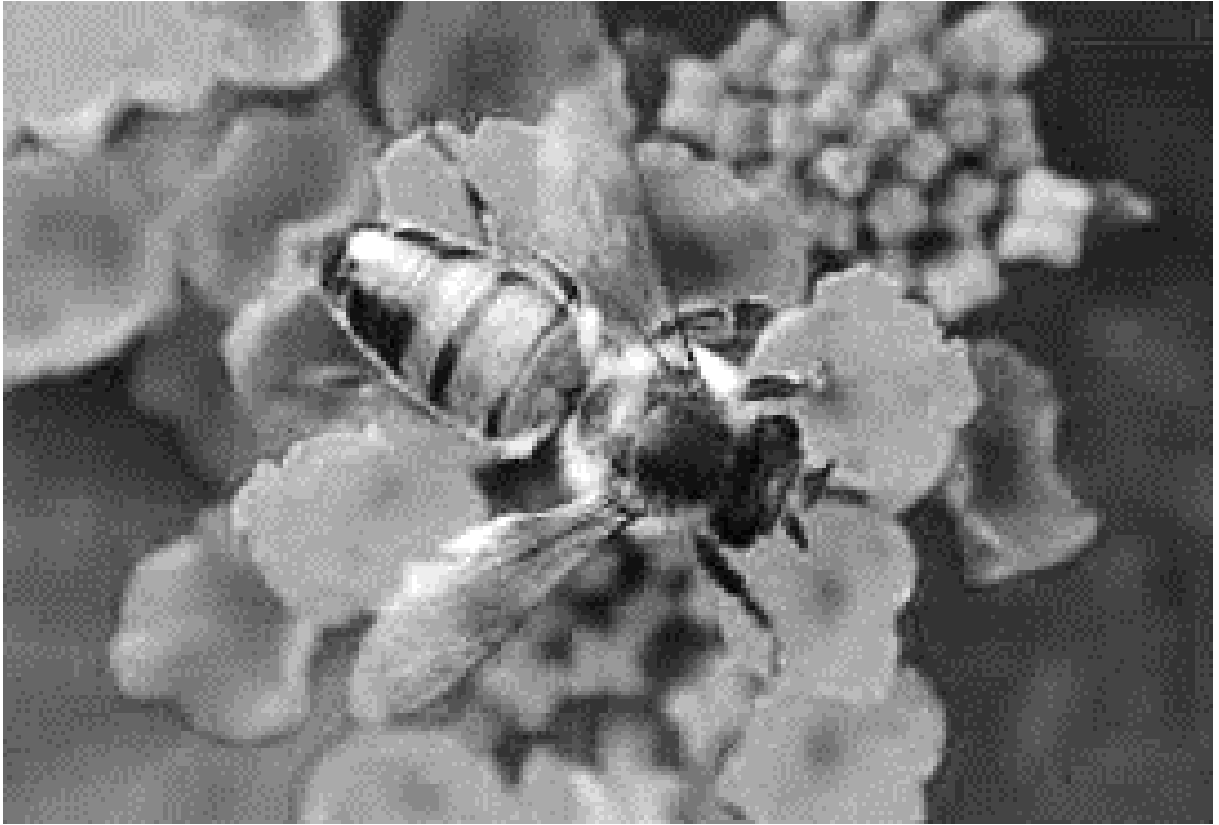
Tabela XXX - Valores de IS para as formulações FC1-FC12.

Formulação	Hemorragia	Heperemia	Coagulação	IS	Classificação
FC1	3	-	-	3	Não irritante
FC2	3	-	-	3	Não irritante
FC3	3	-	-	3	Não irritante
FC4	3	-	-	3	Não irritante
FC5	3	-	-	3	Não irritante
FC6	3	-	-	3	Não irritante
FC7	3	-	-	3	Não irritante
FC8	3	-	-	3	Não irritante
FC9	3	-	-	3	Não irritante
FC10	3	-	-	3	Não irritante
FC11	3	-	-	3	Não irritante
FC12	3	-	-	3	Não irritante

Os valores de IS obtidos para as formulações **FC1-FC12** encontram-se entre 0 e 4,99 pelo que estas são consideradas não irritantes, o que foi confirmado pela inexistência de heperemia ou de coagulação dos vasos sanguíneos. A ocorrência de hemorragia na membrana corioalantóide do ovo possivelmente deve-se à formulação base **FC**, uma vez que ao serem analisadas as formulações obtidas a partir da formulação **F** este resultado não se verificou.

Os resultados obtidos através do teste HET-CAM sugerem que as diversas formulações cosméticas preparadas não possuem um potencial irritativo ocular significativo. No entanto, devemos ter em atenção que o teste de HET-CAM apresenta algumas limitações, uma vez que a substância de teste pode interferir com a visão da CAM. É possível que ocorra uma falsa observação, principalmente caso a substância seja sólida ou turva, pelo que os testes padronizados e regulares deveriam ser efetuados com soluções saturadas da substância sólida no caso em que a cinética da solução afeta as propriedades irritantes da CAM (Scheel *et al.*, 2011).

Futuramente, para além do teste hemolítico com células vermelhas de ovelha (RBC – Red Blood cells), poderão ser realizados testes adicionais para confirmar os resultados obtidos, nomeadamente o método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (*BCOP*- Bovine Cornea Opacity Permeability) o qual mede a capacidade de um químico induzir a opacidade e permeabilidade na córnea isolada de bovinos (De Araújo *et al.*, 2014) e o método de testes em olhos isolados de galinhas, o qual avalia a capacidade de um composto químicos induzir toxicidade no olho de uma galinha (Wilson *et al.*, 2015).



Conclusões e perspectivas futuras

5 Conclusões e perspectivas futuras

Neste trabalho, analisou-se o crescimento do fungo *Clitocybe odora in vitro* em dois meios de culturas diferentes, MMN incompleto e PDA. O meio MMN incompleto permitiu obter uma taxa de crescimento mais elevada, tendo sido o escolhido para se proceder à extração-destilação LN dos voláteis do micélio *in vitro*, no qual foram identificados como compostos maioritários o espatulenol e o β -cariofileno. Estes compostos, de acordo com a literatura, não foram identificados em amostras *in vivo*, sendo o composto maioritário presente nestas o *p*-anisaldeído. O extrato obtido a partir das amostras *in vitro* exibiu uma elevada toxicidade em *Artemia salina*, tendo-se obtido uma taxa de mortalidade de 100%, o que se deve possivelmente à presença de espatulenol como composto maioritário do extrato.

O espatulenol devido às propriedades antimicrobianas apresenta um elevado potencial para ser incorporado numa formulação cosmética e considerando que é o composto maioritário presente no extrato obtido do micélio *in vitro* de *Clitocybe odora* potencia a utilização deste extrato como uma fonte alternativa para este composto, que no futuro poderá fazer parte da composição de uma formulação cosmética. Para além disso, e uma vez que o crescimento de uma cultura *in vitro* é independente da altura do ano, sendo apenas necessário a utilização das condições ótimas de luz e de temperatura, esta metodologia poderá ser utilizada para o crescimento micelial do *Clytocibe odora*. No entanto, tendo em conta que a composição do extrato varia com o método de extração utilizado, no futuro poderão ser testados métodos alternativos de modo a obter extratos com propriedades relevantes na indústria cosmética.

Verificou-se que a incorporação dos produtos apícolas não afetou o pH das formulações nem a sua densidade relativa, tendo-se verificado, no entanto, a ocorrência de alterações na viscosidade das emulsões para valores de velocidade de rotação do *spindle* baixos (0,3 rpm). Os testes de estabilidade a curto prazo evidenciaram a ocorrência de separação de fases, sugerindo que as formulações cosméticas, preparadas

de acordo com a metodologia adotada, não são estáveis. Esta instabilidade poderá estar relacionada com a velocidade com que as duas fases das emulsões são misturadas. De modo a estabilizar as amostras futuramente poderá ser feita uma otimização da velocidade de mistura da fase aquosa e da fase com óleo que compõem a emulsão, utilizando adicionalmente um agente estabilizante. Neste teste verificou-se também que a utilização do extrato hidroalcoólico de própolis afetava a cor das emulsões, o que se já tinha sido verificado antes da elaboração do ensaio. É de realçar que a distinta procedência dos dois méis utilizados não pareceu afetar de forma relevante os resultados obtidos nos testes de estabilidade, microbiológicos ou físico-químicos.

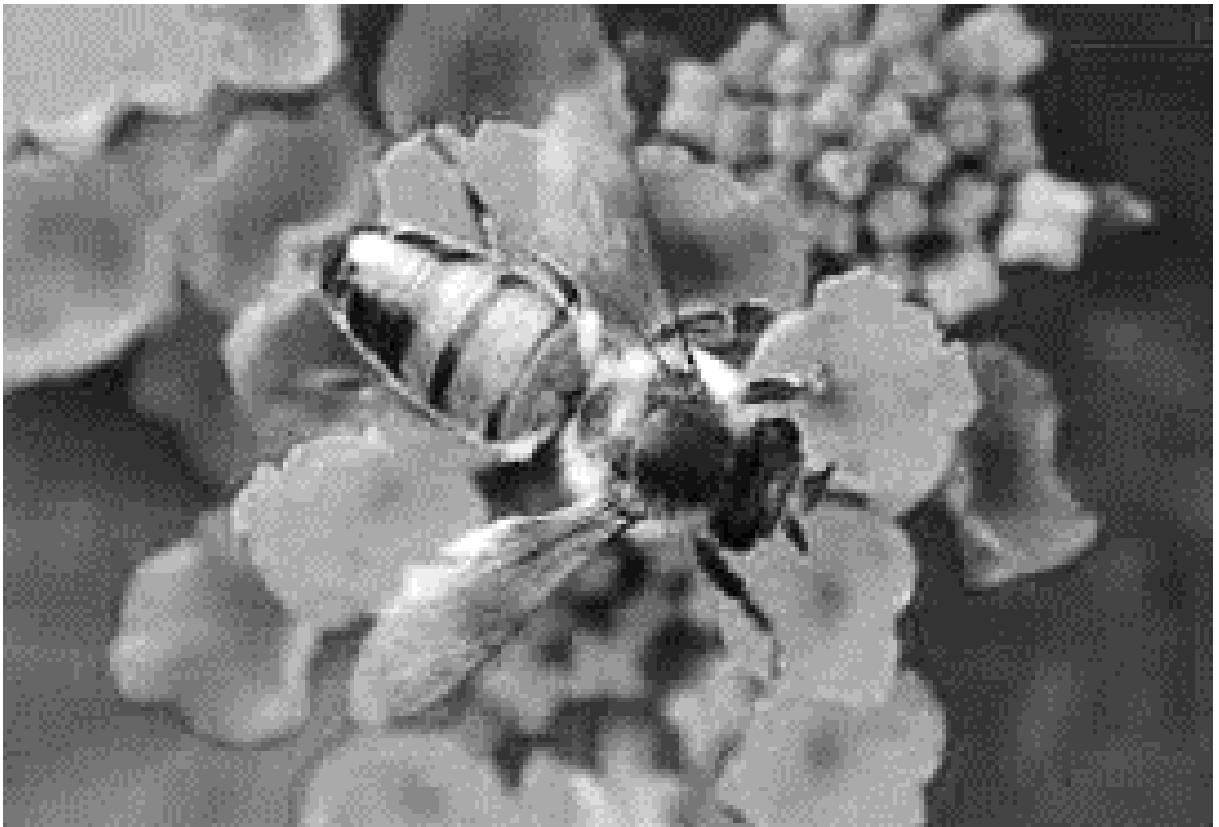
O sistema de preservação utilizado, constituído pelos óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Thymus zygis* L. subsp. *zygis* foi eficaz, não se tendo verificado contaminação das formulações cosméticas. Verificou-se ainda que todas as formulações apresentavam atividade fungistática em relação à *Candida albicans* e bacteriostática para os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em relação à bactéria *Bacillus subtilis*, verificou-se que todas as emulsões inibiam o crescimento da mesma, apresentando um forte efeito bacterioestático. Relativamente aos dois produtos apícolas, verificou-se que apesar de estes serem reportados na bibliografia como agentes bactericidas e fungicidas, a sua incorporação em formulações cosméticas não alterou os resultados obtidos quando comparados com o controlo sem os mesmos.

É de realçar que a distinta procedência e possivelmente composição dos dois méis utilizados (apesar de ambos serem de rosmaninho, serão méis de *Lavandulas sp.* maioritariamente diferentes, uma vez que a distribuição das espécies é também diferente entre estas duas zonas do país) assim como a concentração dos mesmos não pareceu afetar de forma relevante os resultados obtidos nos testes de estabilidade, microbiológicos e físico-químicos.

Os resultados obtidos do teste com *Artemia salina* indicam que os dois óleos são tóxicos para este crustáceo, tendo-se obtido valores de $LC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$. De acordo com a literatura, a pulegona e o carvacrol são os componentes maioritários dos óleos essenciais do *Mentha pulegium* e de *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*, respetivamente. Apesar de não ter sido possível encontrar na literatura valores de LC_{50} para o carvacrol existem diversos estudos que reportam a toxicidade deste composto, o que permite inferir o seu contributo para a elevada toxicidade verificada para o óleo essencial do *Thymus zygis* L. subsp. *zygis*. Em relação à pulegona, esta é reportada como apresentando uma elevada toxicidade ($LC_{50} = 300 \mu\text{g/mL}$) para a *Artemia salina* pelo que é possível que a presença deste composto no óleo essencial de *Mentha pulegium* seja o responsável pela toxicidade do mesmo.

Apesar do teste de letalidade da *Artemia salina* não permitir determinar o mecanismo de ação dos extratos testados, foi possível mostrar a elevada toxicidade dos mesmos. Este teste permite fazer uma primeira avaliação da citotoxicidade, sendo uma ferramenta para avaliar a citotoxicidade das plantas e para avaliar a necessidade de efetuar estudos adicionais. Futuramente pode-se vir a determinar se existe uma interação sinérgica entre os compostos que constituem os extratos ou se a toxicidade dos mesmos está relacionada com um único composto.

Os resultados obtidos através do teste HET-CAM sugerem que as diversas formulações cosméticas preparadas não possuem um potencial irritativo ocular significativo. Futuramente, para além do teste hemolítico com células vermelhas de ovelha (RBC), poderão ser realizados testes adicionais para confirmar os resultados obtidos, nomeadamente o método de ensaio de opacidade e permeabilidade da córnea em bovinos (BCOP), o qual mede a capacidade de um químico induzir a opacidade e permeabilidade na córnea isolada de bovino e o método de testes em olhos isolados de galinhas, o qual avalia a capacidade de um composto químicos induzir toxicidade no olho de uma galinha.



Referências

6 Referências

- Abd, R. M., Nour, A. H., & Sulaiman, A. Z. (2014). Experimental Investigation on Dynamic Viscosity and Rheology of Water-Crude Oil Two Phases Flow Behavior at Different Water Volume Fractions. *American Journal of Engineering Research*, 5(3), 2320–847. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.379>
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. (2004). *Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos*. (Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional, Ed.), *Anvisa* (1º, Vol. 1). Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Ahmad, H., Khan, I., & Wahid, A. (2012). Antiglycation and antioxidation properties of *Juglans regia* and *Calendula officinalis*: possible role in reducing diabetic complications and slowing down ageing. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 32(3), 411–414. [https://doi.org/10.1016/S0254-6272\(13\)60047-3](https://doi.org/10.1016/S0254-6272(13)60047-3)
- Ait-Ouazzou, A., Espina, L., Cherrat, L., Hassani, M., Laglaoui, A., Conchello, P., & Pagán, R. (2012). Synergistic combination of essential oils from Morocco and physical treatments for microbial inactivation. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2012.07.002>
- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F., & Cormier, M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. *Journal of Natural Products*, 64(5), 235–240. <https://doi.org/10.1021/np50107a013>
- Areche, C., Schmeda-Hirschmann, G., Theoduloz, C., & Rodríguez, J. A. (2009). Gastroprotective effect and cytotoxicity of abietane diterpenes from the Chilean Lamiaceae *Sphacele chamaedryoides* (Balbis) Briq. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61, 1689–1697. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.12.0015>

- Aswal, A., Kalra, M., & Rout, A. (2013). Preparation and evaluation of polyherbal cosmetic cream. *Der Pharmacia Lettre*, 5(1), 83–88. Consultado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84875383614&partnerID=tZOtx3y1>
- Badisa, R. B., Tzakou, O., Couladis, M., & Pilarinou, E. (2003). Cytotoxic activities of some Greek Labiatae herbs. *Phytotherapy Research*, 17(5), 472–476. <https://doi.org/10.1002/ptr.1175>
- Barahona-Gomariz, M. V., Sanz-Barrera, F., & Sánchez-Fortún, S. (1994). Acute toxicity of organic solvents on *Artemia salina*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 52(5), 766–771. <https://doi.org/10.1007/BF00195501>
- Barile, F. A. (2010). Validating and troubleshooting ocular *in vitro* toxicology tests. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 61(2), 136–145. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2010.01.001>
- Barthelmes, G., Pratsinis, S. E., & Buggisch, H. (2003). Particle size distributions and viscosity of suspensions undergoing shear-induced coagulation and fragmentation. *Chemical Engineering Science*, 58(13), 2893–2902. [https://doi.org/10.1016/S0009-2509\(03\)00133-7](https://doi.org/10.1016/S0009-2509(03)00133-7)
- Baser, K. H. C. (2008). Biological and pharmacological activities of carvacrol and carvacrol bearing essential oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14(29), 3106–3119. <https://doi.org/10.2174/138161208786404227>
- Baser, K. H. C., & Kürkçüoğlu, M. (1999). Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 11(3), 579–588.
- Bernatoniene, J., Davalgienė, J., Masteiková, R., Muselík, J., Drakšienė, G., Lazauskas, R., ... Chalupová, Z. (2010). Preparation and evaluation of hydrophilic cream with propolis extract. *Ceska a Slovenska Farmacie*, 59(1), 11–17.

- Boukraâ, L. (2015). Bee products: The rediscovered antibiotics. *Anti-Infective Agents*, 13(1), 36–41. <https://doi.org/10.2174/2211352513666150318233855>
- Boyer, I., Heldreth, B., & Johnson, W. (2017). *Amended safety assessment of Mentha piperita (peppermint) - derived ingredients as used in cosmetics*. Washinton. Consultado de <http://www.cir-safety.org/sites/default/files/peppermint.pdf>
- Brahmi, F., Abdenour, A., Bruno, M., Silvia, P., Alessandra, P., Danilo, F., ... Mohamed, C. (2016). Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, insecticidal and antioxidant activities of the essential oils of *Mentha pulegium* L. and *Mentha rotundifolia* (L.) Huds growing in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 88, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.002>
- Bremmer, H. J., & Lodder, L.C.H. Prud'homme Engelen, J. G. M. van. (2006). *Cosmetics Fact Sheet*. Bilthoven. Consultado de <http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/320104001.pdf>
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), 347–363. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00145-2](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00145-2)
- Burgess, C. M. (2005). *Cosmetic Dermatology*. (C. M. Burgess, Ed.) (1º). Germny: Springer. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Burlando, B., & Cornara, L. (2013). Honey in dermatology and skin care: A review. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 12(4), 306–313. <https://doi.org/10.1111/jocd.12058>
- Carrasco Ruiz, A., Tomas, V., Tudela, J., & Miguel, M. G. (2016). Comparative study of GC-MS characterization, antioxidant activity and hyaluronidase inhibition of different species of *Lavandula* and *Thymus* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 31(1), 57–69. <https://doi.org/10.1002/ffj.3283>

- Chá verde botica. (2016). Creme natural para psoríase. Consultado janeiro 29, 2017, de <http://lojavirtual.chaverdebotica.com.br/cosmeticos-naturais/pomadas-medicinais-manipuladas/creme-natural-para-psoriase-com-100-gramas.html>
- Chandran, P. K., & Kuttan, R. (2008). Effect of *Calendula officinalis* Flower Extract on Acute Phase Proteins, Antioxidant Defense Mechanism and Granuloma Formation During Thermal Burns. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 43(2), 58–64. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.2008043>
- CHEM-SUPPLY PTY LTD. (2015). Ficha de segurança de vaselina. Consultado março 20, 2017, de http://www.aboutfaceonline.com.au/wordpress/wp-content/uploads/2016/07/Vaseline_MSDS_2015.pdf
- ChemIDplus. (2017). Alcool cetílico. Consultado março 24, 2017, de <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/36653-82-4>
- Cherrat, L., Espina, L., Bakkali, M., Pagán, R., & Laglaoui, A. (2014). Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of *Mentha pulegium*, *Lavandula stoechas* and *Satureja calamintha* Scheele essential oils and an evaluation of their bactericidal effect in combined processes. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 221–229. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.12.016>
- Chirife, J., Zamora, M. C., & Motto, A. (2006). The correlation between water activity and % moisture in honey: Fundamental aspects and application to Argentine honeys. *Journal of Food Engineering*, 72(3), 287–292. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2004.12.009>
- Cho, I. H., Namgung, H. J., Choi, H. K., & Kim, Y. S. (2008). Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.). *Food Chemistry*, 106(1), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.05.047>

- Christoph, R., Schmidt, B., Steinberner, U., Dilla, W., & Karinen, R. (2006). Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry.
- COLIPA - The European Cosmetics Association. (2004). Guidelines for the Safety Assessment of a Cosmetic Product, 25.
- Committee on herbal medicinal products (HMPC). (2008). *Community Herbal Monograph on Calendula officinalis L., Flos*. London.
- Council of Europe. European Pharmacopoeia. 4th Ed. (2002) Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe. Strasbourg Cedex.
- Crane, E. (2009). bee products. In *Encyclopedia of Insects* (2º, pp. 71–75). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00020-5>
- Cunha, A. P., Ribeiro, J., & Roque, O. R. (2009). *Plantas aromáticas em Portugal caracterização e utilizações* (2º). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A. P. da, Silva, A. P. da, & Rodrigues, O. R. (2012). *Fitoterapia na actualidade, Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. <https://doi.org/972-31-1010-5>
- D'Ambrosio, M., Ciocarlan, A., Colombo, E., Guerriero, A., Pizza, C., Sangiovanni, E., & Dell'Agli, M. (2015). Structure and cytotoxic activity of sesquiterpene glycoside esters from *Calendula officinalis* L.: Studies on the conformation of viridiflorol. *Phytochemistry*, 117, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.05.005>
- Dandlen, S. A., Miguel, M. G., Duarte, J., Faleiro, M. L., Sousa, M. J., Lima, A. S., ... Pedro, L. G. (2011). Acetylcholinesterase Inhibition Activity of Portuguese *Thymus* Species Essential Oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(2), 140–150. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2011.10643914>
- Das, A., Datta, S., Mukherjee, S., Bose, S., Ghosh, S., & Dhar, P. (2015). Evaluation of

- antioxidative, antibacterial and probiotic growth stimulatory activities of *Sesamum indicum* honey containing phenolic compounds and lignans. *LWT - Food Science and Technology*, 61(1), 244–250. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.11.044>
- De Araújo, G. L., Campos, M. A. A., Valente, M. A. S., Silva, S. C. T., França, F. D., Chaves, M. M., & Tagliati, C. A. (2014). Alternative methods in toxicity testing: The current approach. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1), 55–62. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502011000100005>
- Decreto-Lei n.º 214/2003 de 18 de setembro. Diário da República nº 216/2003, Série I-A. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa.
- Derakhshani, Z., Hassani, A., Pirzad, A., Abdollahi, R., & Dalkani, M. (2012). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity in some medicinal herbs cultivated in Iran. *Botanica Serbica*, 36(2), 117–122. Consultado de http://botanicaserbica.bio.bg.ac.rs/arhiva/pdf/2012_36_2_566_full.pdf
- Efstratiou, E., Hussain, A. I., Nigam, P. S., Moore, J. E., Ayub, M. A., & Rao, J. R. (2012). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complementary Therapies in Clinical Practice*, 18(3), 173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ctcp.2012.02.003>
- Eiras, F., Amaral, M. H., Silva, R., Martins, E., Lobo, J. M. S., & Silva, A. C. (2017). Characterization and biocompatibility evaluation of cutaneous formulations containing lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 519(2), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.006>
- Estevinho, M. L., Afonso, S. E. T., & Feás, X. (2011). Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 640–643. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0243-1>

- Euromonitor International. (2015). Beauty and personal care in Portugal. Consultado fevereiro 1, 2017, de <http://www.euromonitor.com/beauty-and-personal-care-in-portugal/report>
- European chemical agency. (2015). *Additional information report for salicylic acid*. Consultado de <https://echa.europa.eu/documents/10162/a87638d8-c478-470e-8bc6-b877a7899964>
- European Commission. (2014a). Ingredient : Lanolin. Consultado abril 18, 2017, de http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=34857
- European Commission. (2014b). Ingredient : Petrolatum. Consultado abril 18, 2017, de http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=79504
- European Commission. (2014c). Ingredient : *Prunus amygdalus dulcis* oil. Consultado abril 19, 2017, de http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=78927
- European Commission. (2014d). Ingredient: *Butyrospermium Parkii* butter. Consultado abril 19, 2017, de <http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details&id=84401>
- Falcão, S. (2013). *Chemical Composition of Portuguese Propolis Bioactive Properties*. Universidade do Porto.
- Falcão, S. I., Freire, C., & Vilas-Boas, M. (2013). A proposal for physicochemical standards and antioxidant activity of Portuguese propolis. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(11), 1729–1741. <https://doi.org/10.1007/s11746-013-2324-y>
- Falcão, S. I., Vilas-Boas, M., Estevinho, L. M., Barros, C., Domingues, M. R. M., &

- Cardoso, S. M. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 887–897. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3232-8>
- Federação nacional dos apicultores de Portugal. (2016). Mel De Rosmaninho Português. Consultado janeiro 13, 2017, de <http://fnap.pt/projectos/projecto-mel-de-rosmaninho-portugues/>
- Fernandes, E. F. A., Meloni, F., Borella, J. C., & Lopes, N. P. (2013). Effect of fertilisation and harvest period on polar metabolites of *Calendula officinalis*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23(5), 731–735. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013000500003>
- Fidył, K., Fiedorowicz, A., Strz̄adała, L., & Szumny, A. (2016). B-Caryophyllene and B-Caryophyllene Oxide—Natural Compounds of Anticancer and Analgesic Properties. *Cancer Medicine*, 3007–3017. <https://doi.org/10.1002/CAM4.816>
- Fonseca, Y. M., Catini, C. D., Vicentini, F. T. M. C., Nomizo, A., Gerlach, R. F., & Fonseca, M. J. V. (2010). Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(3), 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.019>
- Franck, A. J. (2004). Understanding Rheology of Thermosets. Consultado janeiro 30, 2017, de http://www.tainstruments.com/pdf/literature/AAN016_V1_U_StructFluids.pdf
- Franco, J. (1984). *Nova Flora de Portugal (Continente e Açores)*. (E. Editora). Lisboa.
- Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., De Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., & Rosalen, P. L. (2016). Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Journal de Mycologie Medicale*, 26(2), 122–

132. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2016.01.003>
- Gan, Z., Yang, Y., Li, J., Wen, X., Zhu, M., Jiang, Y., & Ni, Y. (2016). Using Sensor and Spectral Analysis to Classify Botanical Origin and Determine Adulteration of Raw Honey. *Journal of Food Engineering*, 178, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.01.016>
- Garon. (2013). Material safety data sheet. Consultado março 20, 2017, de <http://garon-msds.s3.amazonaws.com/Stop-Slip-HDV-MSDS-v3.pdf>
- Gaspar, L. R., & Maia Campos, P. M. B. G. (2003). Rheological behavior and the SPF of sunscreens. *International Journal of Pharmaceutics*, 250(1), 35–44. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00462-3](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00462-3)
- GCF. (2012). Lanolin - National Library of Medicine HSDB Database. Consultado março 20, 2017, de <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+1817>
- GlaxoSmithKline US. (2013). Safety data sheet - altabax ointment. Consultado janeiro 1, 2017, de <https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi8g6upkszTAhUDuBoKHaxQAjwQFghPMAU&url=http%3A%2F%2Fwww.msds-sk.com%2FGetSdsFile.ashx%3FfileId%3D88&usg=AFQjCNF24hptmied-VlAwrsgsilpu19JfAA&sig2=VsYDLcehcRtqogmU-P4BLw>
- Green, B. A., & SAbherwal, Y. (2014). PHAs and Bionic Acids: Next Generation Hydroxy Acids | Clinical Gate. In Z. D. Draelos (Ed.), *Procedures in Cosmetic Dermatology* (3rd ed., pp. 99–114). Consultado de <http://clinicalgate.com/phas-and-bionic-acids-next-generation-hydroxy-acids/>
- Guhad, F. (2005). Introduction to the 3Rs (Refinement , Reduction and Replacement).

- Contemporary Topics*, 44(2), 58–59. Consultado de <http://www.ingentaconnect.com/content/aalas/jaalas/2005/00000044/00000002/art00012>
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, 81(7), 715–23. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2010.06.005>
- Hanson, J. R. (2008). *The chemistry of fungi* (1st ed.). Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
- Hyde, K. D., Bahkali, A. H., & Moslem, M. A. (2010). Fungi - An unusual source for cosmetics. *Fungal Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s13225-010-0043-3>
- Infarmed. (2016). Cosméticos. Consultado fevereiro 1, 2016, de <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/cosmeticos>
- Interchimie. (2015). Fiche de donnes de securite -beurre de karite. Consultado março 23, 2017, de http://www.interchimie.fr/data/catalog/FS/FS_BEURRE_KARITE_FDS.pdf
- International Labour Organization. (2009). Acute toxicity. Consultado março 9, 2017, de <http://www.ilo.org/legacy/english/protection/safework/ghs/ghsfinal/ghsc05.pdf>
- Ipek, E., Zeytinoglu, H., Okay, S., Tuylu, B. A., Kurkcuoglu, M., & Baser, K. H. C. (2005). Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93(3), 551–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.12.034>
- Isaac, V. L. B., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Corrêa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica E Aplicada*, 29(1), 81–96.

- Consultado de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-54349121836&partnerID=tZOtx3y1>
- Jagua-Gualdrón, A. (2012). Cáncer y terapéutica con productos de la colmena. revisión sistemática de los estudios experimentales. *Rev. Fac. Med.*, *60*(2), 79–94.
- Jamnik, P., Goranovic, D., & Raspor, P. (2007). Antioxidative action of royal jelly in the yeast cell. *Experimental Gerontology*, *42*(7), 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.02.002>
- Jandrić, Z., Haughey, S. A., Frew, R. D., McComb, K., Galvin-King, P., Elliott, C. T., & Cannavan, A. (2015). Discrimination of honey of different floral origins by a combination of various chemical parameters. *Food Chemistry*, *189*, 52–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.165>
- Jiang, Y., Wu, N., Fu, Y.-J., Wang, W., Luo, M., Zhao, C.-J., ... Liu, X.-L. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *32*(1), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.03.011>
- Kačaniová, M., Rovná, K., Arpášová, H., Hleba, L., Petrová, J., Haščík, P., ... Stričík, M. (2013). The effects of bee pollen extracts on the broiler chicken's gastrointestinal microflora. *Research in Veterinary Science*, *95*(1), 34–7. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.02.022>
- Kaloustian, J., Chevalier, J., Mikail, C., Martino, M., Abou, L., & Vergnes, M.-F. (2008). Étude de six huiles essentielles: Composition chimique et activité antibactérienne. *Phytotherapie*, *6*(3), 160–164. <https://doi.org/10.1007/s10298-008-0307-1>
- Kiran Babu, G. D., Sharma, A., & Singh, B. (2016). Volatile composition of *Lavandula angustifolia* produced by different extraction techniques *. *Journal of Essential Oil Research*, *28*(6), 489–500. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1162210>

- Knowlton, J. L. (2000). Emulsion theory. In H. Butler (Ed.), *Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps* (10th ed., pp. 601–623). Great Britain: Flower academic publishers.
- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R., & Lanaras, T. (2002). Variation of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *Journal of Essential Oil Research*, 14(3), 224–227. <https://doi.org/10.1080/10412905.2002.9699830>
- Korać, R., Krajišnik, D., & Milić, J. (2016). Sensory and instrumental characterization of fast inverting oil-in-water emulsions for cosmetic application. *International Journal of Cosmetic Science*, 38(3), 246–256. <https://doi.org/10.1111/ics.12282>
- Kowalska, M., Ziomek, M., & Zbikowska, A. (2015). Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. *International Journal of Cosmetic Science*, 408–416. <https://doi.org/10.1111/ics.12211>
- Krell, R. (1996). *VALUE-ADDED PRODUCTS FROM BEEKEEPING Table of Contents by. Fao Agriculture Services Bulletin* (124th ed.). Nations, Food and Agriculture Organization of the United.
- Krystijan, M., Gumul, D., Ziobro, R., & Korus, A. (2015). The fortification of biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>
- Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., & Satya, S. (2011). Insecticidal properties of *Mentha* species: A review. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 802–817. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.02.019>
- Leonardi, G. R., Gaspar, L. R., & Maia Campos, P. M. B. G. (2002). Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das

- vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 77(5), 563–569. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962002000500006>
- Libralato, G., Prato, E., Migliore, L., Cicero, A. M., & Manfra, L. (2016). A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators*, 69, 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Logarto Parra, A., Silva Yhebra, R., Guerra Sardiñas, I., & Iglesias Buela, L. (2001). Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8(5), 395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
- Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., Barreto, G. D. A., Costa, S. S., Da Silva, D. F., Brandão, H. N., ... Padilha, F. F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS ONE*, 11(1), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145954>
- Mahboubi, M., & Haghi, G. (2008). Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(2), 325–7. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.023>
- Manço, L. M., Mercurio, D. G., Melo, M. O., & Campos, P. M. (2015). Development of cosmetic formulations containing glucan polymer of Cassava (*Manihot esculenta*): stability and sensory analysis. *Biomed Biopharm Res.*, 12(1), 91–98.
- Mansur, M., Leitão, S., Cesqueira-Coutinho, C., Vermelho, A., Silva, R., Presgrave, O., ... Santos, E. (2016). *In vitro* and *in vivo* evaluation of efficacy and safety of photoprotective formulations containing antioxidant extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 26(2), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.11.006>

- Marx, S. (2004). *Guidelines on stability testing of cosmetics product. Cosmetics Europe—The Personal Care Association. Colipa*. Brussels.
- Marzouk, Z. (2008). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Tunisian *Mentha pulegium* L. *J. Food. Agric. Environ.*, 6(janeiro), 1–10.
- Mata, A. T., Proença, C., Ferreira, A. R., Serralheiro, M. L. M., Nogueira, J. M. F., & Araújo, M. E. M. (2007). Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. *Food Chemistry*, 103, 778–786.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.017>
- McKnight, K. H., & McKnight, V. B. (1998). *A Field Guide to Mushrooms: North America*. (R. T. Peterson, Ed.) (1º). Houghton Mifflin Harcourt.
- Medeiros, S., Filho, A., Costa, H., Silva, F., Santos, R., Takahashi, J., ... Paulino, F. (2016). Chemical profile, antimicrobial activity, toxicity on *Artemia salina* and anti-acetylcholinesterase enzyme essential oil from *Bauhinia unguolata* L. (Fabaceae) leaves. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(29), 442–449.
<https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6120>
- Merck Millipore. (2017). Urea. Consultado março 20, 2017, de http://www.merckmillipore.com/PT/en/product/Urea,MDA_CHEM-108487?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.pt%2F
- Milena P. Popovaa, Vassya S.Bankovaa, Stefan Bogdanovb, Iva Tsvetkovac, Christo Naydenskic, Gian LuigiMarcazzand, A.-G. S. (2007). Chemical characteristics of *poplar* type propolis of different geographic origin*. *Apidologie*, 38, 306–311.
- Miles, P. G., & Chang, S.-T. (2004). *Mushrooms: Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2º). Boca Raton: CRC Press LLC.
<https://doi.org/10.1201/9780203492086>
- Mishra, A. P., Saklani, S., Milella, L., & Tiwari, P. (2014). Formulation and evaluation of

- herbal antioxidant face cream of *Nardostachys jatamansi* collected from Indian Himalayan region. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Suppl 2), S679–S682. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014APJTB-2014-0223>
- Montini, R. (2001). *Efeito de linhagens e substratos no crescimento miceliano e produtividade em cultivo axênico do cogumelo shiitake (Lentinula edodes (berk.) Pegler)*. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO.”
- Monzote, L., Stamberg, W., Staniek, K., & Gille, L. (2009). Toxic effects of carvacrol, caryophyllene oxide, and ascaridole from essential oil of *Chenopodium ambrosioides* on mitochondria. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240(3), 337–347. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.001>
- Morales, R. (2014). *Thymus* L. Consultado março 12, 2017, de http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/pdfs/12_140_21_Thymus.pdf
- Moreira, L., Dias, L. G., Pereira, J. A., & Estevinho, L. (2008). Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 46(11), 3482–3485. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.08.025>
- Mutsaer, M., Blitters, H. van, Wijk, Leve, L. van 't, Kerkvlie, J., T, J., & Waerd, van de. (2006). *Produtos apícolas: propriedade, processamento e comercialização*. (M. Mutsaers, Ed.) (1º). Wageningen: Fundação Agromisa e CT.
- Nascimento, P. F. C., Nascimento, A. C., Rodrigues, C. S., Antonioli, Â. R., Santos, P. O., Júnior, A. M. B., & Trindade, R. C. (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: Uma abordagem multifatorial dos métodos. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 17(1), 108–113. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100020>
- National Center for Biotechnology Information. (2004). Hexacosane. Consultado abril 19, 2017, de

- <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/hexacosane#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2017a). 1-Hexadecanol. Consultado abril 19, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2682#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2017b). Salicylic acid. Consultado abril 18, 2017, de https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/salicylic_acid#section=Top
- National Center for Biotechnology Information. (2004a). Gamma-terpinene. Consultado janeiro 30, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7461#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2004b). l-Menthone. Consultado janeiro 29, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/l-MENTHONE#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2004c). Para-cymene. Consultado janeiro 30, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/p-cymene#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2005a). Beta-caryophyllene. Consultado janeiro 30, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-caryophyllene#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2005b). Carvacrol. Consultado janeiro 31, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10364#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2005c). Piperitone. Consultado janeiro 29, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6987#section=2D-Structure>

- National Center for Biotechnology Information. (2005d). Pulegone. Consultado janeiro 29, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6988>
- National Center for Biotechnology Information. (2014). Spathulenol. Consultado janeiro 29, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/522266#section=Top>
- National Center for Biotechnology Information. (2017). Urea. Consultado abril 18, 2017, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/urea#section=Top>
- National Toxicology Program. (2011). *Toxicology and carcinogenesis studies of pulegone (CAS No. 89-82-7) in F344/N rats and B6C3F1 mice (gavage studies)*. Consultado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921962>
- National Toxicology Program Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. (2006). *Appendix G Iccvam Recommended Het-Cam Test Method Protocol. Evaluation.* Consultado de https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/ocutox_docs/oteval/appg-508.pdf
- Neli Martín. (2017). *Artemia salina*. Consultado janeiro 29, 2017, de <http://www.zootecniadomestica.com/artemia-salina/>
- Nicolaus, C., Sievers-Engler, A., Murillo, R., D'Ambrosio, M., Lämmerhofer, M., & Merfort, I. (2016). Mastering analytical challenges for the characterization of pentacyclic triterpene mono- and diesters of *Calendula officinalis* flowers by non-aqueous C30 HPLC and hyphenation with APCI-QTOF-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *118*, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.025>
- Nikolić, M., Jovanović, K. K., Marković, T., Marković, D., Gligorijević, N., Radulović, S., & Soković, M. (2014). Chemical composition, antimicrobial, and cytotoxic properties of five Lamiaceae essential oils. *Industrial Crops and Products*, *61*, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.011>

- OECD SIDS. (2002). Glycerol. Consultado março 25, 2017, de <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/56815.pdf>
- Osés, S. M., Pascual-Maté, A., Fernández-Muiño, M. A., López-Díaz, T. M., & Sancho, M. T. (2015). Bioactive properties of honey with propolis. *Food Chemistry*, *196*, 1215–1223. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.050>
- Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., & Shimizu, M. T. (2001). Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses*, *44*(9–10), 375–378. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00671.x>
- Paksoy, M. Y., Diraz, E., Diğrak, M., Tutar, E., & Karaman, Ş. (2016). Essential oil composition and antimicrobial activity of two endemic *Kundmannia* SCOP. species from Turkey. *Industrial Crops and Products*, *79*, 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.10.027>
- Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. D. S., Tresvenzol, L. M. F., Vinaud, M. C., De Paula, J. R., & Paulo, N. M. (2011). Wound healing and anti-inflammatory effect in animal models of *Calendula officinalis* L. growing in Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2012*, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2012/375671>
- Pascoal, A., Rodrigues, S., Teixeira, A., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2014). Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*, *63*, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>
- Paye, M., Barel, A. O., & Maibach, H. I. (2009). Handbook of Cosmetic Science and Technology. In A. O. Barel (Ed.), *Handbook of Cosmetic Science and Technology* (third, pp. 221–228). New York: Informa Healthcare USA, Inc. <https://doi.org/10.1001/archderm.138.9.1262-a>
- PCL sales. (2013). Material safety data sheet. Consultado janeiro 29, 2017, de

www.potashcorp.com/media/POT_MSDS_35_Uran.pdf

- Pereira, L. J. B., & Garcia-Rojas, E. E. (2015). Emulsões múltiplas : formação e aplicação em microencapsulamento de componentes bioativos Multiple emulsions : formation and application in microencapsulation of bioactive components. *Ciência Rural*, Santa Maria, 45(1), 155–162. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140315>
- Petelinc, T., Polak, T., Demšar, L., & Jamnik, P. (2013). Fractionation of Phenolic Compounds Extracted from Propolis and Their Activity in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 8(2), e56104. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056104>
- Pina-Vaz, C., Rodrigues, A. G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., ... Martinez-de-Oliveira, J. (2004). Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. *European Academy of Dermatology and Venereology*, 18, 73–78.
- Pintea, A., Bele, C., Andrei, S., & Socaciu, C. (2003). HPLC analysis of carotenoids in four varieties of *Calendula officinalis* L. flowers. *Acta Biologica Szegediensis*, 47(1–4), 37–40.
- Pinto, S. (2012). *Caracterização química e propriedades antioxidantes de amostras de Lepista nuda (Bull.) obtidas por cultura in vitro e in vivo em diferentes habitats*. Instituto politécnico de Bragança.
- Pinto, S., Barros, L., Sousa, M. J., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). Chemical characterization and antioxidant properties of *Lepista nuda* fruiting bodies and mycelia obtained by *in vitro* culture: Effects of collection habitat and culture media. *Food Research International*, 51(2), 496–502. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.009>
- Polese, J. M. (2005). *The pocket guide to Mushrooms. The Alabama nurse* (2º, Vol. 32). Bloomsbury publishing. Consultado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21137584>

- Prestes, P., & Rigon, R. (2009). Avaliação da estabilidade físico-química de emulsão acrescida de uréia dispersada, ou não, em propilenoglicol. *Revista de Ciências Farmacologia Básica e Aplicada*. Consultado de http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewArticle/896
- Pyrganowska, J., Piechal, A., Blecharz-Klin, K., Joniec-Maciejak, I., Graikou, K., Chinou, I., & Widy-Tyszkiewicz, E. (2014). Long-term administration of Greek Royal Jelly improves spatial memory and influences the concentration of brain neurotransmitters in naturally aged Wistar male rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1), 343–51. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.032>
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
- Rapier, S., Breheret, S., Talou, T., Péliissier, Y., & Bessièrre, J.-M. (2002). The anise-like odor of *Clitocybe odora*, *Lentinellus cochleatus* and *Agaricus essettei*. *Mycologia*, 94(3), 373–6. Consultado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21156507>
- European Parliament And Of The Council, Regulamento (EC) nº 1223/2009 de 30 de novembro, Official Journal of the European Union , L 342/59
- Riley, D. S. (2012). *Calendula officinalis* L. (asteraceae): Aspectos botnicos, ecologicos e usos. *Visao Academica, Curitiba*, 13(1), 6–23. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25292-1_17
- Rodrigues, J. (2015). Fazer durar a maquilhagem e os cosmeticos. Consultado janeiro 29, 2017, de <http://orclub.blogspot.pt/2015/01/fazer-durar-maquilhagem-e-os-cosmeticos.html>
- Ruiz, M. a, Clares, B., Morales, M. E., Cazalla, S., & Gallardo, V. (2007). Preparation and stability of cosmetic formulations with an anti-aging peptide. *Journal of Cosmetic*

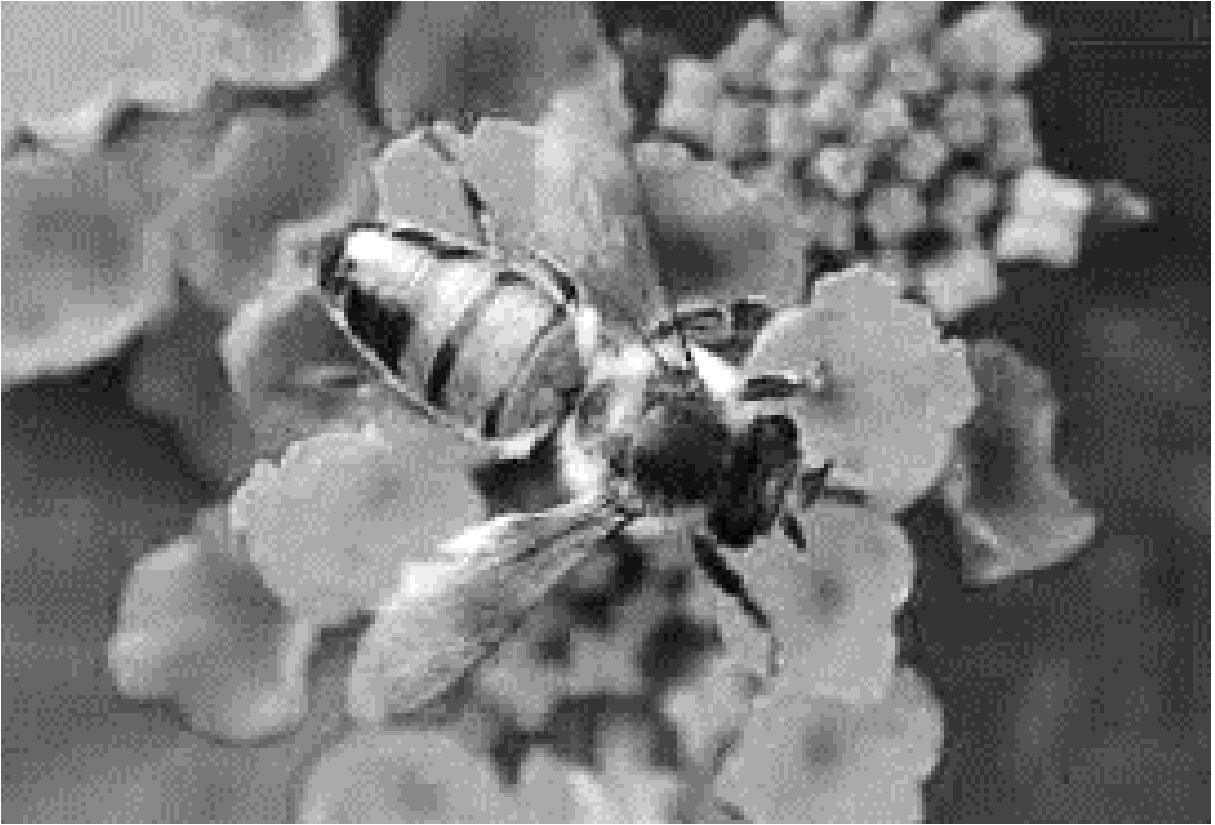
- Science*, 58(2), 157–71. https://doi.org/10.1111/j.1468-2494.2007.00401_4.x
- Salgueiro, L. (2007). Os tomilhos em portugal. In *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais. Curso Teórico-Prático* (3º, pp. 48–54). Lisboa: Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Santos, R. F., Isobe, M. T. C., Lalla, J. G., Haber, L. L., Marques, M. O. M., & Ming, L. C. (2012). Composição química e produtividade dos principais componentes do óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* DC. em função da adubação orgânica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14, 224–234. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000500017>
- Sattler, J. A. G., de Melo, I. L. P., Granato, D., Araújo, E., da Silva de Freitas, A., Barth, O. M., ... de Almeida-Muradian, L. B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil. *Food Research International*, 77, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>
- Savian, A. L., Varella, F. T., & Athayde, M. L. (2011). Desenvolvimento e avaliação preliminar da estabilidade de emulsão não-iônica O/A contendo óleo de café verde como potencializador de fator de proteção solar. *Revista Brasileira de Farmácia*, 91(2), 82–88.
- Scheel, J., Kleber, M., Kreutz, J., Lehringer, E., Mehling, A., Reisinger, K., & Steiling, W. (2011). Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59(3), 471–492. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.02.003>
- Science lab. (2013). Material safety data sheet glycerin. Consultado março 25, 2017, de <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9927350>

- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). (2015). The sccs's notes of guidance for the testing of cosmetic substances and their safety evaluation - 9th revision, (dezembro), 1–137. <https://doi.org/10.2772/47128>
- Silva, J. C., Rodrigues, S., Feás, X., & Estevinho, L. M. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 50(5), 1790–1795. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.02.097>
- Sivasubramanian, R., & Brindha, P. (2013). *In-vitro* cytotoxic, antioxidant and GC-MS studies on *Centratherum punctatum* Cass. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 364–367.
- Smaoui, S., Ben Hlima, H., Ben Chobba, I., & Kadri, A. (2013). Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. *Arabian Journal of Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.020>
- Smiljanic, K. (2015). Epiderme e suas formações. Consultado março 3, 2017, de http://katyabotanica.blogspot.pt/2015_03_01_archive.html
- Soković, M., Glamočlija, J., Marin, P. D., Brkić, D., & van Griensven, L. J. L. D. (2010). Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15(11), 7532–46. <https://doi.org/10.3390/molecules15117532>
- SRP. (2003). Urea. Consultado março 20, 2017, de <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+163>
- Staube, T., & Muller, C. (2016). How to do a proper cell culture quick check. Consultado março 19, 2017, de <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-do-a-proper-cell-culture-quick-check/>
- Tamura, S., Kono, T., Harada, C., Yamaguchi, K., & Moriyama, T. (2009). Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee *Apis*

- merifera*. *Food Chemistry*, *114*(4), 1491–1497.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.058>
- Tanideh, N., Tavakoli, P., Saghiri, M. A., Garcia-Godoy, F., Amanat, D., Tadbir, A. A., ... Tamadon, A. (2013). Healing acceleration in hamsters of oral mucositis induced by 5-fluorouracil with topical *Calendula officinalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, *115*(3), 332–338.
<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.08.450>
- Taofiq, O., González-Paramás, A. M., Martins, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics-A review. *Industrial Crops and Products*, *90*, 38–48.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.012>
- Tasdemir, D., Kaiser, M., Demirci, F., & Baser, K. H. C. (2006). Essential oil of Turkish *Origanum onites* L. and its main components, carvacrol and thymol show potent antiprotozoal activity without cytotoxicity. *Planta Medica*, *72*, 1006.
<https://doi.org/10.1055/S-2006-949877>
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Batista, I., Serrano, C., Matos, O., ... Nunes, M. L. (2012). European pennyroyal (*Mentha pulegium*) from Portugal: Chemical composition of essential oil and antioxidant and antimicrobial properties of extracts and essential oil. *Industrial Crops and Products*, *36*(1), 81–87.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.08.011>
- The good scents company. (2017a). Petrolatum. Consultado março 20, 2017, de <http://www.thegoodscentscopy.com/data/rw1302221.html>
- The good scents company. (2017b). Sweet almond oil. Consultado março 24, 2017, de <http://www.thegoodscentscopy.com/data/vg1010121.html>
- Thong, O. M., Chiew, S. P., Geethaa, S., & Thavamany, P. J. (2013). Interference from

- ordinarily used solvents in the outcomes of *Artemia salina* lethality test. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 4(4), 179–182. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.121411>
- Tobaldini-Valerio, F. K., Bonfim-Mendonça, P. S., Rosseto, H. C., Bruschi, M. L., Henriques, M., Negri, M., ... Svidzinski, T. I. (2016). Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiology*, 11(8), 1035–1046. <https://doi.org/10.2217/fmb-2015-0016>
- Trusheva, B., Trunkova, D., & Bankova, V. (2007). Different extraction methods of biologically active components from propolis: a preliminary study. *Chemistry Central Journal*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-1-13>
- Tudo saudável. (2017). Pólen de abelha. Consultado janeiro 29, 2017, de https://www.tudosaudavel.com/wp-content/uploads/2014/08/polen_de_abelha.jpg
- U.S. Food and Drug Administration. (2015). Water Activity (aw) in Foods. Consultado janeiro 30, 2017, de <https://www.fda.gov/iceci/inspections/inspectionguides/inspectiontechnicalguides/ucm072916.htm>
- U.S. Food and Drug Administration. (2016). Is It a Cosmetic, a Drug, or Both? (Or Is It Soap). Consultado junho 6, 2017, de <https://www.fda.gov/Cosmetics/GuidanceRegulation/LawsRegulations/ucm074201.htm#Both>
- Vaz, J. A., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Chemical composition of wild edible mushrooms and antioxidant properties of their water soluble polysaccharidic and ethanolic fractions. *Food Chemistry*, 126(2), 610–616. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.063>

- Vinardell, M. P. (2015). The use of non-animal alternatives in the safety evaluations of cosmetics ingredients by the Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 71(2), 198–204. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.12.018>
- WaitroseGarden. (2017). *Calendula officinalis*. Consultado janeiro 29, 2017, de http://www.waitrosegarden.com/plants/_/calendula-officinalis/classid.2000014837/
- Walters, K. A., & Brain, K. R. (2002). Dermatological and Transdermal Formulations. In Kenneth A. Walters (Ed.), *Dermatological Formulation and Transdermal Systems* (1st ed., pp. 319–400). New York: Informa Healthcare USA, Inc. Consultado de <http://books.google.co.id/books?id=4pycGojmdaoC>
- Wilson, S. L., Ahearne, M., & Hopkinson, A. (2015). An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.11.003>
- Wytrychowski, M., Chenavas, S., Daniele, G., Casabianca, H., Batteau, M., Guibert, S., & Brion, B. (2013). Physicochemical characterisation of French royal jelly: Comparison with commercial royal jellies and royal jellies produced through artificial bee-feeding. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(2), 126–133. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.12.002>
- Ziaei, A., Ramezani, M., Wright, L., Paetz, C., Schneider, B., & Amirghofran, Z. (2011). Identification of spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the immunomodulatory effects. *Phytotherapy Research*, 25(4), 557–562. <https://doi.org/10.1002/ptr.3289>



Anexos

7 Anexos

7.1 Composição do meio de cultura *Melin-Norkans* Modificado Incompleto (MMN incompleto)

Composto	Concentração (g/L)
NaCl	0,025
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,250
KH ₂ PO ₂	0,500
FeCl ₃	0,005
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,150
Tiamina	1,00 x 10 ⁻⁴
CaCl ₂	0,05
Glucose	10,0
Agar	20,0

7.2 Composição do meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Composto	Concentração (g/L)
PDA	39,0

7.3 Composição do meio de incubação de *Artemia salina* L.

Composto	Concentração (g/L)
Sal	2,00-2,20
MgSO ₄	1,30
CaCl ₂	0,30
KCl	0,20
NaHCO ₃	2,00
MgCl ₂	1,00

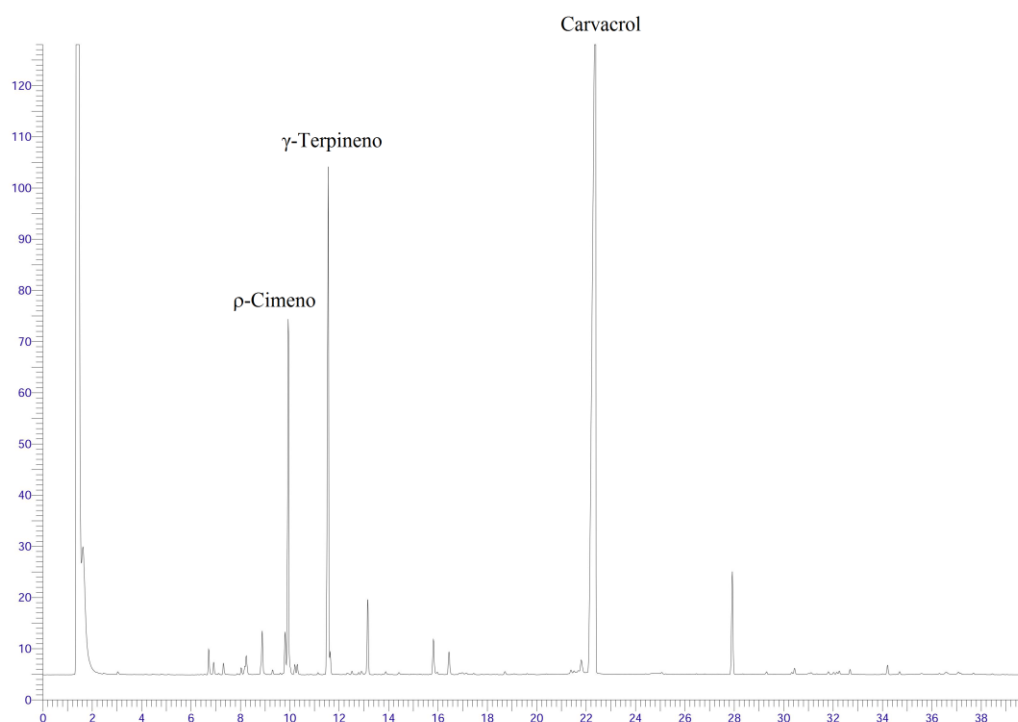
7.4 Composição do meio de crescimento bacteriano

Composto	Concentração (g/L)
Extrato de carne	3
Peptona	5
Agar	15

7.5 Composição do meio de crescimento de leveduras

Composto	Concentração (g/L)
Glucose	20
Extrato de levedura	5
Peptona	10
Agar	20

7.6 Espectro GC da análise de voláteis de *Thymus zygis subsp. zygis* obtido por destilação-extração com um aparato de LN



7.7 *Espectro GC da análise de voláteis de Mentha pulegium obtido por destilação-extração com um aparato de LN*

