



**Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho"  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Campus Araraquara**

**Trabalho de Conclusão de Curso**

**Desenvolvimento e Controle de Qualidade Físico e Microbiológico de  
Emulsão O/A Contendo Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia***

**Aluna:** Juliana Vendramini de Paula Oliveira

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Maria Virgínia Scarpa

Araraquara – SP

2011



"Júlio de Mesquita Filho" - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Juliana Vendramini de Paula Oliveira



**Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas**  
**Campus Araraquara**

**Desenvolvimento e Controle de Qualidade Físico e Microbiológico de  
Emulsão O/A Contendo Óleo Essencial de *Melaleuca alternifolia***

Juliana Vendramini de Paula Oliveira

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia Bioquímica apresentado ao Departamento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista - UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau em Farmácia-Bioquímica.

Orientadora : Profa. Dra.Maria Virgínia Scarpa

Araraquara – SP

2011



“Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Juliana Vendramini de Paula Oliveira

## DEDICATÓRIA

É com um profundo sentimento de gratidão, que eu dedico esse trabalho aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida e que me proporcionaram a oportunidade de iniciar e concluir esse sonho.

*“Sou eu que vou seguir você do primeiro rabisco até o be-a-bá,  
Em todos os desenhos coloridos vou estar...  
A casa, a montanha, duas nuvens no céu,  
E um sol a sorrir no papel....  
Sou eu que vou ser seu colega seus problemas ajudar a resolver,  
Te acompanhar nas provas bimestrais, você vai ver...  
Serei, de você, confidente fiel,  
Se seu pranto molhar meu papel...”*

**O Caderno - Toquinho**



## IN MEMÓRIAN

Em memória do meu querido avô Clóvis Vendramini, por me proporcionar os primeiros ensinamentos sobre a vida e inúmeras lembranças risonhas, que quando vêm à tona, sempre me roubam um sorriso dos lábios e uma lágrima dos olhos....

Eu sei que o senhor não está mais entre nós fisicamente, mas tenho certeza que esteve ao meu lado nos momentos mais difíceis desta jornada, auxiliando-me com sua luz e abençoando-me com seu carinho....

Muito obrigada “vozão”, onde estiver....

*“Naquela mesa ele sentava sempre  
E me dizia sempre o que é viver melhor  
Naquela mesa ele contava histórias  
Que hoje na memória eu guardo e sei de cor  
Naquela mesa ele juntava gente  
E contava contente o que fez de manhã  
E nos seus olhos era tanto brilho  
Que mais que seu filho  
Eu fiquei seu fã  
Eu não sabia que doía tanto  
Uma mesa num canto, uma casa e um jardim  
Se eu soubesse o quanto dói a vida  
Essa dor tão doída, não doía assim (...)  
Naquela mesa ta faltando ele  
E a saudade dele ta doendo em mim  
Naquela mesa tá faltando ele  
E a saudade dele tá doendo em mim”  
Naquela Mesa – Sérgio Bittencourt*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Pai do Céu por me dar a vida e por ter abençoando-me com uma família fantástica, pois sem eles eu não seria nada e nem chegaria até aqui, obrigada Mestre.

Agradeço à minha mãe por ter sido meu baluarte, minha referência de mulher, profissional e mãe. Agradeço por ter exigido sempre mais de mim, e me fazer enxergar que “mais ou menos não serve”. Agradeço por ter me ensinado sua disciplina, ética, retidão de caráter, bom gosto, profissionalismo, seu senso tão apurado de responsabilidade e comprometimento, e principalmente a superação frente às dificuldades da vida (“Levanta, sacode a poeira e dá volta por cima”). Muito obrigada pela paciência e pelo carinho em meus piores momentos de tristeza e pessimismo, alimentando minha alma com as palavras de Deus. Muito obrigado por me salvar da morte duas vezes. Eu realmente não sei o que seria de mim se não houvesse você em minha vida.

Agradeço ao meu pai, por ter sido meu chão, meu “patrocinador oficial”, por ter vencido um câncer por mim e por me resgatar da morte. Por estar sempre me dando a oportunidade de sonhar e acreditar que o “mundo me pertence” e por me ensinar que a paciência e a ressonância humana são essenciais para que se chegue à algum lugar. Muito obrigado pai, por nunca se furtar à estar do meu lado e fazer o possível e o impossível pra que eu conseguisse concluir esse sonho.



Agradeço à minha avó Nair, querida, que me amparou em seus braços dos meus primeiros tombos, em meus primeiros passos, que nunca se esquece de mim em suas orações e que me ensinou que um pedaço de pão quentinho também é uma forma de carinho.

Agradeço ao Johnny, que esteve ao meu lado durante boa parte da realização desse trabalho, ajudando-me à superar as dificuldades pessoais, convencendo-me de que eu seria capaz de fazê-lo, auxiliando-me com seu amor, carinho, compreensão e companheirismo. Muito obrigada, por ter tido coragem de “juntar seus problemas com os meus” para que conseguíssemos resolvê-los juntos, e ainda que não estivemos juntos, as boas lembranças permanecerão para sempre.

Agradeço à Helena e à Marlene todas as orações que fizeram por mim e o apoio me dado nesses anos de convivência e de amizade. Meninas dos olhos de Deus, que sejam abençoadas à cada dia mais e mais, porque vocês são presente Dele na terra, amo muito vocês, obrigada por tudo!

Agradeço aos meus professores, mestres, que me incentivaram e me fizeram acreditar que era possível, eu, chegar até aqui.

Agradeço à Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, por ter aceitado ser minha orientadora, e por todas as vezes que me auxiliou com suas palavras de incentivo e carinho para que eu não desistisse do trabalho e acreditasse em meu potencial. Muito obrigada “Próóóf”!!!!



Agradeço muito a ajuda valiosa da Profa. Dra. Rosemeire Pietro por ceder o laboratório de Biotecnologia, os materiais e os equipamentos que fossem necessários para a realização dos experimentos microbiológicos, e que sempre se mostrou solícita à tirar as dúvidas que surgissem durante a execução do trabalho e com os resultados obtidos. Muito obrigada.

Agradeço imensamente o apoio e ajuda do Prof. Dr. Marcos Antônio Corrêa na elaboração da formulação e por ceder diversas vezes o espaço do laboratório de Cosmetologia e as matérias-primas necessárias utilizadas na preparação de todas as amostras utilizadas nos experimentos. Muito obrigada professor, principalmente pelas diversas vezes que pacientemente ouviu minhas lamentações e medos, mas com muito carinho, sempre me trouxe palavras de incentivo, ânimo e estratégias inteligentes para solução dos problemas. Posso me orgulhar em dizer que ganhei um amigo verdadeiro, que acreditou em mim e me ajudou a conseguir meu primeiro emprego, jamais esquecerei-me de você. “Valeu Próóóó”!!!!

Agradeço à Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Vera Isaac que cedeu o equipamento Reômetro de oscilação HAAKE, modelo RHEOSTRESS RS-1, para que eu utilizasse neste trabalho e fizesse os experimentos necessários.

Agradeço à Flávia Lima Ribeiro Maccari, que esteve presente em absolutamente todas as etapas desse trabalho, desde a idéia inicial, redação do projeto, execução dos ensaios e análise dos resultados. Muito Obrigada por ter se tornado mais que uma “mestranda-professora”, se tornou uma amiga verdadeira que não me deixou desistir do trabalho e nem de mim mesma.



Agradeço ao técnico do laboratório de Biotecnologia, Rodrigo que me auxiliou dia após dia nos ensaios microbiológicos e que com sua paciência e meticulosidade fez com que o trabalho fosse muito bem executado. “Rô”, “obrigadão” pela paciência e boa vontade comigo.

Agradeço à técnica do laboratório de Controle de Qualidade, Fátima que ministrou o Estágio de Treinamento me ensinando as atividades básicas do laboratório e que sempre proporcionou o ambiente do laboratório muito eficiente pela organização, e agradável pelo seu bom humor e disposição em ajudar.

Agradeço aos meus amigos da graduação, “Du”, “Paulinha”, “Laranja” e “Beto” que fizeram desses seis anos de faculdade menos maçantes e mais divertidos.

Agradeço aos funcionários da Unesp por proporcionar com seu trabalho e dedicação um ambiente propício para esse trabalho.





## **“Veni, vidi, vici” – Júlio César – Imperador Romano**

*“Ouça-me bem, amor*

*Preste atenção, o mundo é um moinho*

*Vai triturar teus sonhos, no caminho.*

*Vai reduzir tuas ilusões a pó...”*

**O Mundo é Um Moinho -Cartola**

*“Ando devagar, porque já tive pressa,*

*E levo esse sorriso, porque já chorei demais....*

*Hoje me sinto mais forte,*

*Mais feliz, quem sabe?!*

*E só levo a certeza,*

*De que muito pouco sei, eu nada sei...”.*

**Tocando em Frente – Almir Sater**



# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1	EMULSÕES.....	19
1.1.1	<i>Conceito.....</i>	19
1.1.2	<i>Tipos de Emulsão .....</i>	21
1.1.3	<i>Processo de Formação de Emulsão .....</i>	21
1.2	GEL.....	23
1.2.1	<i>Polímero do Carbômero 940.....</i>	26
1.3	ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004).....	28
1.4	REOLOGIA.....	29
1.5	FUNGOS .....	36
1.5.1	<i>Trichophyton rubrum.....</i>	37
1.5.2	<i>Micoses Superficiais .....</i>	38
1.5.3	<i>Tratamento .....</i>	42
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>43</b>
2.1	MELALEUCA ALTERNIFOLIA.....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAISE MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
3.1	MATERIAIS .....	48
3.1.1	<i>Solventes, Reagentes, Matérias-Primas e Meios de Cultura.....</i>	48
3.1.2	<i>Equipamentos e Softwares .....</i>	49
3.1.3	<i>Microrganismo .....</i>	50



3.2	MÉTODOS .....	50
3.2.1	<i>Análise da Atividade Antimicrobiana</i> .....	50
3.2.1.1	Preparo e diluição dos antifúngicos .....	50
3.2.1.2	Diluição do TTO .....	51
3.2.1.3	Preparo do Meio de cultura Batata Dextrose .....	51
3.2.1.4	Preparo do Meio RPMI 1640 .....	52
3.2.1.5	Preparo do Inóculo .....	53
3.2.1.6	Aplicação do inóculo em microplaca para o TTO.....	53
3.2.1.7	Determinação da Concentração InibitóriaMínima (CIM) .....	55
3.2.1.8	Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) .....	56
3.2.1.9	Preparo das formulações .....	57
3.2.1.9.1	Difusão em ágar .....	58
3.2.2	<i>Análise Físico-Química</i> .....	60
3.2.2.1	Estabilidade Preliminar.....	60
3.2.2.2	Centrifugação .....	61
3.2.2.3	Características organolépticas .....	62
3.2.2.4	pH .....	62
3.2.2.5	Viscosidade aparente .....	62
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>63</b>
4.1	OBJETIVO GERAL .....	63
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	63
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>64</b>
5.1	ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	64



5.1.1	<i>Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Determinação da Concentração Mínima Fungicida (CFM) do TTO</i> .....	64
5.1.2	<i>Difusão em ágar</i> .....	66
5.2	PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO .....	69
5.3	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA .....	71
5.3.1	<i>Estabilidade Preliminar</i> .....	71
5.3.1.1	Centrifugação .....	72
5.3.1.2	Características organolépticas .....	73
5.3.1.3	pH .....	74
5.3.1.4	Viscosidade Aparente .....	79
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>85</b>



## RESUMO

Sabe-se que na atualidade, é grande a preocupação da comunidade científica mundial, em relação à resistência microbiana frente às substâncias convencionais, utilizadas indiscriminadamente, por isso, é crescente a motivação da pesquisa básica na bioprospecção de novas substâncias, que apresentem atividade antimicrobiana e antifúngica e que possam ser uma alternativa segura e eficaz contra esses microorganismos no tratamento das doenças causadas por eles. As dermatofitoses, por exemplo, são processos infecciosos de pele, pêlo e unhas que acometem muitas pessoas, de todas as faixas etárias, no mundo todo, provocando as chamadas tinhas ou tineas, denominadas corporis, pedis, cruris, capitis, unguium(onicomicose) e outras (dependendo o local do corpo onde estão), causadas pelo dermatófito filamentosso, *Trichophyton rubrum*. Estudos envolvendo este patógeno são cada vez mais importantes, devido ao aparecimento de linhagens resistentes aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado, e ao comportamento invasivo deste agente em pacientes com o sistema imune comprometido. Porém, somente a descoberta de novas drogas não é suficiente, é preciso desenvolver produtos eficazes e seguros, que possam veicular essas substâncias sem causar prejuízo ao paciente. Sendo assim, a proposta desse trabalho é desenvolver uma emulsão A/O, contendo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO), verificar sua estabilidade preliminar e caracterizá-la realizando o estudo reológico da formulação, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do TTO e averiguar a atividade antifúngica in vitro da emulsão frente ao *T. rubrum*, agente patogênico ao qual se destina o uso do produto.

**Palavras-chave:** *T. rubrum*, tineas, *Melaleuca alternifolia*, TTO.



## ABSTRACT

It is known that nowadays, there is a great concern of the international scientific community in relation to microbial resistance in the face of conventional substances, used indiscriminately, so it is increasing the motivation of basic research in bioprospecting of new substances, which have antimicrobial activity and antifungal and can be safe and effective against these microorganisms in the treatment of diseases caused by them. Dermatophytosis, for example, infectious processes are skin, hair and nails that affects many people of all ages, worldwide, causing these so-called tinea corporis, pedis, cruris, unguium, and other capitis (depending on the location of the body where they are) caused by dermatophyte filamentous, *Trichophyton rubrum*. Studies involving this pathogen, are increasingly important due to emerging resistance to antifungal drugs available, and the invasive behavior of this agent in patients with compromised immune systems. However, only the discovery of new drugs is not enough, we must develop effective and safe products that can serve these substances without harming the patient, so the purpose of this study is to develop a W/O emulsion containing essential oil *Melaleuca alternifolia* (TTO), determine its primary stability and to characterize it by performing the rheological behavior of the formulation, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicidal concentration (MFC) of TTO and to investigate the antifungal activity in vitro against the emulsion *T. rubrum*, the pathogenic agent to which the intended use of the product.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática da formação de uma emulsão .....	22
<b>Figura 2</b> - Monômero do polímero .....	27
<b>Figura 3</b> - Polímero: (A) – estado 1, (B) – estado 2, (C) – estado 3 .....	27
<b>Figura 4</b> -Classificação dos Fluidos segundo seu comportamento reológico .....	31
<b>Figura 5</b> - Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido .....	31
<b>Figura 6</b> -(a) Curvas de fluxo para diferentes tipos de comportamento reológico. (A) pseudoplástico; (B) plástico; (C) dilatante; (D) newtoniano; (- - - -) comportamento newtoniano extrapolado. (b) Curvas de viscosidade correspondentes às curvas de fluxo .....	32
<b>Figura 7</b> - Curva de fluxo, demonstrativo da tixotropia e área de histerese (área hachurada em cinza).....	33
<b>Figura 8</b> - Colônia do T. rubrum.....	37
<b>Figura 9</b> - Hifas do T. rubrum septadas com microconídios - visão microscópica.....	38
<b>Figura 10</b> - (a)Dermatofitose extensa - Tineacorporisem paciente; (b)Onicomicose branca superficial - Tineaunguium em paciente .....	39
<b>Figura 11</b> - (a) Flores do arbusto da Melaleuca alternifolia, (b) Fotografia do arbusto da Melaleuca alternifolia.....	44
<b>Figura 12</b> - Estrutura química do terpinen-4-ol .....	45
<b>Figura 13</b> -Esquema da microplaca utilizada no ensaio de CIM.....	54



<b>Figura 14</b> - Placa de Petri demarcada com os poços da microplaca .....	56
<b>Figura 15</b> - (a) Esquema da execução do experimento de Difusão em Ágar, onde nos poços A1, A2 e A3 foram colocadas as amostras da emulsão (gel-creme) com diferentes concentrações de TTO adicionado de conservante e outras amostras com TTO e sem conservante. O poço denominado Pconteve amostra placebo sem TTO e sem conservante.(b)Fotografia do ensaio realizado, seguindo o esquema descrito .....	60
<b>Figura 16</b> - (A) Placa de microdiluição revelada com resazurina, para determinar a CIM; (B1) Placa de Petri de onde foram aferidos os resultados de CFM; (B2) A mesma placa, comesquema da microplaca ao fundo.....	64
<b>Figura 17</b> - (a) (b) Fotografia dos ensaios feitos com as amostras contendo TTO e conservante, dispostas conforme esquema demonstrado na figura 15 .....	66
<b>Figura 18</b> - (a) (b)Fotografia dos ensaios feitos com as amostras contendo TTO e sem conservante, dispostas conforme esquema demonstrado na figura 15. ....	67
<b>Figura 19</b> - Acondicionamento das amostras em potes.....	71
<b>Figura 20</b> - Acondicionamento das amostras em bisnaga de alumínio, sendo: (a) [TTO] de 0,125%; (b) [TTO] de 0,625% e (c) [TTO] de 0,250%. ....	71
<b>Figura 21</b> – Fotografia das amostras (a) 125%, (b) 0,0625% e (c) 0,250% de TTO que foram submetidas à centrifugação logo após serem produzidas.....	72
<b>Figura 22</b> - Aspecto inicial das amostras no 1º dia de estabilidade preliminar. ....	73
<b>Figura 23</b> -(a) Amostra contendo 0,250% de TTO que sofreu mudança nas características organolépticas; (b) comparação da amostra citada em (a) com a amostra contendo 0,250% de TTO submetida à temperatura ambiente.....	74





<b>Figura 24</b> - Gráfico obtido à partir das médias dos valores de pH expostos na Tabela 10 .....	78
<b>Figura 25</b> - Gráfico representativo das variações de viscosidade das amostras. ....	80
<b>Figura 26</b> - Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,125%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abcissas: taxa de cisalhamento [1/s] .....	82
<b>Figura 27</b> -Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,0625%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abcissas: taxa de cisalhamento [1/s] .....	82
<b>Figura 28</b> - Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,250%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abcissas: taxa de cisalhamento [1/s] .....	83



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais componentes do óleo essencial de <i>M. alternifolia</i> .....	46
<b>Tabela 2</b> - Componentes da formulação proposta de emulsão tipo gel-creme .....	58
<b>Tabela 3</b> - Média das concentrações do ensaio realizado em triplicata em comparação com as concentrações do padrão negativo utilizado .....	65
<b>Tabela 4</b> - Valores e médias dos halos de inibição do crescimento de <i>T. rubrum</i> com as amostras contendo conservante e diferentes concentrações de TTO .....	66
<b>Tabela 5</b> - Valores e médias dos halos de inibição do crescimento de <i>T. rubrum</i> com as amostras sem conservante e contendo diferentes concentrações de TTO.....	67
<b>Tabela 6</b> - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,125% .....	75
<b>Tabela 7</b> - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,0625% .....	76
<b>Tabela 8</b> - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,250% .....	77
<b>Tabela 9</b> - Média dos valores de pH obtidos na estabilidade preliminar .....	78
<b>Tabela 10</b> - Valores de viscosidade aparente no teste de estabilidade preliminar, referente às formulações com as [TTO] 0,125%, 0,0625% e 0,250%.....	80



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Água

AI- Análise Inicial

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHT- butilhitroxitolueno

CO<sub>2</sub>- Gás Carbônico

J- Fluxo

NaOH- Hidróxido de Sódio

O- Óleo

OMS- Organização Mundial da Saúde

pH- Potencial Hidrogeniônico

PM- Peso Molecular

TA- Temperatura Ambiente

TTO- óleo essencial de Melaleuca alternifolia

T. rubrum- Trichophyton rubrum

$\eta$ - Viscosidade Aparente

[TTO] – concentração de óleo de Melaleuca alternifolia



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EMULSÕES

### 1.1.1 Conceito

Emulsões são sistemas dispersos contendo pelo menos duas fases líquidas imiscíveis entre si, geralmente uma fase oleosa e outra fase aquosa, onde uma das fases está totalmente dispersa como gotículas na outra fase, (GENNARO et al, 2004). A fase que está dispersa é denominada fase interna ou fase descontínua, enquanto a fase na qual o líquido está disperso é denominada fase dispersante, fase externa ou fase contínua (ANSEL et al, 2007).

São sistemas termodinamicamente instáveis, tendendo a separar-se uma vez cessada a força aplicada para obter a dispersão, sendo por esse motivo necessária uma terceira fase denominada fase emulsionante, adicionada ao sistema a fim de minimizar a tendência de separação das fases e estabilizando o mesmo, (GENNARO et al, 2004).



### 1.1.2 Tipos de Emulsão

Uma emulsão em que a fase dispersa corresponde à fase oleosa, enquanto a fase dispersante constitui a fase aquosa é classificada como uma emulsão do tipo óleo em água (O/A). Uma emulsão em que a fase dispersa corresponde à fase aquosa, enquanto a fase dispersante constitui a fase oleosa é classificada como uma emulsão do tipo água em óleo ou A/O, (GENNARO et al, 2004).

Há ainda sistemas conhecidos como emulsões múltiplas, onde gotículas de fase aquosa estão dispersas em gotículas maiores de fase oleosa, que por sua vez, estão dispersas em uma fase dispersante aquosa formando emulsões tipo A/O/A, ou gotículas de fase oleosa que estão dispersas em gotículas maiores de fase aquosa, que por sua vez, estão dispersas em uma fase dispersante oleosa formando emulsões do tipo O/A/O, (AULTON, 2005).

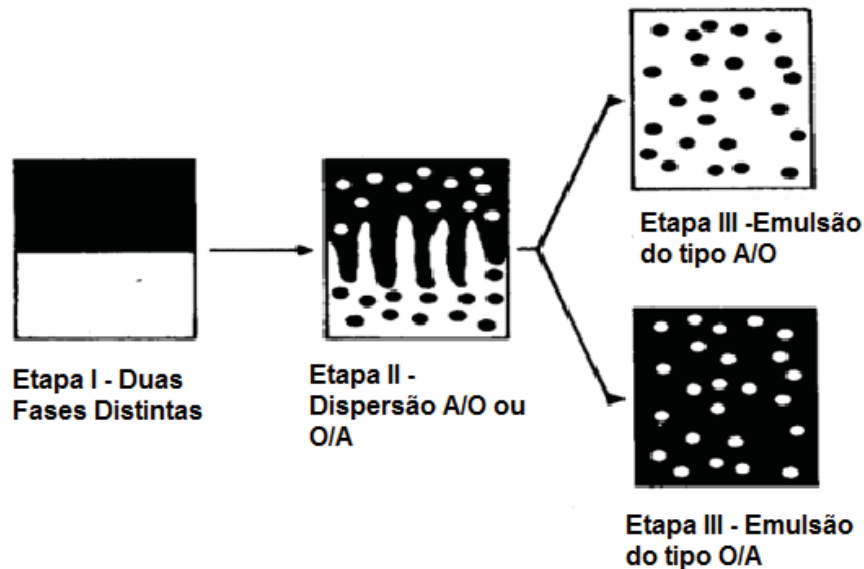
### 1.1.3 Processo de Formação de Emulsão

Na interface de duas fases líquidas imiscíveis moléculas da fase aquosa são ao mesmo tempo atraídas pela fase aquosa e repelidas pela fase oleosa e vice-versa (LACHMAN et al, 2001).

Ao fornecer energia mecânica suficiente a um sistema formado por duas fases líquidas imiscíveis, há uma conturbação na interface das fases, que se expandem até formarem-se digitações ou filamentos de uma das fases que passa por dentro da outra fase e vice-versa. Como os filamentos formados são instáveis, assumem o formato de gotas que se separam tornando-se esféricas como demonstrado na figura 1.



Dependendo ainda da quantidade de energia fornecida, gotículas maiores são também deformadas em pequenos filamentos que vão produzir gotículas ainda menores, (GENNARO et al, 2004).



**Figura 1 - Representação esquemática da formação de uma emulsão**  
 Fonte: Adaptado de BARBOSA e MINETOMA, 2001

Todos os líquidos tendem a assumir a forma que produz a menor área interfacial exposta, que corresponde a uma esfera, e por isso a tendência à formação de gotículas esféricas, que por sua vez, apresentam forças internas que resistem à distorção da esfera.

Como na dispersão de duas fases imiscíveis, há um grande aumento na área de contato interfacial, a quantidade de energia fornecida para obtenção da dispersão traduz-se por elevação da energia livre de superfície deixando o sistema termodinamicamente instável, (ANSEL et al, 2007).



A reunião de duas ou mais gotas produz uma gota maior cuja área superficial é menor que a soma das áreas superficiais das gotículas anteriores, com a conseqüente redução da energia livre de superfície. Daí a tendência, das gotículas reunirem-se em gotículas cada vez maiores, após cessado o fornecimento de energia que mantém a fase dispersa na forma de gotículas, até que aconteça a separação total das fases,(ANSEL et al, 2007).

A adição de um agente emulsionante capaz de reduzir a tensão interfacial das gotículas, que pode reduzir a coalescência das gotículas a níveis insignificantes, reduzindo a instabilidade termodinâmica das emulsões que podem permanecer estáveis por longos períodos, (GENNARO et al, 2004).

## 1.2 GEL

Géis são sistemas semi-sólidos que consistem na dispersão de moléculas grandes ou pequenas em veículo líquido que adquire consistência semelhante à gelatina por ação de uma substância nele adicionada, como a carboximetilcelulose (ANSEL et al., 2007).

Existem duas classes de géis: os hidrofóbicos, sendo que, as bases são oleogéis ou geralmente de parafina líquida com polietileno ou ainda óleos gordurosos gelificados com sílica coloidal, sabões de alumínio ou zinco, e géis hidrofílicos (hidrossolúveis ou hidrogéis), sendo a constituição de água, glicerol ou propilenoglicol gelificado com agentes gelificantes adequados como: adraganto, amido, celulose e seus derivados, polímeros de carboxivinil e silicatos de magnésio-alumínio (GENNARO, 2004).



Os géis hidrossolúveis têm sido grandemente utilizados em produtos cosméticos e como base dermatológica, pois apresentam fácil espalhamento, não são gordurosos e podem veicular princípios ativos. Geralmente, as substâncias formadoras de géis são polímeros que quando dispersos em meio aquoso, assumem a conformação doadora de viscosidade à formulação. Polímeros são substâncias de alto peso molecular, também chamados de macromoléculas (CORRÊA et al., 2005).

O tipo de polímero empregado na formulação do gel pode influenciar o comportamento reológico e influenciar a estabilidade física do produto, assim como o seu comportamento sobre a pele (em nível de liberação do ativo pelo veículo e formação de filme na pele) (CORRÊA et al., 2005).

É recente (à menos de 50 anos) a preocupação de pesquisadores acerca dos estudos sobre as macromoléculas, porém seu uso têm sido vertiginoso.

São observados vários polímeros constituindo produtos como géis de aplicação cosmética e farmacêutica, puros ou em uma emulsão (como o gel-creme) e conquistaram este espaço e preferência por características como: fácil espalhamento, sensorial agradável e refrescante sem o tato gorduroso e não apresenta ação comedogênica como também podem transportar inúmeros princípios ativos (hidrossolúveis, lipossolúveis), são vetores e carreadores de fármacos como lipossomas e nanopartículas. Podem ser indicados para pessoas com pele oleosa e mista (CORRÊA et al., 2005; FLORENCE & ATHWOOD, 2003).





Existe grande variedade de matérias-primas disponíveis para a preparação de géis e a seleção adequada para o desenvolvimento destas formulações, baseia-se nos requisitos necessários para a estabilidade, liberação e eficácia do ativo que eventualmente será incorporado na preparação.

Partindo do pressuposto que o fármaco não se liga ao polímero, tais géis liberam bem o fármaco. Os poros permitem a difusão relativamente livre de moléculas menores (AULTON, 2005).

Gennaro (2004) também diz que os géis muitas vezes proporcionam uma liberação mais rápida da droga, independentemente da solubilidade da droga em água, quando comparados com os cremes e pomadas.

A formulação semi-sólida gel é muito utilizada, devido seu comportamento reológico, os semi-sólidos (cremes, gel-creme, pomada, pasta, gel) aderem à superfície de aplicação por períodos suficientemente longos até serem removidos. Essa propriedade prolonga a liberação do medicamento no local de aplicação, apresenta facilidade de aplicação e aumenta a variedade de moléculas medicamentosas que podem ser liberadas por esse veículo (GUPTA & GARG, 2002).



### 1.2.1 Polímero do Carbômero 940

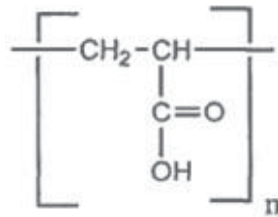
Carbômero é um polímero do ácido acrílico, de alto peso molecular (CORRÊA et al., 2005; BONACUCCINA et al., 2004). É um dos espessantes mais utilizados em fase aquosa. Tem sido usado em inúmeras formulações farmacêuticas líquidas e semi-sólidas como géis, géis-creme, suspensões, emulsões e como modificador reológico (BONACUCINA et al., 2004).

Os carbômeros são fornecidos na forma pulverizada, como ácido livre. Após a dispersão em meio aquoso, os grupamentos ácidos desses polímeros são neutralizados com uma base, produzindo sistemas gelificados de elevada viscosidade. São mais estáveis e menos suscetíveis à degradação microbiológica que a maior parte das gomas (THOMPSON et al., 2006).

Estudos mostram que os polímeros de carbômero também apresentam relevante propriedade mucoadesiva e assim são usados em formulações de uso oftálmico, retal, bucal, nasal, vaginal e preparações tópicas (BONACUCINA et al., 2004).

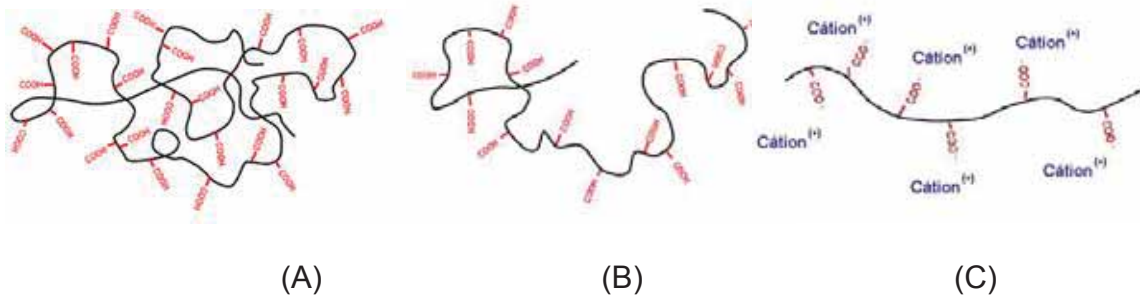
O carbômero 940 é preferido por resultar em um gel cristalino, brilhante sendo aquoso ou hidroalcoólico. Apresenta maior efeito espessante dentre as resinas de carbômeros. Quando dispersa em água, a resina, entumesce e forma uma dispersão aquosa (resina/água) com pH na faixa de 2,8-3,2. Neste estado pré-dissolvido, a molécula do carbômero está totalmente enovelada e sua capacidade como espessante é limitada (FERREIRA, 2000). Para obter o espessamento é necessária a neutralização com bases inorgânicas, como o hidróxido de sódio (NaOH) ou bases orgânicas de baixo peso molecular, como a trietanolamina (CORRÊA et al., 2005; FERREIRA, 2000).





**Figura 2 - Monômero do polímero**

Fonte: <http://www.volp.com.br/br/informativo/ACRYPOLET-2020>



**Figura 3 - Polímero: (A) – estado 1, (B) – estado 2, (C) – estado 3**  
 Fonte: <http://www.volp.com.br/br/informativo/ACRYPOLET-2020>

A figura 3 demonstra as três fases que o polímero passa, quando o mesmo é neutralizado. Em (A) observa-se o polímero ainda em pó, totalmente enovelado e compactado, antes do contato com a água e ainda possui ligações cruzadas, já em (B) observa-se o polímero já disperso em água, sendo o início do desenovelamento e finalmente em (C) o polímero é neutralizado com uma base (NaOH ou trietanolamina) nesse processo há o aparecimento de cargas negativas ao longo da estrutura, sendo assim a força de repulsão que é gerada que desenovela totalmente o polímero, e aumenta sua viscosidade.



Géis de carbômero são bem documentados e aprovados para uso farmacêuticos em diferentes tipos de administração. O uso tópico de géis é vantajoso, pois como eles apresentam bom comportamento reológico permanece maior tempo no local de administração. Por isso, eles também representam boa alternativa para formulações de unguentos à base de óleos essenciais. São hidrogéis aniônicos com boa capacidade tamponante, o que pode contribuir para manter o pH desejável (MERCILIN et al., 2004).

### 1.3 ESTABILIDADE PRELIMINAR (BRASIL, 2004)

A estabilidade preliminar foi realizada, conforme está descrita no “Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos” da série Temática de 2004, elaborado pela ANVISA.

Para o desenvolvimento de emulsões, além do aspecto macroscópico da formulação, é fundamental o conhecimento das propriedades físicas e da estabilidade (MOSTEFA et. al., 2006). As principais ocorrências de instabilidade de uma emulsão são: coalescência, cremeação e floculação. Alguns fatores causam instabilidade como: tensoativo utilizado na fórmula, viscosidade, pH, processo de fabricação e a velocidade da agitação (BREUER, 1985); bem como: luz, temperatura, exposição ao ar e outros fatores externos.



O Guia já mencionado preconiza que este estudo seja feito por 15 dias consecutivos, avaliando características organolépticas (cor, odor e aspecto macroscópico) e características físicas (viscosidade e pH) das formulações que são submetidas às condições extremas, com o objetivo de acelerar possíveis reações entre os constituintes da fórmula e o princípio ativo e observar como é o comportamento de alguns parâmetros frente às condições drásticas propostas (BRASIL, 2004).

#### 1.4 REOLOGIA

A reologia poder ser caracterizada pela “resistência do fluido ao fluxo ou ao movimento”, utilizada para caracterizar sistemas, é de fundamental importância para a elaboração, desenvolvimento e avaliação de produtos tanto cosméticos como farmacêuticos (AULTON, 2005; CHIEN, 2001).

Pode ser descrita também como, o estudo do comportamento deformacional e do fluxo de matéria, que é submetida a diferentes tensões, sob determinadas condições termodinâmicas ao longo de um intervalo de tempo. Inclui propriedades como: elasticidade, viscosidade e plasticidade (BAILEY, 1998).



A correta interpretação dos dados obtidos neste tipo de análise permite relacionar a qualidade de um sistema emulsionado, podendo prever a possibilidade de separação de fases, instabilidade quanto à estocagem, armazenamento e transporte e possíveis problemas relacionados ao processo de fabricação e aceitação do produto pelo consumidor (SCHRAMM, 1998). Considerar a temperatura durante a análise é de fundamental importância, pois pequenas variações deste parâmetro podem ocasionar resultados bastante discrepantes (TADROS, 2004; BARRY, 1993).

O comportamento reológico pode ser classificado como viscoso ou elástico, dependendo das condições de tensão aplicada, taxa de cisalhamento ou tempo. A viscosidade pode ser definida pela resistência à qualquer alteração de seus elementos (deformação) e a elasticidade é a capacidade que uma substância tem de retornar ao seu estado inicial depois da deformação, após cessada a tensão de cisalhamento (SCHRAMM, 1998).

Na reologia, os fluidos são classificados em dois tipos: os Newtonianos; onde a viscosidade não varia com a taxa de cisalhamento; e os não-Newtonianos que a viscosidade varia com a taxa de cisalhamento e apresenta resultados característicos, sendo assim, eles tem uma subclassificação como descrita na figura 4, abaixo.



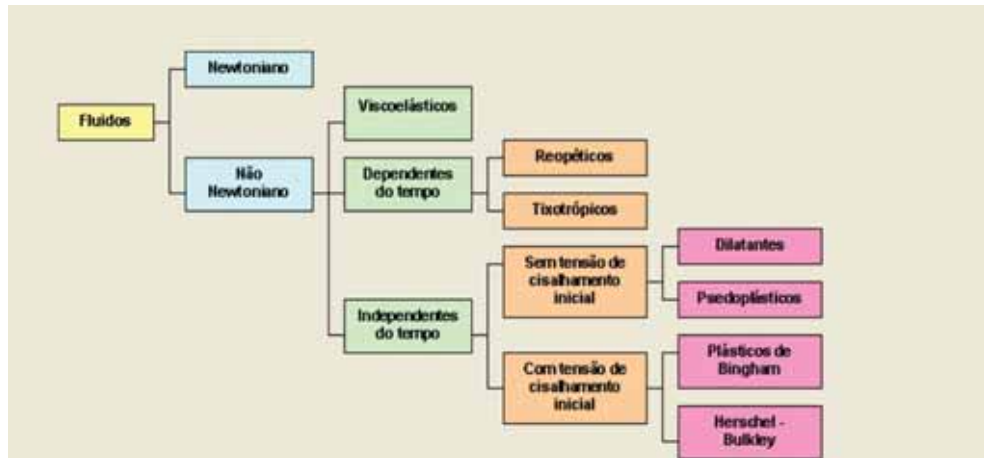


Figura 4 -Classificação dos Fluidos segundo seu comportamento reológico

Fonte: [http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cla\\_ssi.htm](http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cla_ssi.htm)

A grande maioria das formulações semi-sólidas farmacêuticas e cosméticas apresentam característica de fluxo não-Newtoniano e pseudoplástico. A figura 5, apresenta a força de cisalhamento e como é o comportamento do fluxo em diferentes velocidades.

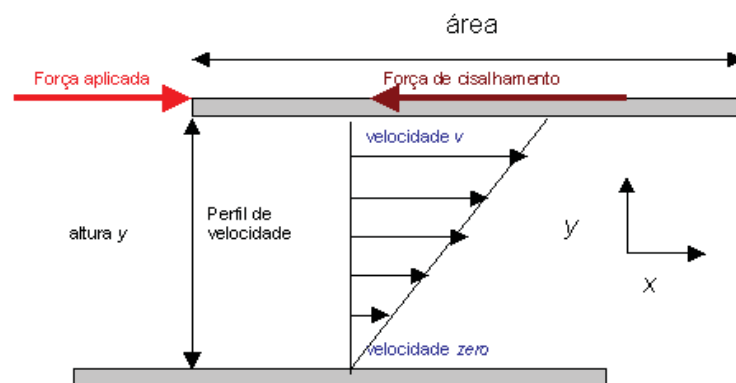
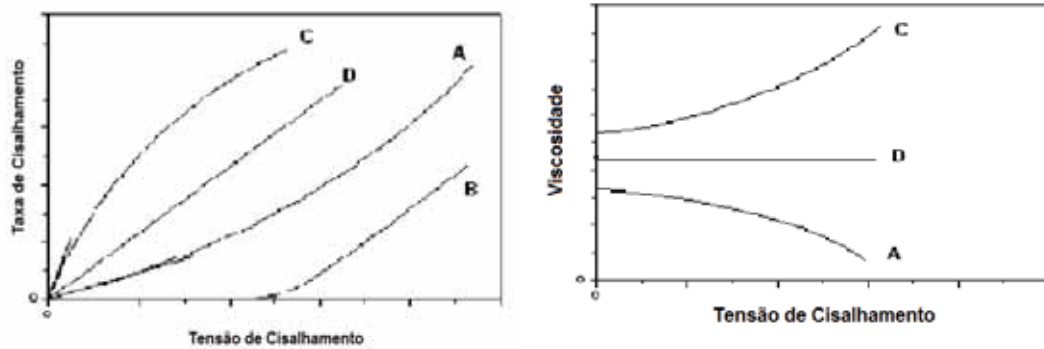


Figura 5 - Força de cisalhamento aplicada sobre um fluido

Fonte: [http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cisa\\_figu.htm](http://www.setor1.com.br/analises/reologia/cisa_figu.htm)



O gráfico da figura 6 demonstra os comportamentos reológicos dos fluidos Newtonianos e dos não-Newtonianos independentes do tempo.



(a) (b)

**Figura 6 - (a) Curvas de fluxo para diferentes tipos de comportamento reológico. (A) pseudoplástico; (B) plástico; (C) dilatante; (D) newtoniano; (- - -) comportamento newtoniano extrapolado. (b) Curvas de viscosidade correspondentes às curvas de fluxo**

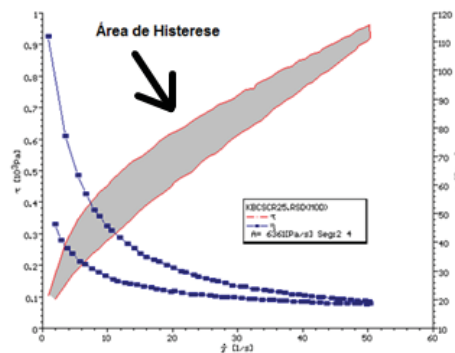
**Fonte:** Adaptado de SHAW, 1975

Conforme observado na figura 6, os fluidos Newtonianos são caracterizados pela viscosidade constante, não sendo afetados por mudanças na taxa de cisalhamento. Os fluidos não-Newtonianos pseudoplástico são caracterizados pela diminuição da viscosidade quando é aumentada a taxa de cisalhamento, para a maioria desses materiais o efeito do cisalhamento é reversível quando o mesmo é interrompido. Os fluidos não-Newtonianos dilatantes possuem a característica de aumentar a viscosidade quando a taxa de cisalhamento aumenta e os fluidos não-Newtonianos plásticos (também chamados de pseudoplásticos com limite de escoamento), tem um caráter sólido e com viscosidade extremamente alta, caracterizando-se pela deformação elástica na presença de forças extremas de tensão e podendo mudar de estado de maneira irreversível (SCHRAMM, 1998).





A tixotropia é outra característica que é descrita como sendo o potencial de uma estrutura ser reversível quando a taxa ou tensão de cisalhamento é cessada. Portanto, a estrutura se rompe (deforma-se) quando a tensão é aplicada sobre ela, mas quando a tensão é interrompida a estrutura original volta a ser quase a mesma, característica importante para formulações de uso tópico. Quando o produto é aplicado na pele ele sofre uma deformação decorrente da aplicação, podendo ser comparado com a tensão e a taxa de cisalhamento aplicada no teste de reologia. É interessante que, após cessar a aplicação o produto volte à sua forma original, para que não escorra. As amostras tixotrópicas têm estruturas relativamente fracas, que podem ser destruídas temporariamente como resultado do cisalhamento constante ou dinâmico (SCHRAMM, 1998)



**Figura 7 - Curva de fluxo, demonstrativo da tixotropia e área de histerese (área hachurada em cinza)**

**Fonte:** Adaptado de SCHRAMM, 1998.



A avaliação da capacidade de um sistema em recuperar sua forma inicial é feita utilizando-se o teste de fluência e recuperação. É necessário entender que uma amostra pode levar pouco tempo para romper sua estrutura tixotrópica, e sua recuperação para o estado original pode demorar muito. Portanto durante este teste, espera-se que uma amostra viscoelástica tenha recuperação de 30 a 50% da viscosidade, em um período de tempo pré-estabelecido (SCHRAMM, 1998).

Estudos sobre a reologia de formulações farmacêuticas de uso tópico têm se tornado cada vez mais frequentes, pois nota-se que a estabilidade física da formulação é fundamental para o controle de qualidade, aceitação pelo consumidor e eficácia da mesma (CORRÊA et al., 2005). Segundo Ansel e colaboradores 2007, reologia é o estudo do fluxo levando-se em conta as características de viscosidade de pós, líquidos e semi-sólidos. São classificados em: newtoniano e não-newtoniano. O fluxo newtoniano caracteriza-se por viscosidade constante, independente da velocidade de cisalhamento aplicada (exemplo: água). O fluxo não-newtoniano caracteriza-se pela mudança da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento.

A viscosidade é a medida da resistência do fluido ao fluxo de um sistema após a aplicação de um estresse. Portanto, quanto maior a viscosidade, maior será a resistência e a força à ser aplicada para produzir o fluxo com uma determinada velocidade (THOMPSON, 2006; CORRÊA et al., 2005).



Segundo alguns autores, o fluxo não newtoniano são ainda classificados em três subclasses de acordo com suas capacidades de fluxo, são elas: plásticos, pseudoplásticos e dilatantes (ANSEL et al., 2007; THOMPSON, 2006). Em geral os géis hidrossolúveis, possuem o comportamento reológico do tipo pseudoplástico – tixotrópico ou reopédico, ou seja, deformam-se durante a aplicação (sua viscosidade diminui com o seu cisalhamento) tornando-se mais fluidos e facilitando o espalhamento; é perceptível a recuperação da viscosidade inicial no momento em que é cessada a aplicação, o que evita que o produto escorra. Os produtos do tipo tixotrópico e reopédico tendem a ter maior prazo de validade, pois durante o período no qual o produto permanece em repouso, este apresenta viscosidade constante ou aumenta a viscosidade, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação, se esta porventura apresentar um emulsionante e constituintes de característica oleosa, ou apolar (AULTON, 2005).

A reologia das emulsões e demais formulações farmacêuticas de uso tópico, estão cada vez mais frequentes em pesquisas realizadas pela comunidade científica, sendo fundamental para seu controle de qualidade e eficácia à que se destina (CORRÊA et al., 2005). A caracterização reológica é efetiva na comparação das propriedades estruturais de emulsões e obter informações sobre a resistência à forças externas, e ainda pode dar indícios sobre a estabilidade da formulação (THORGEIRSDÓTTIR et. al., 2006).



## 1.5 FUNGOS

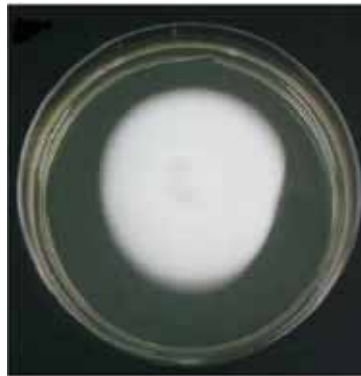
Os fungos são organismos eucarióticos, com núcleo bem definido circundado por uma membrana nuclear; uma membrana celular que contém lipídeos, glicoproteínas e esteróis; parede celular; mitocôndrias; aparelho de Golgi; ribossomos ligados ao retículo endoplasmático e um citoesqueleto constituído por microtúbulos, microfilamentos e filamentos intermediários. Essa descrição demonstra que esses microrganismos possuem células tão semelhantes às hospedeiras que é difícil elaborar estratégias terapêuticas específicas dirigidas contra o parasita e atóxica para o hospedeiro (SCHAECHTER et al., 2002).

De acordo com sua morfologia os fungos podem ser classificados em filamentosos, leveduras e dimórficos. Este último grupo pode apresentar-se na forma filamentosa ou leveduriforme, dependendo da temperatura a que é exposto; na temperatura ambiente (25 – 28°C), apresentam-se na forma filamentosa e na temperatura de 37 – 39°C mostram-se como leveduras (SIDRIM; ROCHA; CORDEIRO, 2004).



### 1.5.1 *Trichophyton rubrum*

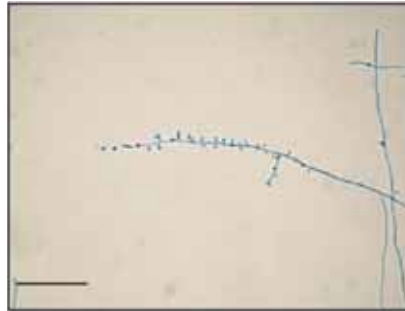
*T. rubrum* é um dos principais agentes causadores das dermatofitoses. Sua identificação é feita pela observação de suas características, muito próprias desta espécie, macro e microscopicamente. Este fungo desenvolve-se em menos de 7 à 14 dias, à uma temperatura de 22°C ( ± 2) em ágar Sabouraud e ágar Potato-Dextrose, forma colônia branca, cotonosa que com o passar dos dias se torna aveludada; sendo que seu reverso apresenta pigmentação avermelhada, como demonstrada na figura 8.



**Figura 8 - Colônia do *T. rubrum***  
**Fonte:** Adaptada de PEREIRA, 2009

Microscopicamente apresentam hifas septadas com microconídeos laterais em forma de gota de lágrima; macroconídeos podem ser raros, abundantes ou ausentes e, quando presentes são longos, de parede fina com presença de 3 a 8 células, formando-se diretamente no final das hifas. Na sua maioria são antropofílicos, ou seja, isolados apenas do homem (LACAZ, 2002).





**Figura 9 - Hifas do *T. rubrum* septadas com microconídeos - visão microscópica**  
**Fonte: PEREIRA, 2009**

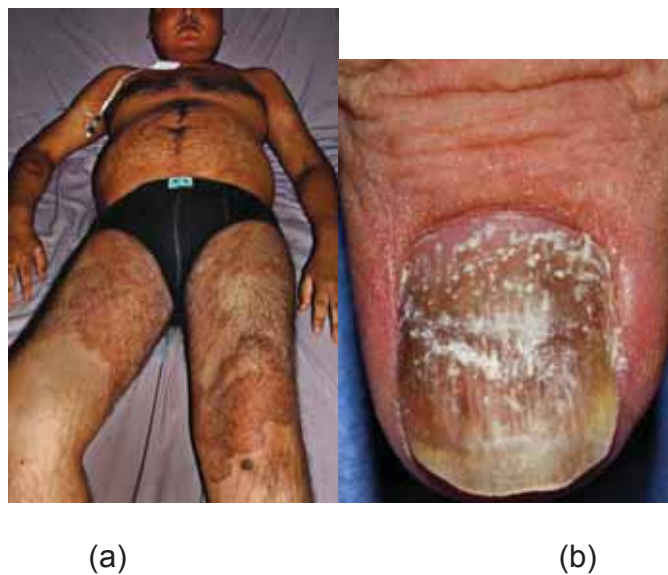
O *T. rubrum* é comumente agente de dermatofitoses crônicas e refratárias ao tratamento convencional com antifúngicos. Diversas vezes o resultado inicial, mostra-se favorável, porém cria a falsa impressão de cura e logo a dermatofitose ocorre novamente (ZAITIS, 1992).

### 1.5.2 *Micoses Superficiais*

As micoses podem ser classificadas, segundo os tecidos e órgãos atingidos em: micoses superficiais, de localização nas camadas mais superficiais da pele ou dos pêlos; micoses cutâneas ou dermatomicoses, localizadas na pele, no pêlo ou nas unhas; micoses subcutâneas; micoses sistêmicas ou profundas atingindo, principalmente, órgãos internos e vísceras, e as micoses oportunistas que atingem os pacientes imunocomprometidos por doença de base, como câncer, diabetes, ou aqueles que são submetidos a tratamentos com uso de corticoidoterapia, imunossupressores e antibioticoterapia (TRABULSI E ALTERTHUM, 2004).



Dentre as micoses superficiais, estão as dermatofitoses, que se localizam nas zonas planas e intertriginosas da pele (LACAZ et al., 2002), e são produzidas por fungos especializados, denominados dermatófitos, os quais têm a habilidade de degradar a queratina e transformá-la em material nutritivo para seu crescimento (BALDA et al., 2007).



**Figura 10 - (a)Dermatofitose extensa - Tineacorporisem paciente; (b)Onicomicose branca superficial - Tineaunguium em paciente**

Fonte: Retirado de PEIXOTO, 2010

Pertencem ao grupo dos dermatófitos os fungos filamentosos, hialinos, septados, algumas vezes artroconidiados, queratinofílicos, passíveis de colonizar e causar lesões clínicas em pêlos e/ou extrato córneo de homens e animais (COELHO et al., 2008).



Os dermatófitos compreendem cerca de 45 espécies enquadradas em três gêneros: *Trichophyton* (Figura 6), *Microsporum* (Figura 7) e *Epidermophyton* (Figura 8). As espécies mais comumente isoladas de dermatofitoses no Brasil são: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans*, *M. canis*, *M. gypseum* e *E. floccosum* (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004).

Os fungos desse grupo secretam queratinases, um grupo de enzimas que degradam a queratina, proteína presente no cabelo, na pele, nas unhas e nos pêlos. A infecção é transmitida a partir de um indivíduo para outro, de um animal para o homem ou do homem para o animal, por contato direto ou indireto por fômites contaminados (TORTORA et al., 2002).

As dermatofitoses são infecções cosmopolitas, havendo, no entanto, variações regionais marcantes no que diz respeito a tipos e frequência das espécies isoladas. A literatura mundial aponta o *T. rubrum* como a espécie de dermatófito mais comumente isolada em humanos.

Estudos de incidência de dermatofitoses na Região Sul e Sudeste do Brasil têm apontado o *T. rubrum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes*, respectivamente, como as três espécies mais prevalentes. Na Região Nordeste foram apontados *T. tonsurans*, seguido de *T. rubrum* e *M. canis* (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004).





O aumento das incidências das micoses tornou-se um importante problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial e como consequência pode ocorrer diminuição da qualidade e da expectativa de vida. O problema é agravado em pacientes imunocomprometidos, que são mais susceptíveis a desenvolver estas infecções, e podem levá-los à morte (MASCHMEYER & HAAS, 2008; SEGAL et. al., 2008; JARVIS et. al., 2008; ESPINEL-INGROFF, 2009).

Além de problemas com diagnósticos inconclusivos, e problemas na terapêutica, pois a disponibilidade de antifúngicos ainda é relativamente pequena, algumas vezes ineficientes e com alta toxicidade, a resistência microbiana que têm sofrido um aumento acentuado, também é motivo de dificuldade na terapêutica (GIROIS et al., 2006).

A resistência microbiana deve-se à sucessivas mutações que podem ocorrer nas células fúngicas e os fármacos já utilizados na terapêutica têm o papel de agente de seleção dessas células (WHITE et. al., 1998).

A frequência das infecções fúngicas causadas por linhagens resistentes vem aumentando e assim cresce também a necessidade de bioprospecção de novas moléculas para o emprego de novas terapias que sejam mais eficientes para o tratamento dessas infecções (PERLIN et. al., 1997).



### 1.5.3 Tratamento

A terapia para tratamento das dermatofitoses consiste na remoção completa de estruturas epiteliais infectadas e mortas, e aplicação de uma substância antimicótica no local (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004). No tratamento tópico, são utilizados preparados à base de tintura de iodo, ácido salicílico ou antifúngico em forma de creme ou solução: cetoconazol, isoconazol, miconazol, tolciclato, clotrimazol, bifonazol, ciclopiroxolamina, terbinafina. O tratamento sistêmico é feito por derivados azólicos, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, pela terbinafina ou griseofulvina (MORIELO et al., 2006; TRABULSI et al., 2004). Embora a terapia não dependa da espécie fúngica, o sucesso no tratamento pode estar relacionado ao conhecimento do patógeno, e por conseqüência, do seu perfil ecológico, a fim de garantir a erradicação do microrganismo e a interrupção do ciclo epidemiológico da doença (SIDRIM, BRILHANTE, ROCHA, 2004)



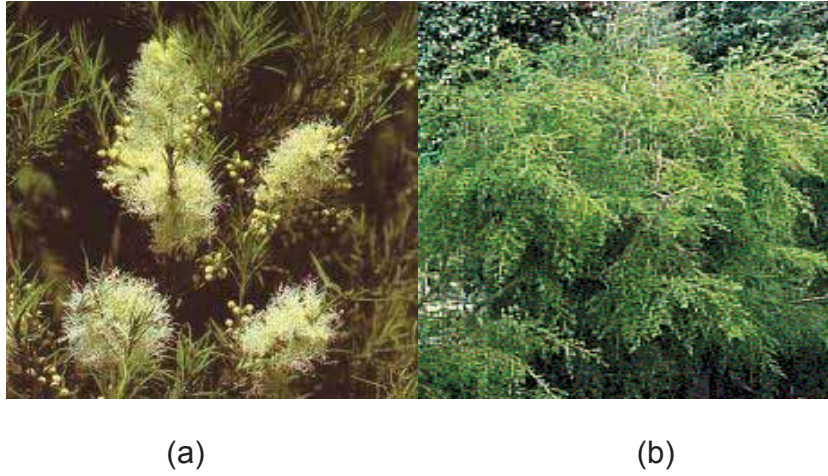
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MELALEUCA ALTERNIFOLIA

Melaleuca alternifolia (TTO), pertencente à família das Myrtaceae que encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (BARROSO et. al.; 1991), sendo esta espécie em especial, uma planta arbustiva nativa da Austrália, oeste da Índia e América tropical (LORENZI, 2000; STASI et al., 2002), como demonstrado na figura 11. Seu hábitat natural é na margem de rios, ou limite de pântanos (MELALEUCA, 2004 e 2008).

Há várias espécies da família Myrtaceae que fornece inúmeros produtos, como resinas, temperos, unguentos, sendo que, os óleos essenciais são os mais utilizados na medicina tradicional (STASI et al., 2002) e mesmo já sendo utilizada primitivamente por nativos da Austrália, os colonizadores que lá aportaram, promoveram a destilação do óleo das folhas (CARSON et al., HALCÓN e MILKUS, 2004), obtendo assim, um óleo mais puro e com características medicinais ainda mais notáveis.





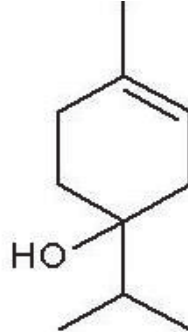
**Figura 11 - (a) Flores do arbusto da Melaleuca alternifolia, (b) Fotografia do arbusto da Melaleuca alternifolia.**

**Fonte:** [http://www.wildcrafted.com.au/Tea\\_Tree\\_Oil\\_\(Melaleuca\\_alternifolia\).html](http://www.wildcrafted.com.au/Tea_Tree_Oil_(Melaleuca_alternifolia).html);

**Fonte:** [http://www.soliearth.com/tea\\_tree.php](http://www.soliearth.com/tea_tree.php).

O óleo essencial desta planta possui mais de 100 componentes sendo os principais: terpinen-4-ol e 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol, terpinoleno e  $\alpha$ - e  $\gamma$ -terpineno e juntos compreendem cerca de 90% da constituição do óleo (BROPHY et. al., 1998). A composição do TTO é regulamentada pela norma internacional ISO-4730, que estabelece limites máximos e mínimos para 14 componentes sendo que independente da amostra, esta deve conter terpinen-4-ol e  $\alpha$ -terpineol, que são considerados os principais para a atividade antimicrobiana (CARSON E RILEY, 1995; CARSON et al., 1998).





**Figura 12 - Estrutura química do terpinen-4-ol**

Fonte: [http://www.alibaba.com/productgs/Terpinen\\_4\\_ol\\_CAS\\_No\\_562.html](http://www.alibaba.com/productgs/Terpinen_4_ol_CAS_No_562.html)

O terpinen-4-ol, apresentado na figura 12, é a molécula marcadora da planta, com teor indicado acima de 30%, e o 1,8-cineol não deve exceder 15%, pois este composto não interfere significativamente na ação terapêutica e possui propriedades altamente tóxicas e irritantes. Normalmente os valores encontrados destes dois componentes são de 40% e 3%, respectivamente (International Organisation for Standardisation, 1996; SILVA et al, 2002), os demais componentes de relevância, são apresentados na tabela 1.



**Tabela 1 - Principais componentes do óleo essencial de *M. alternifolia***

Componentes	Padrão AS2782-1997(%)	Australiano ISSO-4730 (%)
$\alpha$ -pineno	1-6	1-6
Sabineno	TRAÇOS-3,5	TRAÇOS-3,5
$\alpha$ -terpineno	5-13	5-13
Limoneno	0,5-4	0,5-1,5
$\rho$ -cimeno	0,5-12	0,5-8
1,8-cineol	0-15	TRAÇOS-15
$\gamma$ -terpineno	10-28	10-28
terpinoleno	1,5-4	1,5-5
Terpinen-4-ol	30	30-48
$\alpha$ -terpineol	1,5-8	1,5-8
aromadrendeno	TRAÇOS-7	TRAÇOS-3
$\Delta$ -cadineno	TRAÇOS-8	TRAÇOS-3
globulol	TRAÇOS-3	TRAÇOS-1
viridiflorol	TRAÇOS-1,5	TRAÇOS-1

O óleo de *M. alternifolia* é amplamente utilizado pela população, embora os dados disponíveis sobre a segurança e toxicidade do óleo sejam limitados (HAMMER et al, 2006). A maior parte dos estudos com o TTO estão relacionados com sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-viral e anti-câncer (CALCABRINI et al, 2004).



O óleo essencial é obtido por hidrodestilação das folhas, apresentando um rendimento de aproximadamente 1 a 2 % do peso fresco da planta. É recolhido com 50 mL de água, extraído com pentano três vezes, seguido da adição de sulfato de magnésio anidro na fase orgânica (SILVA et al, 2002).

Alguns fatores como solo, clima, irrigação, plantação, colheita, idade da árvore, época do ano, influenciam na produção da substância ativa na planta, assim como o modo de extração do princípio ativo das folhas, farmacógeno da *M. alternifolia*. Dependendo destas condições têm-se diferentes concentrações dos ativos. O acondicionamento, transporte e armazenamento também são relevantes à qualidade do produto final, pois tem sido sugerido que o armazenamento prolongado provoca o aparecimento de produtos de oxidação que são os principais alérgenos (HAMMER et al, 2006).

O terpinen-4-ol (figura 12 ) é o principal componente do óleo de *Melaleuca alternifolia*, mas também pode ser produzido pelo metabolismo secundário de outras plantas, como *Alpinia zerumbet*, *Camellia sinensis*, *Eucalyptus globulus*, *Laurus nobilis*, *Artemisia*, *Cinnamomum*, *Citrus*, *Cuminum*, *Cupressus*, *Cymbopogon*, *Lantana*, *Lippia*, *Myrsine*, *Origanum*, *Pimpinella*, *Rosmarinus*, *Salvia*, *Thymus*, entre outras (PRIEST & PRIEST, 2002; BETTONI, 2004; VIEIRA et al., 2004; NASCIMENTO et al., 2005).



### 3 MATERIAISE MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Solventes, Reagentes, Matérias-Primas e Meios de Cultura

- Óleo Essencial de Melaleuca alternifolia(GALENA®)
- Butilhidróxitolueno (BHT) (PHARMA SPECIAL®)
- Álcool Cetoestearílico Etoxilado 20 OE (ALL CHEMISTRY®)
- Estearato de Octila (ALL CHEMISTRY®)
- Propilenoglicol (VETEC®)
- Ácido EtilenodiaminoTetracético (EDTA), sal dissódico (VOLP®)
- Trietanolamina (CARLO ERBA®)
- Metilbromoglutaronitrila e fenoxietanol (Cosmoguard® - COSMOTEC®)
- Polímero carboxivinílico (Carbopol®) (Pharma Chemical)
- Hidróxido de Sódio (CINÉTICA®)
- Ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) (ACROS ORGANICS®)
- Monoleato de Sorbitano Etoxilado 20 OE (Tween 80®) (LABSYNTH®)
- Meio RPMI-1640 (SIGMA-ALDRICH®)
- Meio Sabouraud sólido (ACUMEDIA®)
- Anfotericina B de Streptomyces (SIGMA-ALDRICH®)
- Meio Potato Dextrose sólido (ACUMEDIA®)
- Rezasurina (SIGMA-ALDRICH®)





### 3.1.2 Equipamentos e Softwares

- Agitador Orbital (INNOVA 4430®)
- Agitador vertical (FABBE 103®)
- Autoclave Vertical (FABBE 103®)
- Balança Analítica (MICRONAL AB 204®)
- Banho de aquecimento – Fistom
- Bomba a Vácuo (MOTORES ELÉTRICOS BRASIL®)
- Câmara de Fluxo Laminar (VECO®)
- Câmara de Neubauer (BOECO®)
- Centrífuga (FANEM®)
- Estufa de ar circulante (FANEM®)
- Estufa de Esterilização (FANEM® 315 SE)
- Estufa de Incubação bacteriológica (OLIDEF CZ®)
- Microfiltro 0,22µm (MILLIPORE®)
- Microscópio óptico (CARL ZEISS JENA®)
- Peagômetro (MICRONAL B374®)
- Placas de 96-wells “flat bottom” (TTP®, CONSTAR®)
- Reômetro de Oscilação (HAAKE® modelo RHEOSTRESS RS-1)
- Refrigerador (CONSUL®)
- Software Rheowin 3.5 (HAAKE®)
- Sensor tipo cone placa (acessório do reômetroja descrito )



- Sistema de Purificador de água (MILLIPORE MILLI Q BIOCEL®)
- Termômetro (INCOTERM®)
- Vidrarias em geral
- Vórtex (VISION KMC 1300V®)
- Turrax

### 3.1.3 *Microrganismo*

Trichophyton rubrum – cepa do acervo:Fundação Oswaldo Cruz – INCQS:40051

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 *Análise da Atividade Antimicrobiana*

#### **3.2.1.1 *Preparo e diluição dos antifúngicos***

O antifúngico Anfotericina B foi utilizado como substância controle, uma vez que as cepas fúngicas utilizadas são sensíveis à sua ação. Foram dissolvidos 16 mg de anfotericina B em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) sendo diluídos, posteriormente, em meio RPMI-1640, de forma que as concentrações finais foram de 16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,013 $\mu$ L/ml.



### **3.2.1.2 Diluição do TTO**

Para a diluição do TTO, foram utilizados tubos de ensaio, e como diluente utilizou-se Tween 80® à uma concentração de 1%, juntamente com água Milli Q q.s.p..

Foi diluído 1% de TTO na solução de Tween 80®, no microtubo de eppendorf, sendo este agitado vigorosamente no vórtex, por 2 minutos para a completa homogeneização.

### **3.2.1.3 Preparo do Meio de cultura Batata Dextrose**

Este meio de cultura foi utilizado na manutenção das colônias do *T. rubrum* em estoque, para sua utilização durante o trabalho e também nos ensaios deMFC e difusão em ágar descritos nos itens 4.2.1.8 e 4.2.1.10 respectivamente.

- Extrato de batata 20g
- Dextrose 10g
- Ágar 15g
- Água Milli Q 1000mL

Pesados os componentes sólidos, os mesmos são diluídos na água e autoclavados à 1 atmosfera de pressão por 20 minutos.



### 3.2.1.4 Preparo do Meio RPMI 1640

Este meio de cultura foi utilizado no ensaio de MIC.

- Meio de RPMI 1640 10,4g
- Tampão MOPS 35,4g
- Glicose 19,0g
- Água Mili Q 1000mL

Após o processo de pesagem, o meio RPMI foi dissolvido em 900mL de água, acrescentado o MOPS (concentração final de 0,165mol/L), agitando-se até dissolver. O pH foi ajustado para 7,0 a 25°C utilizando hidróxido de sódio 1 mol/N e após foi acrescentada água até o volume final de 1000mL. Este meio de cultura foi esterilizado por filtração e armazenado à 4°C até o uso.



### **3.2.1.5 Preparo do Inóculo**

As linhagens foram desenvolvidas em placas de ágar Bata-dextrose por um período de 7 à 14 dias. Após o desenvolvimento adotou-se o seguinte procedimento para o preparo do inóculo: raspou-se as colônias com alça microbiológica, desgrudando-as do meio e colocando-as em tubo cônico contendo 3mL de solução salina estéril. Após este procedimento, misturou-se em vótex por aproximadamente 3 minutos. As células foram contadas na câmara de Neubauer. O número de células foi ajustado para que se obtivesse um número final de  $5,0 \times 10^3$  UFC/mL em meio RPMI. A seguir foi feito o inóculo de 100 $\mu$ L por poço da microplaca de 96 poços.

### **3.2.1.6 Aplicação do inóculo em microplaca para o TTO**

Para determinação da concentração inibitória mínima foi utilizada adaptação da metodologia CLSI M38-A (NCCLS, 2002).

Para tanto nesta técnica foi utilizada microplaca de 96 poços que contém 8 linhas e 12 colunas. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 com 2% de glicose e tamponado em MOPS pH 7,2. A coluna 11 foi usada para o controle negativo do TTO e também controle da turbidez, nesta coluna foram colocados 100 $\mu$ L do meio e 100 $\mu$ L do TTO (já diluído na solução de Tween 80). Na coluna 12, os 4 primeiros poços (A,B,C,D) foram considerados controles positivos, de uma vez que neles foram inoculados apenas 100 $\mu$ L da suspensão de células ( $5 \times 10^3$  UFC/mL) e 100 $\mu$ L do meio, em contrapartida



os 4 últimos poços (E,F,G,H) continham apenas RPMI sem inóculo, sendo assim o controle negativo do meio de cultura.

Posteriormente na coluna 1 nas linhas A,C e D, foram colocados 100µL do TTO e 100 µL de RPMI, sendo assim, homogeneizados e retirados 100µL e passado para a coluna 2, desta também foram retirados 100µL e repassados a coluna 3 e assim sucessivamente até a coluna 10, onde após a adição dos 100µL retirados da coluna 9, foram retirados 100µL e descartados, obtendo-se então a diluição do TTO, assim, o mesmo procedimento foi feito nos poços F e G da coluna 1 à 10, porém nestes foram utilizados somente o meio e a solução de Tween 80® (sem TTO) autoclavado, sendo assim o controle positivo.

Na linha H foram feitas diluições de anfotericina B com o meio. Foram colocados 100µL da suspensão de células em concentração  $5 \times 10^3$  UFC/mL em cada poço das colunas 1 à 10 sendo este o controle negativo.

O esquema da figura 13 exemplifica todo o experimento aqui descrito.

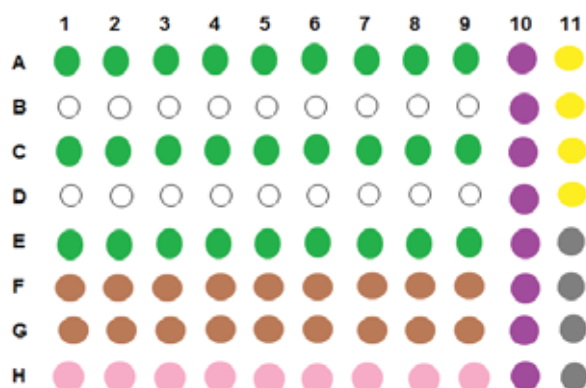








Figura 13 -Esquema da microplaca utilizada no ensaio de CIM



-  Poços contendo inóculo *T. rubrum*, solução de Tween80® adicionada de TTO e RPMI 1640.
-  Poços contendo Solução de Tween80®, RPMI 1640 e inóculo de *T. rubrum*.
-  Poços contendo Anfotericina B, RPMI 1640 e inóculo de *T. rubrum*.
-  Poços contendo RPMI 1640 e solução de Tween80® adicionada de TTO.
-  Poços contendo RPMI 1640 e inóculo *T. rubrum*.
-  Poços contendo RPMI 1640.

### **3.2.1.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Após a montagem, a microplaca foi incubada em estufa com agitação de 20 rpm por 7 dias à 28°C. A leitura foi feita observando-se o desenvolvimento do microrganismo em relação ao controle negativo, isto é a ausência de crescimento, para essa leitura ser mais clara foi feita a revelação da placa com rezasurina, um corante que em presença de um microrganismo, muda sua cor. Foi determinada como CIM o poço com a menor concentração do antifúngico ou substância a ser testada, onde não ocorreu o desenvolvimento do microrganismo inoculado.



### 3.2.1.8 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

A determinação da concentração fungicida mínima foi realizada em placa de petri, contendo o meio ágar batata-dextrose. A placa de Petri foi previamente demarcada de acordo com as posições das diluições dos extratos e antifúngicos na placa de microdiluição.

Uma alíquota do conteúdo dos poços da placa de microdiluição foi transferida com o auxílio de um palito de madeira esterilizado, para o respectivo local na placa de Petri, como demonstra o esquema da figura 14. Incubou-se a placa em estufa à 28°C por 7 dias. Foi determinada como a CFM a menor concentração do extrato ou antifúngico onde não ocorreu o desenvolvimento dos microrganismos.

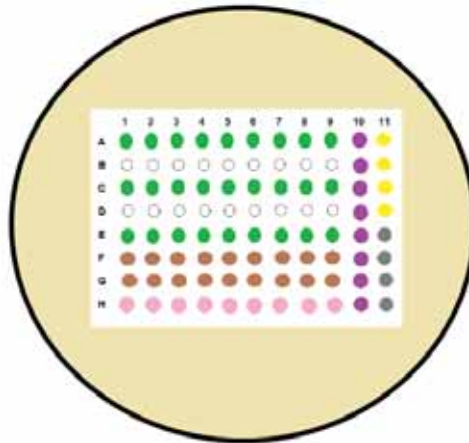


Figura 14 - Placa de Petri demarcada com os poços da microplaca





### **3.2.1.9 Preparo das formulações**

A formulação foi preparada, seguindo o procedimento adotado no período de pré-formulação, onde foram pesquisadas matérias-primas e propostas de formulação a fim de que se escolhesse a melhor fórmula.

Prepararam-se as fases da fórmula separadamente, ou seja, a primeira correspondente à fase aquosa e a segunda, à fase oleosa.

Para o preparo da primeira fase, foi pesado o polímero, em seguida a água, agitou-se até a completa dispersão do carbômero. Adiciona-se propilenoglicol, EDTA dissódico e o Cosmoguard®. Essa mistura foi submetida ao TURRAX para agitação à 600 rpm por 30 minutos. Após esse procedimento, esta fase, ficou em descanso de 5 a 10 minutos para saída do ar gerado pela intensa agitação.

Adicionou-se aos poucos a trietanolamina até atingir pH próximo ou igual à 6.0, sempre agitando até a completa polimerização do carbômero.

Para o preparo da segunda fase, foram pesados os demais componentes da fase oleosa em outro béquer. Levou-se ambas as fases ao aquecimento, até atingirem a temperatura de 70°C, verteu-se a fase aquosa sobre a fase oleosa, e a mistura foi novamente submetida ao TURRAX para a formação da emulsão.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (TTO), foi adicionado à emulsão, quando esta atingiu a temperatura ambiente devido os componentes termovoláteis. A composição da formulação está demonstrada na tabela 2.



**Tabela 2 - Componentes da formulação proposta de emulsão tipo gel-creme**

Componentes	Porcentagem (%)
BHT	0,05%
Estearato de Octila	1,0%
Álcool Cetoestearílico Etoxilado 20 OE	0,6%
Propilenoglicol	5,0%
EDTA Dissódico	0,1%
Cosmoguard®	0,2%
Carbômero 940	0,6%
Trietanolamina	q.s. pH ~ 6,0
Óleo de Melaleuca	**
Água destilada	q.s.p. 100%

### 3.2.1.9.1 Difusão em ágar

A análise antimicrobiana conduzida por difusão em meio sólido é aceita pelo FDA (Food and Drug Administration) é um método físico, no qual o micro-organismo é colocado em interação com o produto biologicamente ativo em meio sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo “desafiado” com a concentração da substância ensaiada (PINTO et al., 2003).



O teste de difusão em ágar deste trabalho, foi realizado com base na Norma M38-A do National Committee For Clinical Laboratory Standards, atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), porém com modificações descritas neste item (NCCLS, 2003a).

O inóculo do fungo preparado anteriormente, na concentração  $5 \times 10^3$  UFC/mL, foi semeado 100  $\mu$ L e espalhado usando-se a alça de Drigalski sobre o meio ágar batata-dextrose. Após esse procedimento, o ágar foi perfurado 4 vezes, com cilindros de 6 mm de diâmetro retirado o ágar excedente para que fosse formada a cavidade denominada de “poço”, de modo que este sulco feito no ágar, tivesse a mesma dimensão do cilindro tomando, precauções para que o ágar não fosse totalmente perfurado. Colocou-se então 50  $\mu$ L de amostra placebo em 1 poço e as outras amostras contendo diferentes concentrações de TTO nos outros 3 poços. As placas foram deixadas duas horas a temperatura de 4°C para permitir a difusão das amostras e após este procedimento, as mesmas foram incubadas a uma temperatura de  $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 dias. Após a incubação, foi medido o diâmetro do halo de inibição com o paquímetro digital e esta medida foi considerada como, medida do poder inibitório da amostra contra o microrganismo testado. Os ensaios de difusão em ágar foram realizados em triplicata.



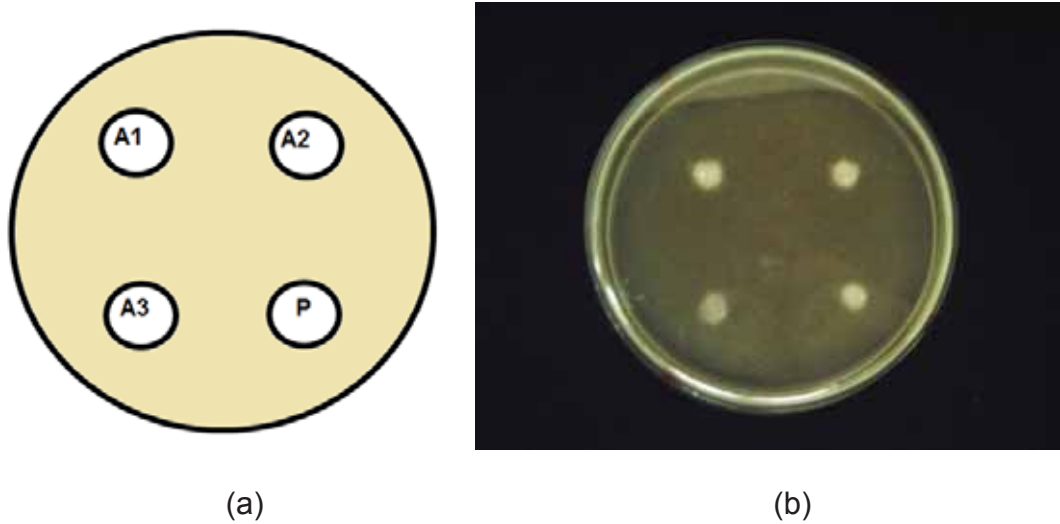


Figura 15 - (a) Esquema da execução do experimento de Difusão em Ágar, onde nos poços A1, A2 e A3 foram colocadas as amostras da emulsão (gel-creme) com diferentes concentrações de TTO adicionado de conservante e outras amostras com TTO e sem conservante. O poço denominado P conteve amostra placebo sem TTO e sem conservante.(b)Fotografia do ensaio realizado, seguindo o esquema descrito

### 3.2.2 Análise Físico-Química

#### 3.2.2.1 Estabilidade Preliminar

A estabilidade preliminar foi realizada conforme está descrita no Guia de Cosméticos da ANVISA.



### **3.2.2.2 Centrifugação**

A estabilidade preliminar foi realizada conforme está descrita no Guia de Cosméticos da ANVISA, portanto não é obrigatória sua execução em medicamentos, mas por ser uma ferramenta importante, foi utilizada neste trabalho, com o intuito de auxiliar e orientar a escolha das formulações que foram utilizadas na estabilidade acelerada e demais testes.

Inicialmente as amostras foram submetidas à centrifugação a 3000rpm, por 30 minutos, e avaliadas visualmente verificando seu aspecto, cor, odor, precipitações e separação de fases. As amostras submetidas ao teste de centrifugação, que não apresentaram sinais evidentes de instabilidade foram submetidas aos testes de estabilidade preliminar. As formulações foram expostas à estufa ( $45 \pm 1^\circ\text{C}$ ), geladeira ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ ), temperatura ambiente (TA) ( $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ao ciclo, onde a formulação alternou entre temperatura de  $-5 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas e  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas, sendo analisadas por 15 dias consecutivos. Foram realizados os testes de pH, aspecto macroscópico, cor e odor todos os dias. As análises microscópicas e os testes de viscosidade foram realizados no primeiro e décimo quinto dia. Todos os testes foram realizados em triplicata. A análise do primeiro dia é chamada de análise inicial (AI), sendo considerado um tempo de 24 horas após a manipulação.



### **3.2.2.3 Características organolépticas**

O aspecto macroscópico foi avaliado visualmente, em relação a cor, aspecto, odor e separação de fase.

### **3.2.2.4 pH**

A determinação do pH foi realizada em peagômetro Micronal, devidamente Calibrado, empregando-se o método descrito no Manual of Cosmetic Analysis no qual adiciona-se 9,0 mL de água destilada e 1,0 g de amostra (NEWBURGER, 1997).

### **3.2.2.5 Viscosidade aparente**

A viscosidade foi determinada utilizando o equipamento reômetro de oscilação HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1 utilizando o sensor do tipo cone placa (C35/2°Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.5. A viscosidade aparente foi obtida a partir da curva de fluxo, sendo observada quando a taxa de cisalhamento máxima era alcançada. Os dados foram obtidos a partir de uma taxa de cisalhamento de 0 – 100 Pa, por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente, à temperatura de 25°C.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

A finalidade deste trabalho foi,desenvolver uma formulação de gel-creme, utilizando o óleo essencial de Melaleuca alternifolia como o princípio ativo, e avaliar a efetividade microbiológica desta formulação frente aoTrichophyton rubrum, para que futuramente possa ser uma alternativa no tratamento das dermatofitoses causado por este microrganismo, incentivando assim o uso seguro de fitoterápicos.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver emulsão do tipo O/A contendo diferentes concentrações de óleo essencial de Melaleuca alternifolia (TTO);

Avaliar a estabilidade preliminar da formulação escolhida, tendo como principal parâmetro a viscosidade aparente.

Determinar CIM e CFM do TTO frente à T. rubrum;

Verificar a atividade antifúngica da formulação contendo diferentes concentrações de TTO, frente a T. rubrum;

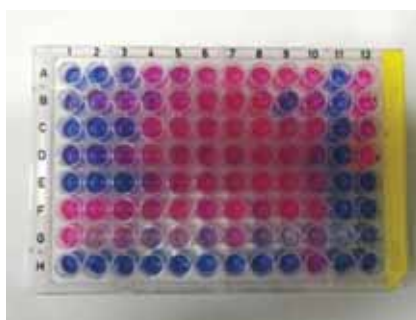


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

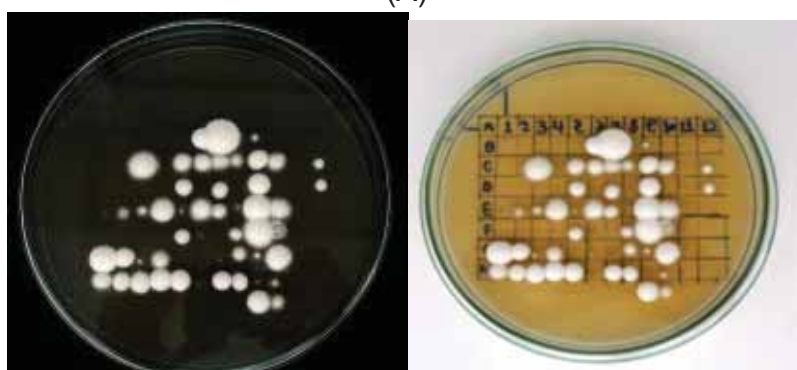
### 5.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

#### 5.1.1 Determinação da Concentração Mínima Inibitória (CIM) e Determinação da Concentração Mínima Fungicida (CFM) do TTO

A figura abaixo ilustra os ensaios de CIM e CFM que foram realizados com o TTO, a fim de obter-se mínimas concentrações possíveis de inibição e morte do *T. rubrum*.



(A)



(B1)

(B2)

Figura 16 - (A) Placa de microdiluição revelada com resazurina, para determinar a CIM; (B1) Placa de Petri de onde foram aferidos os resultados de CFM; (B2) A mesma placa, comesquema da microplaca ao fundo





A tabela abaixo mostra os resultados obtidos nos ensaios de CIM e CFM utilizando o TTO.

**Tabela 3 - Média das concentrações do ensaio realizado em triplicata em comparação com as concentrações do padrão negativo utilizado**

Amostras	CIM	CFM
TTO	0,125%	0,125%
Anfotericina B	0,062 µg/mL	0,062 µg/mL

Desta forma, pela Tabela 3 observa-se que a CIM é igual à CFM, de 0,125% de TTO, resultado este que se encontra em concordância aos resultados apresentados por Carson e colaboradores (2006) que indicam como CIM uma faixa de concentração de 0.03–0.6% e para CFM indicam uma faixa de 0.25–1% de TTO, sendo assim sugere-se que o TTO tem atividade antimicrobiana mais acentuada ou menos dependendo do cultivo e da forma de extração do óleo essencial.

À partir desses resultados, foi sugerido que o ensaio tivessem formulações contendo a CIM e CFM; contendo o dobro desses valores e a metade dos mesmos, desta forma haveriam mais parâmetros de comparação, ainda seria possível ter um panorama da eficácia invitro do produto e como é o comportamento somente do TTO frente ao *T. rubrum*, sem a interferência do conservante (Cosmoguard®) que possui ação antimicrobiana.

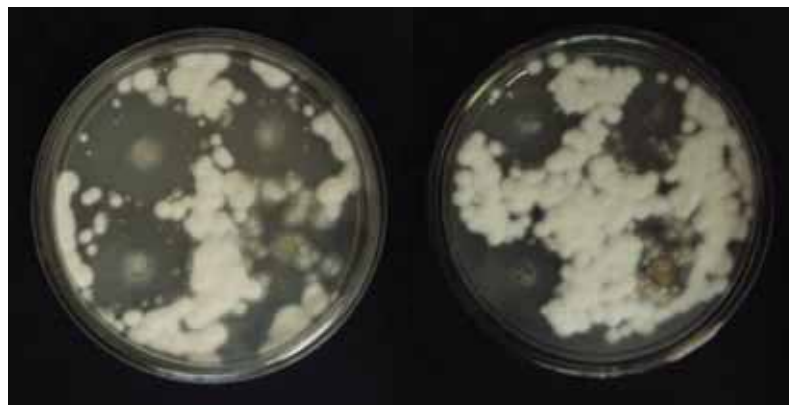


### 5.1.2 Difusão em ágar

As tabelas 4 e 5, demonstram os resultados e as médias dos valores dos halos de inibição obtidos com o ensaio de difusão em ágar.

**Tabela 4 - Valores e médias dos halos de inibição do crescimento de *T. rubrum* com as amostras contendo conservante e diferentes concentrações de TTO**

Amostras adicionadas	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Média
[TTO]=0,125%	25,8cm	24,52cm	24,98cm	24,86cm
[TTO]=0,0625%	22,08cm	22,61cm	22,72cm	22,47cm
[TTO]=0,250%	26,30cm	26,17cm	26,10cm	26,19cm



(a)

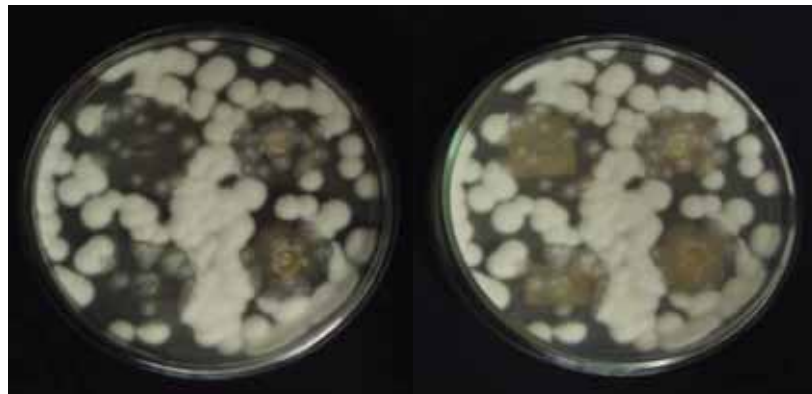
(b)

**Figura 17 - (a) (b) Fotografia dos ensaios feitos com as amostras contendo TTO e conservante, dispostas conforme esquema demonstrado na figura 15**



**Tabela 5 - Valores e médias dos halos de inibição do crescimento de *T. rubrum* com as amostras sem conservante e contendo diferentes concentrações de TTO**

Amostras sem Cosmoguard®	Halo 1	Halo 2	Halo 3	Média
[TTO]=0,125%	23,13cm	23,02cm	23,21cm	23,10cm
[TTO]=0,0625%	20,19cm	21,72cm	20,40cm	20,40cm
[TTO]=0,250%	25,10cm	25,69cm	25,50cm	25,43cm



(a)

(b)

**Figura 18 - (a) (b) Fotografia dos ensaios feitos com as amostras contendo TTO e sem conservante, dispostas conforme esquema demonstrado na figura 15.**



Observando-se esses valores, percebe-se que as médias dos valores dos halos de inibição, são proporcionais à concentração de TTO, ou seja, quanto maior é a concentração do ativo, maior é a inibição do crescimento do *T. rubrum* sendo esses valores possíveis de serem ordenados de forma crescente em ambas as amostras (contendo ou não Cosmoguard®).

Observa-se também que as médias dos halos de inibição das amostras que contém Cosmoguard® são maiores do que as amostras que não são adicionadas do mesmo, portanto, isso sugere que o sistema conservante possa, neste ensaio, agir em sinergismo com o TTO, de forma à inibir ainda mais o crescimento do *T. rubrum*. Comparando-se os dois tipos de amostra, percebe-se a proximidades dos valores das médias isso sugere que mesmo sem o sinergismo com o conservante, o TTO possui aceitáveis valores de halos de inibição.

Nas amostras que não continham o conservante (Cosmoguard®) observou-se outros tipos de colônias de microrganismos que cresceram bem próximas ao poço, conforme demonstrado na figura 18, com isso não há como afirmar, se o *T. rubrum* foi inibido por ação do TTO ou por competição com esses microrganismos. Não há como sugerir a supressão do conservante da fórmula, pois não há como afirmar se o TTO nessas concentrações testadas garantiria a integridade do produto contra contaminações, para isso seriam necessários mais ensaios para se definir uma concentração de TTO na fórmula, onde ele poderia ser o ativo e ao mesmo tempo conservante.



Conforme é observado nas figuras do poço do 4º quadrante sentido anti-horário sempre há crescimento antimicrobiano, pois nesse poço foi colocado a amostra placebo que não continha nem conservante, nem TTO.

## 5.2 PRÉ-FORMULAÇÃO E FORMULAÇÃO

A pré-formulação nada mais é que, a pesquisa de um conjunto de matérias primas e as concentrações de uso indicadas na literatura para diferentes formulações, que quando combinadas entre si, obtém-se uma fórmula com as características desejadas pelo formulador. Para isso foram realizados vários testes com pequenas modificações de concentração e procedimento da fórmula, com o objetivo de obter um produto com sensorial leve e agradável, possuindo alta espalhabilidade e aderência na pele, sendo assim uma forma de garantir a permanência do TTO sobre a micose que estiver na área aplicada. Tendo em vista o objetivo deste trabalho, buscou-se também obter uma emulsão estável, com procedimento simples, reproduzível e com baixo custo.

Para o preparo da formulação, foram pesquisados e utilizados coadjuvantes no veículo com a finalidade de minimizar efeitos de oxidação, contaminação e veicular o ativo (TTO) com eficiência.

O BHT foi utilizado como agente antioxidante da formulação, evitando o aparecimento de compostos de degradação consequentes do processo oxidativo, sendo este um antioxidante comumente utilizado para conservar óleos em geral.



O estearato de octila foi utilizado como emoliente ajudando na espalhabilidade e conferindo a sensação aveludada e seca à pele, não impedindo sua respiração.

O álcool cetoestearílicoetoxilado 20 OE é agente emulsionante, compatível com outros álcoois graxos, é um excelente emulsionante para emulsões do tipo O/A conferindo à elas alta estabilidade.

O conservante antimicrobiano utilizado na fórmula foi o Cosmoguard® sendo este uma associação de conservantes, metilbromoglutaronitrila e fenoxietanol, com intuito de impedir a proliferação de microrganismos no produto final.

O propilenoglicol é um composto da fase aquosa e devido as suas propriedades higroscópicas, tem a capacidade de absorver água e funcionar como um hidratante e umectante em formulações para a pele.

O EDTA dissódico, é o responsável pela ação quelante ou sequestrante de metais que possam estar presentes e oxidar a formulação.

A trietanolamina foi utilizada para acertar o pH = 6,0 da formulação e assim polimerizar o carbômero 940 (ANSEL, 2007) que teve função de co-emulsionante na fórmula, sendo também um espessante da mesma e oferecendo um sensorial de adesividade à emulsão.



### 5.3 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA

#### 5.3.1 Estabilidade Preliminar

Foram feitos as 3 amostras contendo respectivamente 0,125%, 0,625% e 0,250% de TTO divididas e acondicionadas em bisnagas de alumínio com capacidade para 5 gramas e em potes com capacidade para 60g cada um contendo também o headspace conforme o indicado no Guia de Cosméticos da ANVISA, sendo somente os potes que foram submetidos à estabilidade preliminar.



Figura 19 - Acondicionamento das amostras em potes.

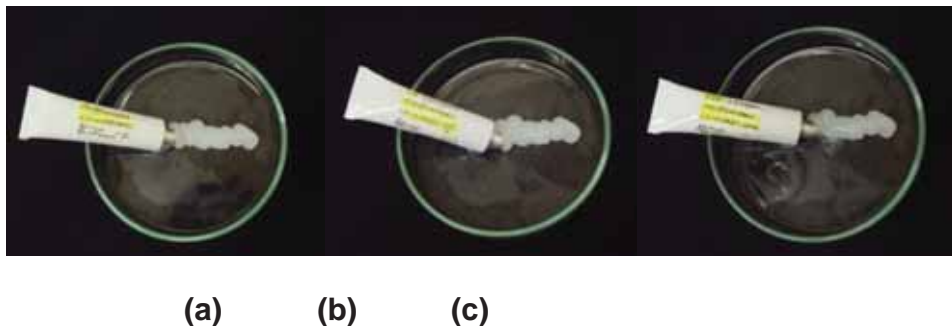
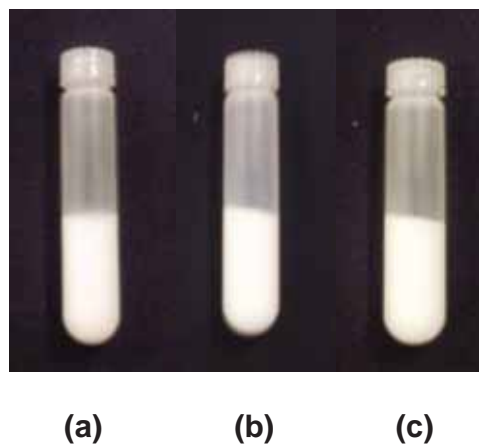


Figura 20 - Acondicionamento das amostras em bisnaga de alumínio, sendo: (a) [TTO] de 0,125%; (b) [TTO] de 0,625% e (c) [TTO] de 0,250%.



### 5.3.1.1 Centrifugação

Após a manipulação das amostras da formulação proposta, foi realizado o teste de centrifugação, sendo realizado na fase inicial de desenvolvimento de produtos, com a finalidade de auxiliar na triagem das formulações. Neste teste as emulsões são consideradas estáveis se os constituintes da fase dispersa mantiveram-se na fase dispersante, após submetê-las a agitação e força da gravidade, ou seja, não deve ser observada a ocorrência de separação de fases ou coalescênciae sim a formação de sedimento compacto (BRASIL, 2004; ANTONIO, 2007) como observado na figura 21.



**Figura 21 – Fotografia das amostras (a) 125%, (b) 0,0625% e (c) 0,250% de TTO que foram submetidas à centrifugação logo após serem produzidas.**





### 5.3.1.2 Características organolépticas

Após a execução das formulações, elas apresentavam coloração branca e opaca típica de emulsão, com aspecto homogêneo, de superfície levemente brilhante e odor característico do TTO.



Figura 22 - Aspecto inicial das amostras no 1º dia de estabilidade preliminar.

No 15º dia, foi observado que, as únicas, de todas as amostras que foram colocadas na estabilidade preliminar conforme as 5 condições descritas, que mudou as características organolépticas foram as amostras do ciclo de temperatura (24 horas na estufa e 24 horas do refrigerador). Elas apresentaram diminuição do odor característico do TTO, sua coloração mudou de branca opaca para amarelo opaco e a emulsão teve visível perda de água com diminuição do volume e massa.





**Figura 23 - (a) Amostra contendo 0,250% de TTO que sofreu mudança nas características organolépticas; (b) comparação da amostra citada em (a) com a amostra contendo 0,250% de TTO submetida à temperatura ambiente.**

As amostras acondicionadas na bisnaga de metal apresentaram a mesma alteração das amostras acondicionadas nos potes.

### **5.3.1.3 pH**

Nas tabelas 6, 7 e 8 encontram-se os resultados da análise de pH das formulações contendo as concentrações de TTO escolhidas (0,125%, 0,0625% e 0,250%) submetidas ao estudo de estabilidade preliminar com médias e desvio-padrão.



Tabela 6 - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,125%

Dias da Estabilidade	pH em TA*	pH em 5°C*	pH em 45°C*	pH em -5°C*	pH em ciclo*
1°	6,92	6,92	6,92	6,92	6,92
2°	6,91	6,91	6,91	6,92	6,9
3°	6,92	6,91	6,92	6,91	6,89
4°	6,89	6,9	6,93	6,91	6,88
5°	6,9	6,92	6,93	6,9	6,89
6°	6,91	6,91	6,91	6,91	6,9
7°	6,91	6,9	6,92	6,9	6,89
8°	6,9	6,91	6,92	6,89	6,88
9°	6,91	6,92	6,93	6,9	6,89
10°	6,9	6,92	6,95	6,89	6,87
11°	6,92	6,93	6,93	6,88	6,89
12°	6,91	6,91	6,94	6,9	6,89
13°	6,9	6,93	6,93	6,91	6,88
14°	6,9	6,92	6,94	6,9	6,88
15°	6,9	6,93	6,94	6,9	6,87
<b>M</b>	<b>6,906</b>	<b>6,916</b>	<b>6,928</b>	<b>6,902</b>	<b>6,888</b>
<b>DP</b>	<b>0,008997354</b>	<b>0,00985611</b>	<b>0,01146423</b>	<b>0,01099784</b>	<b>0,01264911</b>

\* valores da média dos pH's que foram medidos em triplicata\*



Tabela 7 - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,0625%

Dias da Estabilidade	pH em TA*	pH em 5°C*	pH em 45°C*	pH em -5°C*	pH em ciclo*
1°	6,92	6,92	6,92	6,92	6,92
2°	6,91	6,91	6,91	6,92	6,9
3°	6,92	6,91	6,9	6,91	6,89
4°	6,91	6,92	6,9	6,9	6,88
5°	6,9	6,92	6,89	6,89	6,86
6°	6,91	6,91	6,89	6,88	6,86
7°	6,92	6,92	6,88	6,86	6,84
8°	6,93	6,91	6,89	6,89	6,88
9°	6,91	6,92	6,9	6,9	6,86
10°	6,9	6,92	6,9	6,89	6,87
11°	6,92	6,9	6,89	6,88	6,85
12°	6,92	6,91	6,89	6,9	6,86
13°	6,93	6,93	6,9	6,91	6,84
14°	6,94	6,92	6,9	6,9	6,85
15°	6,95	6,93	6,9	6,89	6,83
<b>M</b>	<b>6,919</b>	<b>6,916</b>	<b>6,897</b>	<b>6,896</b>	<b>6,866</b>
<b>DP</b>	<b>0,01387014</b>	<b>0,00816496</b>	<b>0,00961150</b>	<b>0,01594633</b>	<b>0,0244365</b>
	<b>6</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>9</b>	<b>0</b>

\* valores da média dos pH's que foram medidos em triplicata



Tabela 8 - Média e desvio Padrão do pH da amostra com [TTO] de 0,250%

Dias da Estabilidade	pH em TA*	pH em 5°C*	pH em 45°C*	pH em - 5°C*	pH em ciclo*
1°	6,92	6,92	6,92	6,92	6,92
2°	6,9	6,91	6,91	6,92	6,9
3°	6,9	6,91	6,9	6,91	6,89
4°	6,89	6,9	6,91	6,91	6,88
5°	6,9	6,92	6,9	6,9	6,89
6°	6,91	6,91	6,91	6,91	6,85
7°	6,91	6,92	6,89	6,88	6,86
8°	6,9	6,91	6,91	6,89	6,87
9°	6,91	6,93	6,93	6,9	6,86
10°	6,9	6,92	6,92	6,89	6,87
11°	6,89	6,93	6,93	6,88	6,84
12°	6,91	6,94	6,91	6,9	6,89
13°	6,88	6,93	6,93	6,91	6,86
14°	6,9	6,93	6,94	6,9	6,85
15°	6,91	6,95	6,93	6,91	6,82
<b>M</b>	<b>6,902</b>	<b>6,922</b>	<b>6,916</b>	<b>6,902</b>	<b>6,87</b>
<b>DP</b>	<b>0,01014185</b>	<b>0,0132017</b>	<b>0,01404075</b>	<b>0,0126491</b>	<b>0,025634</b>
	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>8</b>

\* valores da média dos pH's que foram medidos em triplicata



As médias dos valores de pH obtidos foram reunidos na tabela 9 e utilizados para construir o gráfico exposto na figura 24.

Tabela 9 - Média dos valores de pH obtidos na estabilidade preliminar			
Condições	[TTO]=0,125%	[TTO]=0,0625%	[TTO]=0,250%
M TA	6,906	6,919	6,902
M 45°C	6,928	6,897	6,916
M (-) 5°C	6,902	6,896	6,902
M 5°C	6,916	6,916	6,922
M ciclo	6,888	6,866	6,87

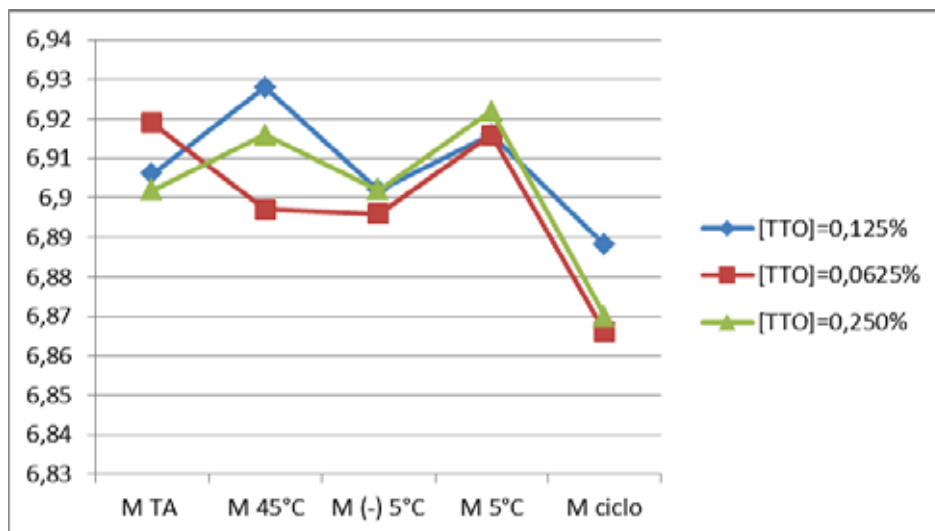


Figura 24 - Gráfico obtido à partir das médias dos valores de pH expostos na Tabela 10



Observando-se o gráfico da figura 24, percebe-se que houveram, nas três amostras, a queda do pH na condição ciclo (24 horas à  $-5^{\circ}\text{C}$  e 24 horas à  $45^{\circ}\text{C}$ ) sendo que a queda foi mais preponderante nas amostras com [TTO] de 0,0625% e 0,250%, mesmo assim não representou significância numérica.

#### **5.3.1.4 Viscosidade Aparente**

A viscosidade aparente foi um parâmetro medido apenas no 1°, 7° e 15° dia de estabilidade preliminar e os valores de viscosidade obtidos a partir da média de três leituras. Na tabela 10,  $\eta$  =viscosidade mínima aparente, Pa = Pascal, TA = Temperatura ambiente, AI = Análise inicial,  $5^{\circ}\text{C}$  = geladeira,  $45^{\circ}\text{C}$  = estufa, ciclo = 24 horas à  $-5^{\circ}\text{C}$  e 24 horas à  $45^{\circ}\text{C}$ , M = Média e DP = desvio padrão relativo entre as amostras submetidas às condições citadas, e foi obtida na curva de fluxo do equipamento reômetro de oscilação HAAKE foi analisada pelo software Rheowin 3.5.



Tabela 10 - Valores de viscosidade aparente no teste de estabilidade preliminar, referente às formulações com as [TTO] 0,125%, 0,0625% e 0,250%

Dias da estabilidade	M $\eta$ (Pa)	M $\eta$ (Pa)	M $\eta$ (Pa)
	[TTO]=0,125%	[TTO]=0,0625%	[TTO]=0,250%
TA AI	2,315	2,315	2,315
TA 15° dia	2,263	2,206	2,263
45°C 15° dia	2,056	2,04	2,037
5°C 15° dia	2,156	2,199	2,198
5°C 15° dia	2,211	2,13	2,17
ciclo 15° dia	2,199	2,167	2,119
M	2,20	2,17	2,18
DP	0,089429302	0,091041566	0,099626636

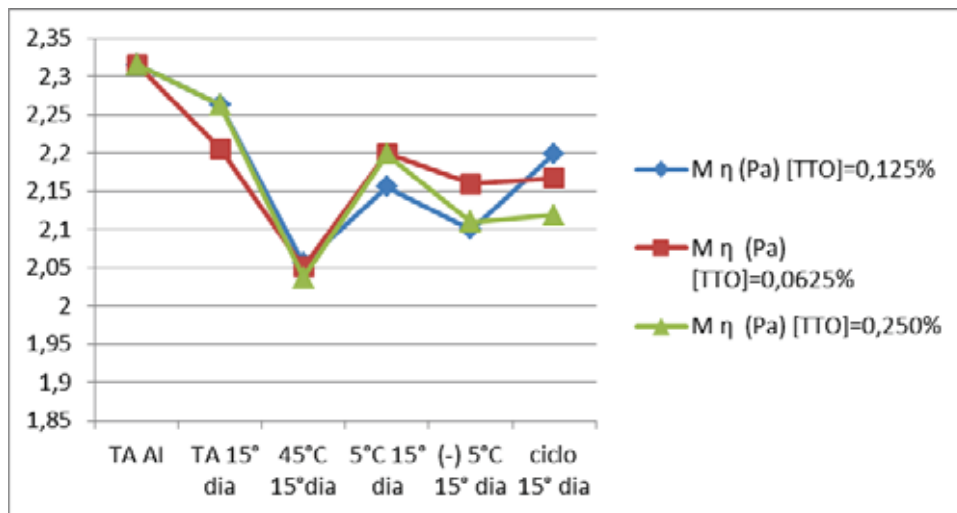


Figura 25 - Gráfico representativo das variações de viscosidade das amostras.



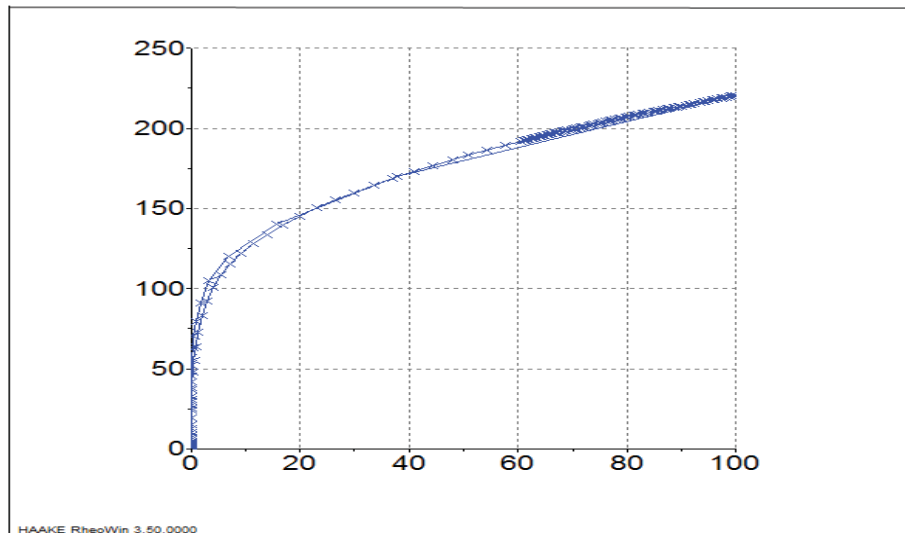


Observa-se uma queda intensa da viscosidade na condição de 45°C, isso pode ter ocorrido devido à perda de água da emulsão em consequência do aquecimento causado pela alta temperatura, resultado esse já apresentado na figura 23, que demonstrou as mudanças organolépticas dessa amostra e a diminuição de volume caracterizando a perda de água, outra hipótese da queda de viscosidade é a possível ocorrência de mudanças nas estruturas intrínsecas à emulsão.

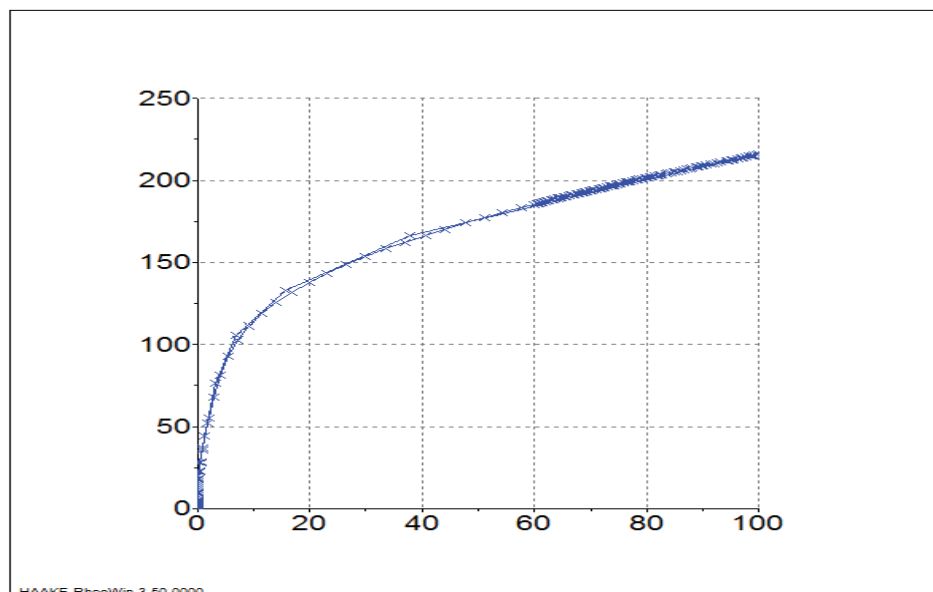
É observada também a diminuição da viscosidade nas condições de ciclo (24 horas à -5°C e 24 horas à 45°C) e temperatura de congelamento (-5°C), e por se tratarem condições drásticas de congelamento e aquecimento sucessivamente, era esperado esse comportamento da amostra, o qual pode estar relacionado com perda de água e mudanças intrínsecas à emulsão, devido a tais condições submetidas.



Na figura 26, 27 e 28, é possível observar as curvas de fluxo referentes as formulações , tendo um gráfico da tensão de cisalhamento em função da taxa de cisalhamento.

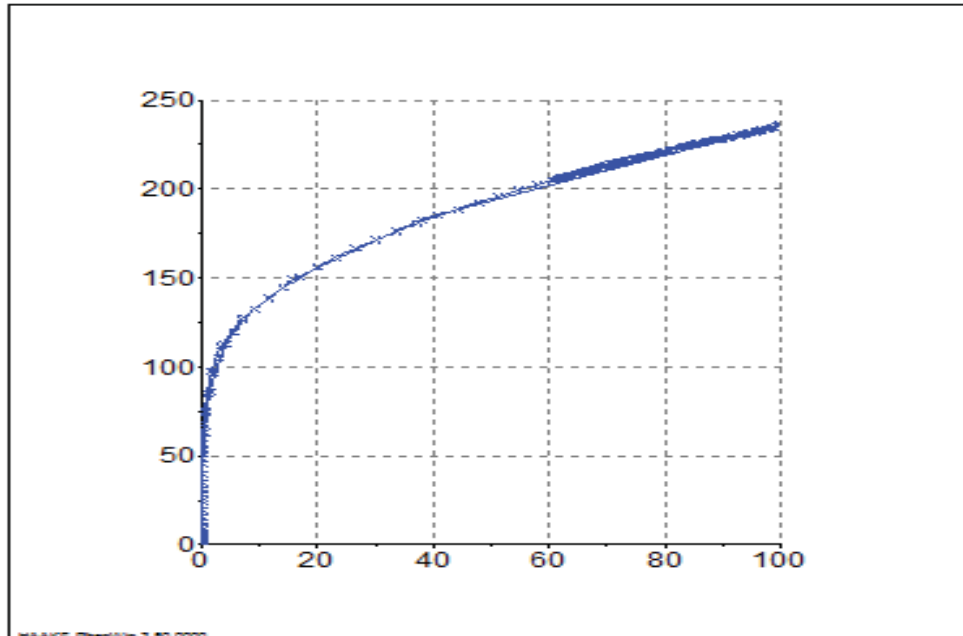


**Figura 26 - Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,125%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abcissas: taxa de cisalhamento [1/s]**



**Figura 27 -Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,0625%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abcissas: taxa de cisalhamento [1/s]**





**Figura 28 - Curva de fluxo da amostra contendo [TTO]=0,250%; onde, o eixo das ordenadas: tensão de cisalhamento em Pascal; no eixo das abscissas: taxa de cisalhamento [1/s]**

De acordo com as curvas de fluxo, apresentadas nas figuras 26, 27 e 28, as formulações desenvolvidas foram caracterizadas como fluxos não-Newtonianos e reopéxicos, apesar de a área de histerese ser diminuta, é possível perceber, na observação atenta dos gráficos, que as curvas ascendentes e descendentes cruzam-se, o que indica a reopexia.

Os fluídos reopéxicos são caracterizados pelo incremento da viscosidade relacionado ao tempo de cisalhamento, sendo assim, quando são deixados em repouso, podem recobrar sua viscosidade, porém mais baixa que a original, sendo que este ciclo pode ser repetido indefinidamente com posterior recuperação da viscosidade original (POSSA & DE LIMA, 2000).



## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

Em linhas gerais, os resultados demonstraram o potencial antifúngico do TTO frente ao *T. rubrum*;

No ensaio de CIM e CFM os resultados se mostram em concordância com literatura consagrada;

O TTO foi de fácil incorporação na formulação proposta e não se mostrou incompatível à nenhum dos componentes, portanto demonstra facilidade em sua utilização;

O potencial antifúngico do TTO não foi afetado, quando este foi incorporado à emulsão, demonstrando que sua eficiência é preservada mesmo não estando in natura;

O TTO apresentou-se um promissor antifúngico e uma alternativa fitoterápica ao arsenal de produtos com conhecida atividade antifúngica, principalmente para o tratamento das dermatofitoses, isso justifica a necessidade de estudos farmacológicos mais aprofundados sobre esse ativo;

A formulação contendo TTO mostrou-se relativamente estável e com reologia adequada à sua pretensa utilização, sendo possível seu melhoramento farmacotécnico;

O produto tem potencial terapêutico preponderante e pode se tornar uma alternativa real para o tratamento das dermatofitoses causadas pelo *T. rubrum*.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AULTON, E.M. Delineamento de Formas Farmacêuticas. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 56-73, 120-123, 504-536, 115, 677, 2005.

ANSEL, H. C.; ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8 ed. São Paulo: Artmed, p. 775, 2007.

BAILEY, W. J., WEIR, I. S. Investigation of Methods for Direct Rheological Model Parameter Estimation. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, vol. 21, p. 1-13, 1998.

BALDA, A.C.; OTSUKA, M.; LARSSON, C. E. Ensaio clínico da griseofulvina e daterbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e Gatos. *Ciência Rural*, v. 37, n. 3, p. 750- 754, 2007.

BARBOSA, S. F.; MINETOMA, T. T. I. Emulsões. *Rev. Racine*, n. 65, p. 38-42, 2001.

BARRY, B.W. Rheology of dermatological vehicles. In: *Dermatological Formulations*. New York, Marcel Dekker, p.351-439, 1993.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; COSTA, C.G. et al. *Sistemática das Angiospermas*. Viçosa: Imprensa Universitária, v.2, 1991.

BETTONI, D. Óleo de Melaleuca. *International Journal of Pharmaceutical Compounding (edição Brasileira)*, Austin, v.6, n.5, p. 268-269, 2004.

BONACUCINA, G.; MARTELLI, S.; PALMIERI, G. F. Rheological mucoadhesive and release properties of carbopols gel and hydrophilic cosolvents. *Int. J. of Pharm.*, v. 282, p. 115-130, 2004.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância. Resolução- RE nº 1, de 29 de julho de 2005. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 01 de agosto de 2005.



BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos. 2ª edição, p. 31, Brasília, 2008.

BRASIL. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasil. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos. 1ª edição, Brasília, 2004.

BREUER, M.M. Cosmetic emulsions. In BECHER, P. (ed.) Encyclopedia of emulsions technology. New York, Marcel Dekker, v.2, p.385-424, 1985.

BROPHY, J.J.; DAVIES, N. W.; SOUTHWELL, I.A.; WILLIAMS, L.R. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 37, p. 1330-1335, 1989.

CALCABRINI ,A., STRINGARO, A., TOCCACIELI, L., MESCHINI, S., MARRA M.,

COLONE, M., GIUSEPPE, S., MONDELLO, F., ARANCIA, G., MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, The Main Component of *Melaleuca Alternifolia* (Tea Tree) Oil Inhibits the In Vitro Growth of Human Melanoma Cells. Journal of Investigative Dermatology. v. 122, p. 349–360, 2004.

CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. Letters of Applied Microbiology, v. 16, p. 49-55, 1993.

CARSON, C. F., RILEY, T. V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. The journal of Applied Bacteriology, v. 78, p. 264-269, 1995.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of tea tree oil. Nedlands, Australian Rural Industries Research and Development Corporations, 1998.

CARSON C. F., HAMMER K. A., RILEY T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. Clinical Microbiology Reviews - American Society for Microbiology, v. 19, n. 1, p. 50–62, 2006.



CHIEN, Y. W. Novel Drug Delivery Systems. 2<sup>a</sup> ed., New York: Marcel Dekker, Inc, p. 300-375, 2001.

CORRÊA, N. M.; CAMARGO JUNIOR, F. B.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. Rev. Bras. Cienc. Farmac., São Paulo, v. 41, n. 1, p. 73-78, 2005.

FERREIRA, A. O. Guia Prático da Farmácia magistral. Boas Práticas de Manipulação. Juiz de Fora, 2000, p. 159-197.

FLORECE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios físicos químicos em farmácia. São Paulo: Edusp, 2003, p. 732.

GUPTA, P.; GARG, S. Avanço recentes nas formas dosagem semi-sólidas para aplicação dermatológica. Pharmaceutical Technology. v. 6, n. 3, 2002.

GENNARO, A. R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 2208.

HALCÓN, L.; MILKUS K. Staphylococcus aureus and wounds: A review of the tea tree oil as a promising antimicrobial. American journal of Inection Control, v. 32, n. 7, 2004.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V.; NIELSEN, J.B. A review of the toxicity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil. FoodandChemicalToxicology, v. 44, p. 616–625, 2006.

LACAZ, C. DA S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; DE MELO, N. T. Tratado de microbiologia médica. São Paulo: Sarvier, 2002.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Fundação CalousteGulbenkian, 2001, v. 2, p. 15-17.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3 ed. São Paulo: InstitutoPlantarum, v.1, 2000.



MASCHMEYER, G.; HAAS, A. The epidemiology and treatment of infections in cancer patients. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 31, p. 193-197, 2008.

MERCLIN, N.; BRAMER, T.; EDSMAN, K. Lontophoteric delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle. *J. of Controlled Release*, v. 98, p. 57-65, 2004.

MOSTEFA, N.M.; SADOK, A.H.; SABRINI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. *International Journal of Cosmetic Science*, v. 28, n. 3, p. 211-218, 2006.

NASCIMENTO, N.R.F.; LEAL\_CARDOSO, J.H.; LESSA, L.M.A.; RORIZ-FILHO, J.S.; CUNHA, K.M.A.; FONTELES, M.C. Terpinen-4-ol: mechanisms of Relaxation on rabbit duodenum. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, p. 467, 2005.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. NCCLS document M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standarts, Wayne, PA, 2002.

NEWBURGER, S. H. *Manual of Cosmetic Analisis*, editor Senzel, A. J., 2 ed, 1997.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. R. *Técnica farmacêutica e Farmácia Galênica*. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 518, 1990.

PRIEST, D.C.; PRIEST, M.D. *Antimicrobiano e Antiinflamatório Naturais para a Acne*. *Cosmet. Toilet.* (edição em Português), Austrália, v.14, n.1, p.55-57, 2002.

PEIXOTO I., MAQUINE G., FRANCESCONI V.A., FRANCESCONI F. Dermatofitose por *Trichophyton rubrum* como infecção oportunista em pacientes com doença de Cushing. *AnBrasDermatol.* v. 6, n. 85, p. 888-90, 2010.

PEREIRA, F. O. *Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de Cymbopogon winterianus Jowitt ex Bor Sobre Dermatofitos do Gênero Trichophyton*. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos





Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do Título de Mestre. p. 29 e 91, 2009.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 2 ed. São Paulo: Atheneu editora, p. 325, 2003.

POSSA, M. V.; DE LIMA, J. R. B. Comportamento reológico de polpas de minério. CETEC/MCT, Série Tecnologia Mineral, n. 77, 2000.

SCHAECHTER, M. E.; ENGLEBERG, N. C.; EISENSTEIN, B. I.; MEDOFF, G. Microbiologia: mecanismos das doenças infecciosas. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

SHAW, D. S. Introdução à química dos colóides e de superfícies. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, cap. 9, 1975.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.; CORDEIRO, R. A. Biologia dos fungos. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 5, p. 41-49, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G. Aspectos clínicos laboratoriais das dermatofitoses. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Micologia médica à luz de autores contemporâneos. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 14, p. 135- 161, 2004.

