

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Lais Mariana Roveri

**OBTENÇÃO DE NANOEMULSÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Achillea*
millefolium L. PARA O CUIDADO DA ACNE**

Araraquara

2025

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Lais Mariana Roveri

**OBTENÇÃO DE NANOEMULSÃO COM ÓLEO ESSENCIAL DE *Achillea*
millefolium L. PARA O CUIDADO DA ACNE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara

2025

Roveri, Lais Mariana.
R873o Obtenção de nanoemulsão com óleo essencial de *Achillea millefolium* L. para o cuidado da acne / Lais Mariana Roveri. – Araraquara, 2022.
86 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Vera Lucia Borges Isaac.

1. *Achillea millefolium* L. 2. Nanoemulsão. 3. Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana. 5. Acne. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Obtenção de nanoemulsão com óleo essencial de *Achillea millefolium* L. para o cuidado da acne.

AUTORA: LAÍS MARIANA ROVERI

ORIENTADORA: VERA LUCIA BORGES ISAAC

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Profa. Dra. LETICIA CARAMORI CEFALI (Participação Virtual)
Universidade Presbiteriana Mackenzie

Profa. Dra. ROSEMEIRE CRISTINA LINHARI RODRIGUES PIETRO (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP Araraquara

Araraquara, 28 de julho de 2022

A Deus, por sempre me mostrar o caminho certo.

Aos meus pais, Luzia e João, por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos.

Ao meu noivo Jean, por ser minha base desde sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Luzia Roveri e João Roveri, e irmã, Aline Roveri, por todo apoio, companheirismo e amor.

Ao meu noivo Jean Santos, por ter feito do meu sonho, o seu sonho também, não medindo esforços para que se tornasse possível. Por todas as vezes que me ouviu e aconselhou nos momentos mais difíceis. Por me fazer acreditar que sou muito mais capaz do que imagino.

Aos meus avós Adelino Roveri e Francisca Roveri (*in memoriam*), por me ensinarem a ser forte em todos os momentos da vida, e que com simplicidade se ganha a todos ao seu redor.

À minha cunhada Juliana Santos, por sempre ter me apoiado como se fosse sua irmã, por todos os esforços sem medida em me proporcionar conforto e segurança, quando mais precisei.

À minha ex-professora e amiga para a vida toda, Maria Leonor Donadom, que me mostrou que esse caminho era possível, por toda sua orientação e por todos os conselhos.

Aos amigos da UNESP, Camila Bacetti e Michele Lopes que se tornaram verdadeiras irmãs, que não importa a distância sempre estarão em meu coração. Sem elas jamais teria suportado certas adversidades durante esses anos.

Às alunas do *LaCox*, em especial à Fernanda Borges, por ter sido a pessoa chave para execução desse trabalho, que teve toda paciência para me explicar, para me ouvir e me entender. A todas as outras alunas, por todas as conversas, ensinamentos, risadas e cafés no laboratório.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Vera Isaac, que me aceitou no *LaCo3* e me concedeu a oportunidade de realizar o sonho de ser aluna da UNESP. Muito obrigada por todos os ensinamentos e por toda paciência que teve comigo.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Aos funcionários e prestadores de serviço da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, em especial à Ilza Yogui, por toda sua prestatividade em nos atender.

À Casa Espírita Terra de Ismael, pela colaboração com o cultivo, colheita e envio da espécie vegetal seca.

À Prof^a Dr^a Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues por ter disponibilizado equipamentos e material para a execução dos ensaios de atividade antimicrobiana.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A vocês, minha eterna gratidão!

“Acho que você não deve fazer nada que não o divirta, lhe dê
prazer. Também não deve exercer um ofício, uma profissão para a
qual é incompetente.” – Jorge Amado

RESUMO

A *Achillea millefolium* L. é uma espécie vegetal nativa da Europa, muito utilizada para os efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante, sendo conhecida, popularmente, no Brasil, como mil folhas. O óleo essencial (OE) de *A. millefolium* L. apresenta, em sua composição, o azuleno, borneol, cineol, cânfora, proazuleno, eucalipitol, guaíol e β -cariofileno, cuja particularidade é a sua coloração azul, que se dá devido à presença de sesquiterpenos azulênicos. A acne é uma inflamação crônica do folículo piloso, que aparece na puberdade, quando os folículos pilosos e os níveis hormonais estão em pico maior de desenvolvimento. O cuidado tópico é o mais utilizado, uma vez que os efeitos colaterais são menores em relação aos tratamentos sistêmicos. A pele é altamente rica em lipídeos que, por sua vez, dificultam a absorção de veículos hidrofílicos. Considerando essa característica da pele, as melhores opções de cuidado tópico são as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas e os transportadores lipídicos nanoestruturados. Para isso, foi desenvolvida uma formulação com o óleo essencial de *A. millefolium* L. e verificada as atividades antioxidante e antimicrobiana do OE. Foi realizado o teste de solubilidade do OE para posterior utilização nos demais experimentos; foi determinada a atividade antioxidante do OE e, posteriormente, o desenvolvimento da nanoemulsão. Para a obtenção da formulação final, foi determinado o valor de EHLr do óleo, foram testados diferentes pares de tensoativos e, por fim, variando as concentrações de OE para obtenção da formulação final. Foi realizada a atividade antimicrobiana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Cutibacterium acnes*, tanto como o OE, quanto para a nanoemulsão e, por fim, o teste de estabilidade da nanoemulsão obtida. O OE se apresentou como muito solúvel na maioria dos solventes testados e seu valor de EHLr foi de 15,0. A nanoemulsão obtida apresentou tamanho médio entre 13 e 20 nm, mantendo-se estável em geladeira e à temperatura ambiente, frente aos parâmetros de tamanho médio, PDI e Potencial Zeta. O valor de EC₅₀, frente ao radical DPPH[•], foi determinado como 2,56 mg/mL. Na análise da capacidade antioxidante equivalente ao trolox (TEAC), frente ao radical ABTS^{•+}, obteve-se o valor de 0,00026 μ M Trolox/mg de óleo. A nanoemulsão se apresentou satisfatória frente ao microrganismo *C. acnes*. A nanoemulsão apresenta um potencial para ser utilizada para o cuidado da acne.

Palavras-chave: *Achillea millefolium* L.; nanoemulsão; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; acne.

ABSTRACT

Achillea millefolium L. is a plant species native to Europe, widely used for its antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant effects, being popularly known in Brazil as a thousand leaves. The essential oil (EO) of *A. millefolium* L. has, in its composition, azulene, borneol, cineole, camphor, proazulene, eucalipitol, guaiaol and β -caryophyllene, whose particularity is its blue expression, which is due to the presence of azulenic sesquiterpenes. Acne is a chronic inflammation of the hair follicle, which appears at puberty, when hair follicles and levels are at their highest peak of development. Topical care is used, since the most adverse effects are smaller compared to systemic treatments. The skin is highly rich in lipids which, in turn, hinder the absorption of hydrophilic vehicles. Considering this characteristic of the skin, the best care options are nanoemulsions, continuous lipid nanoparticles and nanostructured lipid transporters. One was developed for this, with *millefolium* L. essential oil and verified as antioxidant and antimicrobial activities of the EO. The EO solubility test was carried out for later use in the other experiments; the activity of the antioxidant EO was determined and, later, the development of the nanoemulsion. To guarantee the final formulation, the HLB value of the oil was determined, different surfactants were tested and, finally, varying as the guarantee of EO for the final formulation. An antimicrobial activity was performed against the strains of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Cutibacterium acnes*, both as EO and the nanoemulsion and, finally, the stability test of the nanoemulsion. The EO was very soluble in most of the solvents tested and its EHLr value was 15.0. The nanoemulsion presented an average size between 13 and 20 nm, remaining stable in relation to room temperature, in relation to the parameters of average size, PDI and Zeta Potential. The EC_{50} value, against the DPPH[•] radical, was determined as 2.56 mg/mL. The analysis of the equivalent antioxidant capacity (TEAC) against the radical ABTS^{•+} resulted in the value of 0.00026 μ M Trolox/mg of oil. The nanoemulsion presents itself against the microorganism *C. acnes*. The nanoemulsion has the potential to be used for acne care.

Keywords: *Achillea millefolium* L; nanoemulsion; antioxidant activity; antimicrobial activity; *acne*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura da pele humana.....	21
Figura 2 – <i>Achillea millefolium</i> L. com flor.....	24
Figura 3 – Sistema de preparo das formulações.....	35
Figura 4 – Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana das cepas <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> para o óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L.....	38
Figura 5 – Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana das cepas <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> para a nanoemulsão obtida.....	39
Figura 6 – Análise de solubilidade do óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L. em diferentes solventes.....	42
Figura 7 – Óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L.....	43
Figura 8 – Curva analítica do radical DPPH [•]	45
Figura 9 – Curva de inibição do radical DPPH [•] pelo óleo de <i>A. millefolium</i> L.....	46
Figura 10 – Diluição seriada do óleo de <i>A. millefolium</i> L. após inibição pelo radical DPPH [•]	46
Figura 11 – Curva analítica do Trolox.....	48
Figura 12 – Diluição seriada do óleo de <i>A. millefolium</i> L. após inibição pelo radical ABTS ^{•+}	48
Figura 13 – Curva de inibição do radical ABTS ^{•+} pelo óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L.....	49
Figura 14 – Formulações para a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.....	51
Figura 15 – Formulações para a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.....	52

Figura 16 – Formulações estáveis após a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.....	52
Figura 17 – Formulações (F1 a F8), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos.....	54
Figura 18 – Formulações (F9 a F16), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos.....	55
Figura 19 – Formulações (F17 a F24), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos.....	56
Figura 20 – Formulações finais com percentuais de OE, de 0,25 a 1,75%.....	58
Figura 21 – Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula por intensidade percentual da formulação F4.....	59
Figura 22 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	60
Figura 23 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) da nanoemulsão NE-MF, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	61
Figura 24 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepa de <i>S. aureus</i> na técnica de difusão em ágar, usando <i>template</i>	62
Figura 25 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do controle e óleo respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepa de <i>S. epidermidis</i> na técnica de <i>template</i>	62
Figura 26 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) da nanoemulsão, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> na técnica de difusão em ágar, usando <i>template</i>	63

Figura 27 – Concentração inibitória mínima (CIM) do controle e do óleo, respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de <i>C. acnes</i> na técnica de difusão em ágar pela técnica de <i>template</i>	65
Figura 28 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos controles de peróxido de benzoila 75%, ácido azelaico e a nanoemulsão, respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de <i>C. acnes</i> na técnica de <i>template</i>	66
Figura 29 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 7 dias, submetidas às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2^\circ \text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$)	68
Figura 30 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 21 dias, submetidas às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2^\circ \text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$)	68
Figura 31 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 35 dias, submetidas às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2^\circ \text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$)	69
Figura 32 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 63 dias, submetidas às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2^\circ \text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$)	69
Figura 33 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 90 dias, submetidas às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2^\circ \text{C}$), geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5^\circ \text{C}$)	70

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição da solubilidade de acordo com a quantidade de partes de solvente adicionadas à amostra.....	31
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de tensoativos utilizados para o preparo das nanoemulsões.....	36
Tabela 2. Solubilidade do óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L. em diferentes solventes.....	42
Tabela 3. Caracterização química percentual do óleo essencial da <i>A. millefolium</i> ...	44
Tabela 4. Composição percentual das formulações para determinação do EHLr....	51
Tabela 5. Tamanho médio das formulações de EHLr 15 e EHLr 14.....	53
Tabela 6. Composição percentual das formulações F1 a F8.....	54
Tabela 7. Composição percentual das formulações F9 a F16.....	55
Tabela 8. Composição percentual das formulações F17 a F24.....	56
Tabela 9. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) das formulações F3, F8, F10, F11, F13 e F14, em DLS.....	57
Tabela 10. Composição percentual das formulações finais com percentuais de OE, de 0,25 a 1,75%.....	58
Tabela 11. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) das formulações F1, F2, F3, F3 e F5.....	59
Tabela 12. Concentrações Inibitórias mínimas do óleo essencial e da nanoemulsão NE-MF obtida.....	61
Tabela 13. Tamanho médio de gotícula $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	70
Tabela 14. Valor médio de PDI $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	71
Tabela 15. Potencial Zeta médio $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	71
Tabela 16. Valores médios de pH $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABTS^{•+} - (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DLS – Espalhamento dinâmico da luz

DPPH[°] - (2,2 difenil-1-picril-hidrazila)

EHLr – Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo Requerido

g – gramas

nm – nanômetro

mV – milivolt

mg/mL – miligramas por mililitro

mm – milímetro

mM – micromolar

mL – mililitro

µL – microlitro

rpm – Rotações por minuto

TEAC – Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

T20 – Polysorbate 20

T40 – Polysorbate 40

T85 – Polysorbate 85

v/v – volume/volume

UFC – Unidades formadoras de colônia

°C – Graus Celsius

pH – potencial hidrogênioônico

PAWS – PPG-5-Ceteth-20

P6MO – PEG 6 Oleate

P4MO – PEG 4 Oleate

P6DO – PEG 6 Dioleate

P4DO – PEG 4 Dioleate

S80 – Monoleato de sorbitano

S85 – Trioleato de sorbitano

OE – Óleo essencial

PDI – Índice de polidispersão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. A pele.....	19
2.1.1. <i>Cutibacterium acnes</i>	20
2.2. <i>Achillea millefolium</i> L.....	21
2.3. Óleo essencial da <i>Achillea millefolium</i> L.	22
2.4. Nanotecnologia em cosméticos	23
2.4.1. Nanoemulsões.....	23
2.4.2. Métodos de obtenção.....	24
3. OBJETIVOS	25
3.1. OBJETIVO GERAL	25
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1. Material.....	26
4.2.2. Determinar a solubilidade do óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L.	28
4.2.4. Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de <i>A. millefolium</i> L.;	30
4.2.5. Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr).....	31
4.2.6. Obter as nanoemulsões	32
4.2.7. Avaliar a influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação	33
4.2.8. Caracterizar as nanoemulsões pelo espalhamento dinâmico da luz.....	34
4.2.9. Avaliar o potencial antimicrobiano	35
4.2.9.3. Difusão em ágar por template.....	37
4.2.9.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM)	38
4.2.10. Avaliar a estabilidade física da nanoemulsão obtida.....	39
4.2.11. Análise estatística dos resultados	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES	73
REFERENCIAS.....	74
APENDICE A	85
APENDICE B	86

1. INTRODUÇÃO

A pele é constituída de camadas de células que se diferenciam e impedem ou dificultam a absorção de ativos; entretanto, o uso tópico é o mais utilizado, uma vez que os efeitos colaterais são menores em relação ao uso sistêmico, sendo menos agressivo para o organismo.

Quando íntegra, neutraliza a absorção de xenobióticos, ou seja, substâncias químicas estranhas ao organismo humano. Desta forma, para resultados mais eficientes em tratamentos para acne, faz-se necessária a utilização de sistemas carreadores, visto que a pele é altamente rica em lipídeos que, por sua vez, dificultam a absorção de veículos hidrofílicos.

A acne é uma inflamação crônica do folículo piloso que aparece na puberdade, quando os folículos pilosos e os níveis hormonais estão em pico maior de desenvolvimento. A perda de autoestima e a rejeição social são uns dos efeitos que essa inflamação pode causar, uma vez que pode desfigurar o rosto do paciente em graus avançados, o que muitas vezes gera problemas psicológicos e prejuízo social ao indivíduo acometido, sendo necessário evitar ou suavizar essa situação.

A etiologia dessa patologia está relacionada a fatores genéticos, hormonais, dietéticos e psicológicos, podendo, ou não, ser de forma combinada. A ingestão exagerada de alimentos com potencial glicêmico elevado leva o organismo a um aumento de insulina que, por sua vez, causa um desequilíbrio hormonal, favorecendo então o surgimento da acne.

Popularmente conhecida como mil folhas, a *A. millefolium* L. é uma espécie vegetal facilmente encontrada em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil, devido à sua facilidade de adaptação. Muito utilizada pela população na medicina tradicional e com diversas atividades biológicas descritas na literatura.

Uma particularidade de seu óleo essencial é a coloração azul, que se dá pela presença de sesquiterpenos azulênicos que se encontram em abundância em sua composição já descritos na literatura. Dentre estes compostos, o azuleno é a principal

substância com atividade antiacneica, sendo o composto de principal interesse para essa finalidade.

As substâncias presentes no óleo essencial de *A. millefolium* L são de classes biológicas importantes, com estudos já relatados na literatura, que demonstram a efetividade da *A. millefolium* L. contra o *C. acnes* como, também, *S. epidermidis* e *S. aureus*, o que mostra a capacidade do óleo essencial em tratar não somente o agente etiológico da acne, mas, também, evitar que as demais bactérias patógenas oportunistas, que podem causar co-infecções e piorar o estado das lesões acneicas na pele do indivíduo.

A nanoemulsão é um sistema vantajoso se comparado com emulsões na escala convencional por ser uma opção mais viável, para encapsulação de substâncias que possuem baixa solubilidade em meios aquosos. Essa estratégia permite a obtenção de um produto aquoso com menores quantidades de ativos cosméticos.

O custo de produção do cosmético é menor, devido à facilidade de encapsulação de menores quantidades de substâncias ativas, tornando o processo mais sustentável e mais rentável para a manufatura industrial.

Considerando as características da pele, as melhores opções de tratamento tópico são as nanoemulsões, as nanopartículas lipídicas sólidas e os transportadores lipídicos nanoestruturados.

O mercado cosmético é um dos mercados cujo desenvolvimento é o mais dinâmico do mundo. Com aumento global nas vendas de produtos para cuidados com a pele com percentual de crescimento, cada vez mais considerável, ao passar dos anos. A procura por cosméticos de origem natural nas formulações cosméticas tem sido um forte critério de escolha, na aquisição de um produto cosmético.

O objetivo desta pesquisa foi a obtenção da nanoemulsão com óleo essencial de *A. millefolium* L., tendo como foco principal o efeito antimicrobiano contra o *C. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*, sendo uma alternativa natural aos cuidados convencionais utilizados para o cuidado da acne, algo bastante conveniente, pois há

escassez de produtos com essa tecnologia, usando o óleo essencial de *A. millefolium* L.

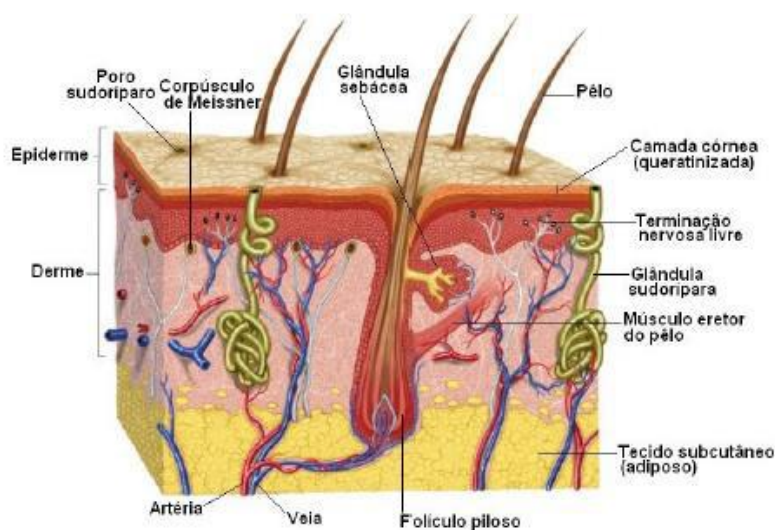
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A pele

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano. Atua como proteção do corpo, regula a temperatura corporal e possui uma microbiota composta por bactérias, fungos e vírus (Grice; Segre, 2013). Previne o corpo contra radiações variadas e protege os tecidos corporais e seus fluidos (Camargo, 2008). Possui vários receptores para pressão, tato, temperatura e dor. Sua extensão apresenta variações de espessuras e nos valores de pH, que é regulado pela secreção das glândulas sudoríparas (Figueiredo, 2019; Corrêa, 2012). Histologicamente, a pele é dividida em duas camadas: a epiderme e a derme, Abaixo da derme apresenta um tecido subcutâneo formado por tecido adiposo (Fernandes, 2016; Lyra, 2019).

A Figura 1 representa as camadas da pele e seus anexos.

Figura 1 – Representação da estrutura da pele humana.



Fonte: Pereira (2011).

A espessura da pele varia de acordo com a parte do corpo, podendo se apresentar de 1,5 mm nas palmas das mãos, nos joelhos, na planta dos pés e nos cotovelos, até 0,06 mm na face (Pereira, 2011; Lyra, 2019).

A microbiota existente na pele em equilíbrio, é responsável pelo bem-estar humano; porém, quando em desequilíbrio, é responsável por diversas doenças. Pode-se encontrar até 1 bilhão de bactérias para cada cm² de pele (Grice *et al*, 2008). De acordo com a região da pele em que se estuda, é possível encontrar grupos específicos de microrganismos como no nariz, boca e vagina. Além da microbiota natural da pele, ressalta-se a existência da microbiota transitória, que permanecem por poucas horas ou dias, pois a competição com os microrganismos residentes, impede que a microbiota transitória permaneça na pele por mais tempo. Os microrganismos da microbiota da pele são principalmente os dos gêneros *Staphylococcus*, *Propionibacterium* (*Cutibacterium*), *Micrococcus* e *Corynebacterium* (Lyra, 2019).

2.1.1. *Cutibacterium acnes*

A acne é uma doença inflamatória do folículo piloso que aparece na puberdade; quando os folículos pilosos e os níveis hormonais estão em pico maior de desenvolvimento. Em adolescentes, sua incidência varia entre 30 – 66%. Sua causa é multifatorial, incluindo o aumento da seborreia, a hiperqueratinização ductal epidérmica e a hipercolonização por *C. acnes* (Lyra, 2019).

O gênero *Propionibacterium acnes* foi renomeado recentemente como *Cutibacterium acnes* para explicar alterações adaptativas genômicas e diferenciá-la de outras espécies de *Propionibacteria*. (Platsidaki & Dessinioti, 2018). A *C. acnes* é um bacilo anaeróbio Gram-positivo, que reside em porções profundas dos folículos sebáceos saudáveis em contato com queratinócitos foliculares. Apresenta crescimento lento, sendo um comensal sobre a pele que, em contato com os poros epiteliais, promove a inflamação dos folículos pilosos, o que vem a provocar lesões também conhecidas como espinhas. Na pele adulta, é um dos principais habitantes da pele humana saudável e, geralmente, é considerado inofensivo (Perry; Lambert, 2006; Lyra, 2019).

2.2. *Achillea millefolium* L.

Também conhecida popularmente como mil folhas, pertence à família *Asteraceae* e trata-se de uma espécie vegetal herbácea, rizomatosa com altura entre 30 e 60 cm (Serpa, 2011; Ayoobi *et al.*, 2017). É nativa da Europa, Ásia e Turquia; porém, atualmente é facilmente encontrada em várias regiões do mundo, inclusive no Brasil devido a sua facilidade de adaptação. Muito utilizada na medicina popular para os efeitos antimicrobiano, antiinflamatório e antioxidante. Os flavonoides e os ácidos fenolcarbonicos são compostos fenólicos importantes em sua composição química. Seu óleo essencial apresenta em sua composição o azuleno, borneol, cineol, cânfora, proazuleno, eucalipitol, guaiol e β -cariofileno (Zirolto *et al.*, n.d.).

A Figura 2 representa a *A. millefolium* L. que estava em cultivo na Casa Espirita Terra de Ismael, localizada na Rodovia Vicinal José Riul, km 2 Jurucê - Jardinópolis – SP, CEP 14680-000, junto as coordenadas 21°04'16.2" Sul e 47°44'11.2" Oeste.

Figura 2 – *A. millefolium* L. com flor.



Fonte: Elaborado pela autora.

Algumas estratégias de plantio podem ser aplicadas para aumentar o rendimento, tais como a época de plantio e o espaçamento entre uma planta e outra. A melhor época para plantio é entre os meses de maio a junho. Mediante a um cultivo

padronizado, podem ser realizadas até quatro colheitas por ano de cultura, o que permite um escalonamento a nível industrial (Netto e Raffaelli, 2004).

Tradicionalmente, a *A. millefolium* L., é amplamente utilizada para tratar ferimentos, como feridas, cortes e escoriações (Abascal, 2006; Shah *et al.*, 2015). Partindo dessa utilização, essa espécie vegetal foi alvo de estudos para a possibilidade de atividade antiacneica, mediante os efeitos notados de rejuvenescimento da pele (Shah *et al.*, 2015).

2.3. Óleo essencial da *Achillea millefolium* L.

O óleo essencial de *A. millefolium* L. pode apresentar variações em sua coloração. Os tons variam de azulado a amarelo acastanhado, que depende de sua floração. Quando os botões estão fechados, tendem a apresentar a coloração azulado; já com o botão semiaberto, tende a apresentar a coloração azul esverdeado. Quando possui flores abertas tendem a apresentar a coloração castanho amarelado e, por fim, quando a flor está completamente seca, apresenta-se na cor amarelo acastanhado (Sousa, 2017). A composição química e as atividades biológicas do óleo essencial de *A. millefolium* L. variam de acordo com a região em que é cultivada (El-Kalamouni *et al.*, 2017).

Dentre os compostos majoritários do óleo essencial de *A. millefolium* L., os principais identificados em estudos conhecidos são: cânfora, borneol, α -terpineol, eucaliptol, óxido de cariofileno, γ -muuroleno, γ -eudesmol, β -eudesmol, espatulenol, germacreno D, γ -gurjuneno, azuleno, guaiol, cineol e proazuleno (ZIROLDI *et al.*, 2011; (HOWYZEH *et al.*, 2019).

O óleo essencial apresenta efeitos de redução da aparência dos poros da pele e aumento da espessura epidérmica, o que desencadeia um efeito rejuvenescedor em pele madura, melhorando a aparência e as linhas de expressão. Existem também estudos que demonstram a efetividade da *A. millefolium* L. contra o *C. acnes* como, também, *S. epidermidis* e *S. aureus*, o que mostra a capacidade do óleo essencial em tratar não somente o agente etiológico da acne, mas, também, evitar que as demais

bactérias patógenas oportunistas, que podem causar co-infecções e piorar o estado das lesões acneicas na pele do indivíduo.

2.4. Nanotecnologia em cosméticos

A nanotecnologia vem sendo amplamente utilizada na indústria cosmética e farmacêutica, visto que, é uma ciência inovadora dedicada, à produção e caracterização de sistemas capazes de ter a forma e o tamanho das partículas em escala nanométrica (Figueiredo, 2019). Essa tecnologia permite que uma formulação cosmética tenha menor quantidade de ativos em sua composição, além de aumentar a estabilidade do produto (Katz *et al.*, 2015). Os nanossistemas a base de lipídeos vem demonstrando uma boa opção para produtos de uso tópico. A estabilidade, a biocompatibilidade e a liberação eficaz de ativos são pontos que apresentam resultados satisfatórios nesse tipo de sistema (Santos *et al.*, 2019).

2.4.1. Nanoemulsões

As nanoemulsões são sistemas dispersos de gotículas pequenas de dois líquidos imiscíveis (Solans *et al.*, 2005). Apresenta tamanho de gotícula entre 20 a 500 nm, formados por um surfactante e um co-surfactante, necessitando de energia para a sua formação (Jesus *et al.*, 2017; McClements, 2018). Além de apresentarem escala nanométrica, são cineticamente estáveis, ou seja, não se formam espontaneamente, pois necessitam de energia para o processo de emulsificação. Além de apresentarem estabilidade termodinâmica (Qian *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2019). Outra vantagem desse sistema é a capacidade de encapsular e liberar componentes bioativos lipofílicos (Qian *et al.*, 2012).

As nanoemulsões apresentam aparência tipicamente translúcida a olho nu, podendo ter reflexos azulados intensos ou leitosos. Podem, ainda, apresentar a redução da cremação, floculação e sedimentação no período de seu armazenamento (Figueiredo, 2019; Solans *et al.*, 2005).

A escolha da metodologia do preparo é importante para a formação e a estabilidade do sistema, visto que sua formação não é espontânea, necessitando de energia, podendo ser, por baixo ou alto aporte, para a emulsificação (Gupta *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2019).

São sistemas vantajosos se comparados com emulsões na escala convencional, por serem mais estáveis e apresentarem menor toxicidade (Jesus *et al.*, 2017). Com o avanço da nanotecnologia, cada vez mais as nanoemulsões têm sido usadas com maior frequência em produtos cosméticos, mediante a possibilidade de direcionamento dos ativos e a sua possibilidade de liberação controlada.

2.4.2. Métodos de obtenção

As nanoemulsões podem ser obtidas por metodologias que consistem em utilização de baixo e alto aporte de energia. Nas metodologias de baixo aporte de energia, são utilizadas as propriedades físico-químicas do sistema para a formação de gotículas. São metodologias mais baratas, em comparação ao alto aporte. São utilizados equipamentos de baixo custo e permitem a formação de gotículas pequenas, apenas usando a energia química do sistema (Solans; Solé, 2012; Duarte, 2019). Já a metodologia de alto aporte de energia, são utilizados homogeneizadores de alta velocidade, (Adhavan *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2017), ultra-sonicadores (Hashemigahruie *et al.*, 2017) e microfluidizadores (Artiga-Artigas; Lanjari-Pérez; Martín-Belloso, 2018).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Obtenção de nanoemulsão contendo óleo essencial de *A. millefolium* L. para o cuidado da acne e de outros patógenos oportunistas residentes na pele.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir o óleo essencial de folhas de *A. millefolium* L.;
- Determinar a solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L.;
- Caracterizar, quimicamente, por CG-EM, o óleo essencial de folhas de *A. millefolium* L.;
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. millefolium* L.;
- Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) do óleo essencial de *A. millefolium* L.;
- Obter as nanoemulsões;
- Caracterizar as nanoemulsões em DLS;
- Avaliar o potencial antimicrobiano contra *C. acnes*, *S. epidermidis* e *S. aureus*.
- Avaliar a estabilidade da nanoemulsão obtida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

- Óleo Essencial de *Achillea millefolium*
Fornecedor: Lazlo
- Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])
Fabricante: Sigma
- Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})
Fabricante: Sigma
- Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico)
Fabricante: Sigma
- Polysorbate 20
Fornecedor: Synth
EHL: 16,7
- Polysorbate 40
Fornecedor: Croda
EHL:15,6
- Polysorbate 80
Fornecedor: Synth
EHL: 15
- Polysorbate 60
Fornecedor: Sigma
EHL: 14,9
- PEG-6 Oleate

Fornecedor: Praid
EHL: 13

- Polysorbate 85
Fornecedor: Croda
EHL: 11

- PEG-4 Oleate
Fornecedor: Praid
EHL: 11

- PEG-6 Dioleate
Fornecedor: Praid
EHL:10

- PEG-4 Dioleate
Fornecedor: Praid
EHL: 8,5

- Sorbitan oleate
Fornecedor: Croda
EHL: 4,3

- Sorbitan trioleate
Fornecedor: Praid
EHL: 1,8

4.2. Métodos

4.2.1. Obter o óleo essencial de *A. millefolium* L.

A espécie vegetal utilizada no início do projeto, foi doação da Casa Espírita Terra de Ismael, localizada na Rodovia Vicinal José Riul, km 2 Jurucê - Jardinópolis – SP, CEP 14680-000, cujas coordenadas são 21°04'16.2" Sul e 47°44'11.2" Oeste.

Para a extração do óleo essencial, foram utilizadas folhas secas em aparelho do tipo Clevenger, com um balão de fundo redondo, com capacidade de 4 litros. As folhas foram adicionadas dentro do balão e recobertas com água. O balão foi colocado sobre uma manta aquecedora. O óleo essencial foi extraído por um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição. Após o término da extração, o óleo essencial foi centrifugado por 10 minutos. Em seguida, foi retirado o óleo essencial, que foi acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado ao abrigo da luz sob refrigeração (4 °C) (Guimarães *et al.*, 2008).

No decorrer dos experimentos, mediante a dificuldade de encontrar a quantidade de espécie vegetal suficiente para todo o desenvolvimento da pesquisa, foi necessário adquirir óleo essencial comercialmente.

O óleo essencial foi adquirido comercialmente do fornecedor “LASZLO”, com a razão social Koscky Produção e Arte LTDA; inscrito no CNPJ: 23.727.171/0002-1. O óleo essencial acompanha análise cromatográfica realizada pelo Laboratório de Cromatografia da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG. A análise cromatográfica consta em anexo neste documento. Lote do fornecedor: LZ 2800. Val: 09/23.

4.2.2. Determinar a solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L.

A solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L. foi avaliada conforme descrito na Farmacopeia Brasileira - 5ª Edição. Para a análise da solubilidade do óleo foram utilizados 100 µL do óleo e adicionados 100 µL do solvente, sempre repetindo a adição do solvente para avaliar a solubilidade.

Foram utilizados os solventes: Etanol PA, Metanol PA, Isopropanol PA, Etanol 70% (v/v), Clorofórmio PA e Acetona PA na execução do teste.

O grau de solubilidade foi avaliado conforme o quadro 1.

Quadro 1. Descrição da solubilidade de acordo com a quantidade de partes de solvente adicionadas à amostra.

Solvente	Número de partes
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel	Acima de 10000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição, 2010.

4.2.3. Caracterizar quimicamente, o óleo essencial de *A. millefolium* L.

A composição química dos constituintes voláteis do óleo essencial de *A. millefolium*, foi identificada utilizando um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrofotômetro de massas (CG-EM – QP2020 – Shimadzu®, usando detector de massas com ionização por impacto de elétrons (70 e⁻V). A amostra foi diluída em hexano na concentração de 1:100 mg/μL e injetado 1 μL dessa diluição em coluna SH-Rtx-5MS (5% difenil / 95% dimetilpolisiloxano) com dimensão de 30 m (comprimento) x 0,25mm (I.D.) x 0,25μm (espessura do filme).

Foram utilizadas as seguintes condições cromatográficas: temperatura de injeção, 260 °C; temperatura do detector, 250 °C; gás de arraste Hélio com fluxo de 1 mL/min e modo de injeção split com razão 1:10. A temperatura do forno foi mantida inicialmente a 70 °C e, posteriormente, elevada, gradualmente, até 250 °C, utilizando rampa de aquecimento de 3 °C/min.

Para a definição do índice de retenção (IR) das substâncias, foi considerado no cálculo a interpolação do tempo de retenção de um padrão de carbonos alifáticos (C7-C40) (Sigma®), analisado nas mesmas condições das amostras. Para identificação de

cada componente, foi comparado na literatura o IR e espectros de massas descritos na literatura (Adams, 2017).

4.2.4. Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. millefolium* L.

4.2.4.1. Inibição do radical DPPH[•]

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da atividade sequestradora do radical DPPH[•] (2,2 difenil-1-picril-hidrazila) (Rufino *et al.*, 2007, com modificações).

Inicialmente, foi realizada a curva analítica do radical DPPH[•] em metanol PA, variando a concentração de 10 µM a 60 µM. Posteriormente, foram preparadas cinco diluições do óleo essencial em triplicata, nas concentrações 0,250; 0,500; 1,000; 2,000 e 4,000 mg/mL. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL da solução do óleo essencial para um tubo de ensaio com 3,9 mL de radical DPPH[•]. Para o branco da cor, foi adicionada, a um tubo, a solução mais concentrada do óleo sem a solução de radical DPPH[•]. As soluções foram mantidas ao abrigo da luz, em repouso, por 30 minutos. Após essa pausa, foi utilizado álcool metílico como branco para calibrar o espectrofotômetro, e as leituras realizadas a 515 nm, em espectrofotômetro SPECTROstar Nano® - BMG Labtech.

A partir das leituras das absorbâncias obtidas, das diferentes diluições do óleo, foi construído um gráfico da absorbância *versus* diluições (mg/mL), e determinada a equação da reta. Para calcular a atividade antioxidante, foi substituída a absorbância equivalente a 50% da concentração do radical DPPH[•] e calculado o resultado que corresponde à amostra necessária para reduzir em ou a 50% a concentração inicial do radical DPPH[•].

4.2.4.2. Inibição do radical ABTS^{•+}

A avaliação da atividade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L. foi realizada por meio da metodologia de captura do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), (Rufino *et al.*, 2007b, com modificações). Inicialmente, foi preparado o radical ABTS^{•+}, a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL de solução de persulfato de sódio (140 mM). A mistura

foi mantida sob o abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida, 1 mL dessa mistura foi diluída em etanol absoluto, até se obter uma absorbância de $0,70 \pm 0,05$, a 734 nm.

Posteriormente, foi realizada a curva analítica do Trolox, em etanol absoluto, em cinco diferentes concentrações (100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM). Uma alíquota de 30 μL de cada concentração foi transferida para tubos de ensaio, contendo 3,0 mL da solução de radical ABTS^{•+} e homogeneizados em agitador de tubos. A leitura da absorbância foi realizada a 734 nm, em espectrofotômetro SPECTROstar Nano® - BMG Labtech, após 6 minutos da mistura.

Para avaliação da atividade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L., soluções de óleo, em etanol absoluto, foram preparadas nas concentrações 0,03125; 0,0625; 0,1250 e 0,2500 mg/mL, em triplicata. Em seguida, uma alíquota de 30 μL de cada concentração foi transferida para tubos de ensaio contendo 3,0 mL da solução de radical ABTS^{•+} e homogeneizados. A leitura das absorbâncias também foi realizada a 734 nm, após 6 minutos da mistura. Para o branco da cor, foram utilizados 30 μL da solução de maior concentração do óleo e 3 mL de etanol absoluto.

Os resultados obtidos foram plotados em um gráfico da absorbância pela concentração de óleo de *A. millefolium* L. e a equação da reta foi utilizada para calcular o valor da capacidade antioxidante equivalente em Trolox ou TEAC.

4.2.5. Determinar o equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr)

Para a determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHLr) do óleo essencial de *A. millefolium* L., foram preparadas emulsões com diferentes quantidades dos tensoativos Tween 85® (T85), Tween 20® (T20), Procetyl AWS (PAWS), Tween 80® (T80) e Span 80® (S80), a fim de se obter várias formulações com uma ampla faixa de EHL.

O EHLr foi calculado segundo a equação:

$$\text{EHLr} = \frac{\text{EHL}_A \times A\% + \text{EHL}_B \times B\%}{100}$$

Onde:

EHL_r é o valor de EHL resultante da mistura de dois tensoativos

EHL_A é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofóbico

EHL_B é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofílico

A% é o percentual do tensoativo mais hidrofóbico

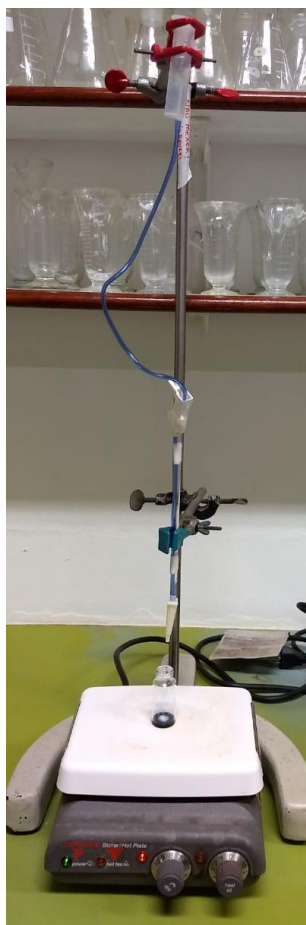
B% é o percentual do tensoativo mais hidrofílico

$A\% + B\% = 100\%$ da concentração de tensoativo

4.2.6. Obter as nanoemulsões

Para a obtenção das nanoemulsões, foi utilizado o método EPI – *Emulsion Phase Inversion*, quando os tensoativos são solubilizados na fase oleosa. Posteriormente, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa em agitação constante, a 870 rpm, até a completa homogeneização, em agitador magnético (Corning - stirrer/hot plate) (Agostinho, 2017). Os tensoativos foram homogeneizados, inicialmente, com o óleo, por 30 minutos e, em seguida, foi adicionada a água gota a gota lentamente, e homogeneizados por 60 minutos. As formulações foram deixadas em repouso, por 24 horas, para verificação dos parâmetros macroscópicos de estabilidade (Jesus *et al.*, 2017), tendo como parâmetro a presença de formação de cremagem, coalescência, precipitação e separação de fases.

Figura 3 – Sistema de preparo das formulações.



Fonte: Elaborado pela autora.

4.2.7. Avaliar a influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação

Após a definição do valor de EHLr, foram utilizados 24 pares de tensoativos para o preparo das formulações. Os pares utilizados para a preparação das formulações, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Pares de tensoativos utilizados para o preparo das nanoemulsões.

Tensoativo 1	EHL	Tensoativo 2	EHL	Formulação
Polysorbate 20	16,7	Polysorbate 60	14,9	F1
Polysorbate 20	16,7	PEG 6 Oleate	13	F2
Polysorbate 20	16,7	PEG 4 Oleate	11	F3
Polysorbate 20	16,7	Polysorbate 85	11	F4
Polysorbate 20	16,7	PEG 6 Dioleate	10	F5
Polysorbate 20	16,7	PEG 4 Dioleate	8,5	F6
Polysorbate 20	16,7	Monoleato de sorbitano	4,3	F7
Polysorbate 20	16,7	Sorbitan Trioleate	1,8	F8
PPG-5-Ceteth-20	16	Polysorbate 60	14,9	F9
PPG-5-Ceteth-20	16	PEG 6 Oleate	13	F10
PPG-5-Ceteth-20	16	PEG 4 Oleate	11	F11
PPG-5-Ceteth-20	16	Polysorbate 85	11	F12
PPG-5-Ceteth-20	16	PEG 6 Dioleate	10	F13
PPG-5-Ceteth-20	16	PEG 4 Dioleate	8,5	F14
PPG-5-Ceteth-20	16	Monoleato de sorbitano	4,3	F15
PPG-5-Ceteth-20	16	Sorbitan Trioleate	1,8	F16
Polysorbate 40	15,6	Polysorbate 60	14,9	F17
Polysorbate 20	15,6	PEG 6 Oleate	13	F18
Polysorbate 20	15,6	PEG 4 Oleate	11	F19
Polysorbate 20	15,6	Polysorbate 85	11	F20
Polysorbate 20	15,6	PEG 6 Dioleate	10	F21
Polysorbate 20	15,6	PEG 4 Dioleate	8,5	F22
Polysorbate 20	15,6	Monoleato de sorbitano	4,3	F23
Polysorbate 20	15,6	Sorbitan Trioleate	1,8	F24

Fonte: Elaborado pela autora.

Após o término do preparo, as nanoemulsões permaneceram 24 horas em repouso, para avaliação macroscópica dos parâmetros de estabilidade: formação de cremagem, coalescência, precipitação e separação de fases.

4.2.8. Caracterizar as nanoemulsões pelo espalhamento dinâmico da luz

As nanoemulsões obtidas foram caracterizadas pelo espalhamento dinâmico da luz (DLS) pelo equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern, UK. As amostras foram diluídas com água deionizada na proporção de 1:25 v/v, em triplicata. Foram registrados os dados de: tamanho das gotículas, o índice de polidispersão e o

potencial zeta, que foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (Jesus *et al.*, 2017). Os gráficos de distribuição do tamanho de gotícula, por intensidade populacional, foram obtidos pelo próprio software do equipamento (Zetasizer software – Malvern).

4.2.9. Avaliar o potencial antimicrobiano

4.2.9.1. Preparo do inóculo

Foram utilizados meio de cultura e caldo Mueller Hinton, para a manutenção dos microrganismos e execução dos ensaios. Os meios foram preparados de acordo com a orientação do fabricante. As cepas padrão utilizadas na execução dos ensaios foram: *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 2593) e *Cutibacterium acnes* (ATCC 2592) (Ostrosky, 2007).

As culturas de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram retiradas do freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, transferidas para o caldo de manutenção e permaneceram, para seu desenvolvimento, em estufa microbiológica à temperatura de $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, antecedentes à execução do ensaio. O inóculo foi padronizado em escala de McFarland até obterem um índice de turbidez de 0,5; o que equivale a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) /mL.

A cultura de *C. acnes* foi retirada do freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, transferida para o caldo de manutenção e permaneceu, para seu desenvolvimento, em jarra de anaerobiose, em estufa microbiológica à temperatura, de $37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 48 horas, antecedentes à execução do ensaio. O inóculo foi padronizado em escala de McFarland até obterem um índice de turbidez de 0,5; o que equivale a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) /mL.

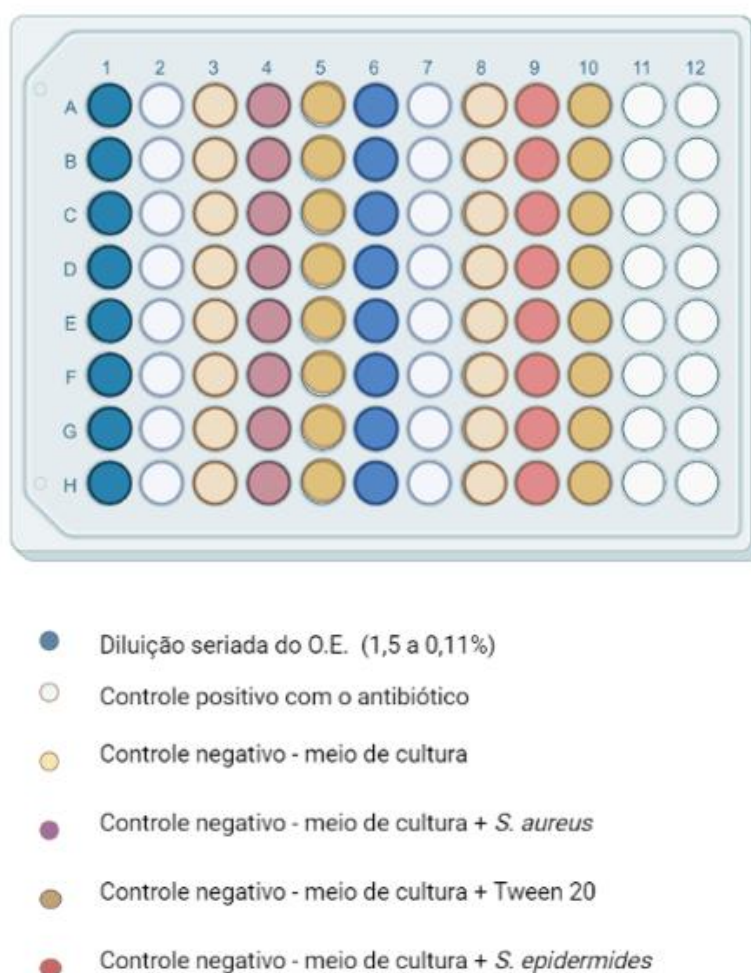
4.2.9.2. Determinar a Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana qualitativa foi realizada pela metodologia de difusão em ágar, na qual foi avaliado o tamanho da zona de inibição, frente aos microrganismos *S. epidermidis*, *S. aureus* e *C. acnes*. Foi avaliada, também, pela técnica de Concentração Inibitória Mínima (CIM), os microrganismos *S. aureus* e *S.*

epidermidis (Lyra, 2019; CLSI; 2018). Os testes foram realizados tanto para o óleo essencial quanto para a nanoemulsão. A *C. acnes* não foi avaliada pela técnica de Concentração Inibitória Mínima, uma vez que a placa de 96 poços não coube na jarra de anaerobiose, sendo apenas testada com a técnica de difusão em ágar por *template*.

Para este ensaio, foram utilizados os delineamentos das placas conforme as figuras 04 e 05.

Figura 04 – Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana das cepas *S. aureus* e *S. epidermidis* para o óleo essencial de *A. millefolium* L.



Fonte: Elaborado pela autora

A partir do delineamento anterior, foram obtidos os resultados para cada cepa, expressos em CIM ou CBM. A CIM, Concentração Inibitória Mínima, define a menor

concentração inibitória visível do microrganismo estudado; já a CBM, concentração Bactericida Mínima, é a menor concentração que mata 99,99% das bactérias (CLSI, 2015).

Figura 05 – Delineamento utilizado para análise de atividade antimicrobiana das cepas *S. aureus* e *S. epidermidis* para a nanoemulsão obtida.



Fonte: Elaborado pela autora

4.2.9.3. Difusão em ágar por *template*

Esta análise microbiológica seguiu a metodologia de difusão em ágar de Kiby Bauer, e consistiu na deposição do *template* na placa de ágar semeada, cujos compostos testes são adicionados ao poço do *template*. O ensaio foi realizado em triplicata e envolveu as seguintes etapas: seleção das colônias bacterianas, preparo do inóculo bacteriano, ajuste da escala de McFarland, preparo das placas, inoculação

do microorganismo na placa, adição do *template* estéril, adição das amostras no *template*, incubação das placas, medição dos halos de inibição e interpretação dos resultados (Kirby; Bauer, 1966).

As cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. acnes*, foram padronizadas na escala 0,5 de MacFarland e, posteriormente, 100 µL adicionados em placas de Mueller Hinton e semeadas utilizando alça de Drigalski de vidro estéril. Em seguida, foram inseridos os *templates* sobre o meio de cultura, e adicionados 100 µL da diluição do óleo essencial e da nanoemulsão, por poço do *template*. As placas foram incubadas a 37 °C, por 24 horas. Para a leitura, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição em milímetros (mm), (Kirby; Bauer, 1966).

4.2.9.4. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos compostos foram obtidas utilizando a metodologia da microdiluição REMA (Resazurin Microtiter Assay Plate) (Palomino *et al.*, 2002; Palomino *et al.*, 2007; Bou, 2007; Coban, 2012; CLSI, 2008), em meio de cultura Caldo Mueller Hinton, com modificações.

Antes de adicionar o microorganismo, foram preparadas concentrações decrescentes de 4,0000 a 0,1250 mg/mL com os seguintes compostos: óleo essencial e nanoemulsão contendo o óleo essencial.

O preparo das concentrações nas microplacas estéreis com 96 poços foi iniciado com um volume de 100 µL de meio de cultura Caldo Muller Hinton, em todos os poços, com exceção dos primeiros de cada fileira. Nestes, 200 µL dos compostos a serem testados foram adicionados e, então, foi realizada uma micro diluição seriada, manualmente, que consiste em pipetar 100 µL do poço de número 1, adicionar ao poço de número dois, homogeneizar; retirar 100 µL, passar para o poço 3, homogeneizar e, assim, sucessivamente.

As cepas foram adicionadas à solução salina 0,85%, até obterem um índice de turbidez de 0,5 no padrão de McFarland, o que equivale a $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) /mL. O inóculo inicial para cada poço da microplaca foi calculado e preparado na concentração equivalente a 10^5 - 10^6 UFC/mL, tendo

utilizado, também, um volume de 100 µL da bactéria diluída em meio Caldo Muller Hinton.

Os valores de CIM; ou seja, a menor concentração do composto capaz de inibir o crescimento do microrganismo, visivelmente, foi definido após a incubação e revelação com 50 µL de resazurina (0,01%), adicionados em cada poço. A mudança de cor, de azul para rosa, indica o crescimento e a presença de células bacterianas viáveis.

Para a determinação da CBM, isto é, da menor concentração do composto na qual não ocorreu crescimento do microrganismo, foi realizada antes de adicionar a resazurina, com o auxílio de palitos de madeira estéreis, a inoculação de cada um dos poços da microplaca em ágar SDA. Após a incubação, (35,5 °C/ 24 horas) foi efetuada a leitura, se havia ou não crescimento microbiano.

4.2.10. Avaliar a estabilidade física da nanoemulsão obtida

Para avaliar a estabilidade da nanoemulsão escolhida, foram preparados 10 g de nanoemulsão, em triplicata, e acondicionados em frasco de vidro transparente, com tampa, protegido da luz. As formulações foram submetidas nas condições de estresse: geladeira com temperatura de 5 ± 2 °C; estufa com temperatura de 37 ± 2 °C e temperatura ambiente de 25 ± 5 °C (Isaac *et al.*, 2008, com modificações).

As nanoemulsões foram avaliadas 24 horas após o seu preparo e nos dias 7, 14, 21, 28, 35, 42, 63 e 90 após a exposição a condições de estresse, quanto aos parâmetros: tamanho de gotícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH.

Para as análises de tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta, as nanoemulsões foram diluídas com água Mili-Q na proporção de 1:25. O pH foi lido diretamente nas nanoemulsões, sem diluições, em peagômetro digital (Gehaka®, PG1800).

Os resultados estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

4.2.11. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do software GraphPad Prism 7® com nível de significância de 95%. Foi realizado o teste ANOVA One-way e pós-teste Tukey, para a determinação do EHLr e escolha do melhor par de tensoativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TESTE DE SOLUBILIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. millefolium* L.

A solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L. foi avaliada conforme a metodologia da Farmacopeia Brasileira - 5ª Edição. A solubilidade foi testada frente aos solventes: Etanol PA, Metanol PA, Isopropanol PA, Etanol 70% (v/v), Clorofórmio PA e Acetona PA.

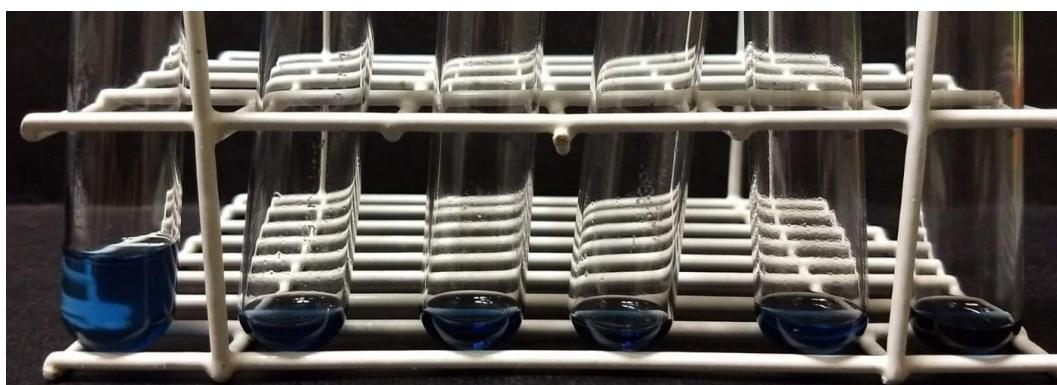
Na Tabela 2, estão demonstrados os solventes utilizados no teste e o grau de solubilidade do óleo, respectivamente.

Tabela 2. Solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L. em diferentes solventes.

Solvente	Solubilidade
Etanol 70% (v/v)	Ligeiramente solúvel
Metanol PA	Muito solúvel
Acetona PA	Muito solúvel
Clorofórmio PA	Muito solúvel
Etanol PA	Muito solúvel
Isopropanol PA	Muito solúvel

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6 – Análise de solubilidade do óleo essencial de *A. millefolium* L. em diferentes solventes.



Fonte: Elaborada pela autora.

Ao observar a Figura 6, nota-se a homogeneidade de cada mistura de óleo, em diferentes solventes. Entre os 6 solventes utilizados no teste, o óleo essencial de *A. millefolium* L. se apresentou como: “ligeiramente solúvel” apenas na presença de Etanol 70% (v/v) e, nos demais solventes, apresentou-se como muito solúvel.

A avaliação da solubilidade do óleo de *A. millefolium* L. é de suma importância para a realização dos experimentos de avaliação da atividade antioxidante, visto que é necessária a solubilização do óleo em solventes orgânicos, assim como no meio de cultura para avaliação da atividade antimicrobiana. Sem a solubilização do óleo, não é possível a realização de ambos os experimentos. Os óleos essenciais são uma mistura de substâncias voláteis lipofílicas (metabólitos secundários), odoríferas e líquidas, que comumente são chamados de óleos voláteis, devido à volatilidade e a solubilidade em solventes orgânicos (Paiva, 2014). Scheffer, em 2012, descreveu a solubilidade do óleo essencial como 0,2 em 1 volume de álcool 90%.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. millefolium* L.

O óleo essencial possui a coloração azul escuro, conforme a Figura 7.

Figura 7 – Óleo essencial de *Achillea millefolium* L.



Fonte: Elaborada pela autora.

O óleo essencial foi analisado por CG-EM, para quantificação química percentual, na qual, foram identificadas 22 substâncias que estão descritos na Tabela 3, que descreve as substâncias do OE de *A. millefolium* L., em sequência crescente de eluição, e os cromatogramas estão dispostos nos Apêndices.

No Apêndice 1, é apresentado o Certificado de análise química – Óleo essencial *Achillea millefolium* e no Apêndice 2, apresentada a Caracterização química – Óleo essencial *Achillea millefolium*, obtida no ensaio de caracterização.

Tabela 3. Caracterização química percentual do óleo essencial da *A. millefolium*.

TR	Substância	AI exp	AI teórico	Área %
9,703	Pinene <α->	927	932	0,69
9,909	Artemisia triene	934	923	2,36
11,103	Hepten-2-one <6-methyl-5->	971	981	0,58
11,230	Sabinene	975	969	20,53
11,322	Pinene <β->	977	974	15,61
11,808	Myrcene	992	988	0,54
12,623	Terpinene <α->	1018	1014	0,63
13,013	Limonene	1030	1024	1,02
13,090	Cineole <1,8->	1033	1026	4,24
13,989	Terpinene <γ->	1061	1054	0,83
14,055	Artemisia ketone	1063	1056	6,66
17,673	Terpinen-4-ol	1181	1174	2,60
20,481	Sabinyol acetate <trans-> (IPP vs. Acetyl)	1279	1289	0,85
20,811	Bornyl acetate	1291	1284	0,85
24,464	β-caryophyllene	1410	1417	15,52
25,327	Linalool butanoate	1422	1421	2,09
26,012	Copaene<β->	1432	1430	11,58
26,261	Bergamotene <α-trans->	1436	1432	1,00
26,400	Elemene <γ->	1437	1434	0,55
26,996	Aromadendrene	1446	1439	0,55
28,511	Aromadendrane <dehydro->	1467	1460	1,91
31,820	Chamazulene	1723	1730	3,00
Total				94,19

Fonte: Elaborado pela autora

Entre os 22 constituintes (94,19%) identificados no óleo essencial de *A. millefolium* L., foi verificada a presença dos compostos majoritários sabinene (20,53%),

Pinene <β-> (15,61%), β-caryophyllene, (15,52%), Copaene<β-> (11,58%), Artemisia ketone (6,66%), Chamazulene (3,00%), que correspondem a 72,9% da composição do óleo.

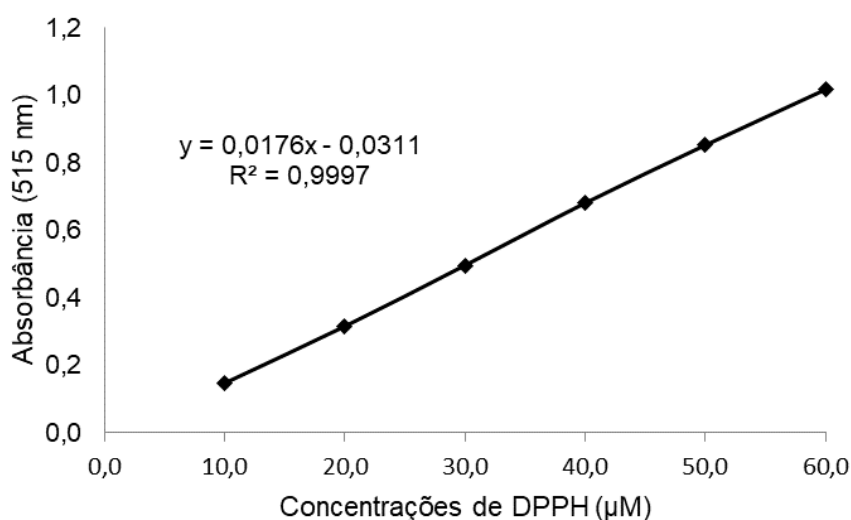
Em estudo realizado por Daniel, 2019; por CG/EM foram detectados 21 compostos químicos e, dentre os majoritários, o de maior concentração foi o α-farneseno (31,66%), seguido pelo camazuleno (17,17%), o β-cariofileno (10,27%) e o sabineno (8,77%), sendo a classe majoritária os sesquiterpenos hidrocarbonados com 74,29%.

5.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.3.1. Inibição do radical DPPH[•]

A capacidade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L. foi avaliada pela metodologia de inibição do radical DPPH[•] cuja curva analítica do radical DPPH[•] está ilustrada na Figura 8.

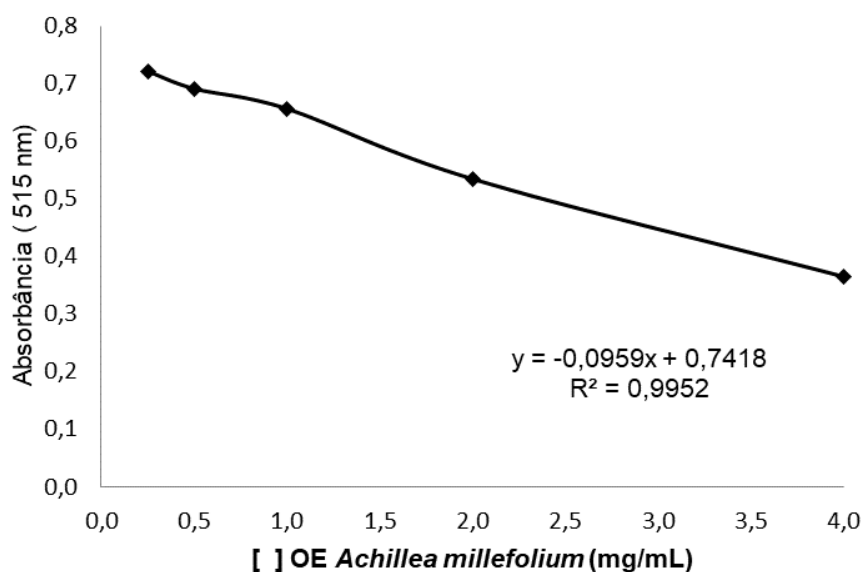
Figura 8 – Curva analítica do radical DPPH[•]



Fonte: Elaborada pela autora.

A curva de inibição do radical DPPH[•] pelo óleo de *A. millefolium* L. está ilustrada na Figura 9.

Figura 9 – Curva de inibição do radical DPPH* pelo óleo de *A. millefolium* L.



Fonte: (Elaborada pela autora).

Figura 10 – Diluição seriada do óleo de *A. millefolium* L. após inibição pelo radical DPPH*.



Fonte: Elaborado pela autora.

Esta metodologia trata-se de uma reação colorimétrica, cuja redução da absorbância, a 515 nm, ocorre pela captura do radical pelo óleo essencial de *A. millefolium* L. (Rufino *et al.*, 2007).

Foi calculado o valor de EC₅₀ para avaliar a capacidade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L., sendo este valor correspondente à quantidade de óleo necessária para inibir 50% dos radicais livres presentes na amostra. Quando menor o EC₅₀, maior

a capacidade antioxidante, visto que é necessária uma menor quantidade de óleo para reduzir em 50% o radical livre DPPH[•].

O valor de EC₅₀ foi calculado substituindo em y, na equação da reta da curva de inibição do DPPH[•], o valor da absorbância encontrada para 30 µM de DPPH[•]. O valor de EC₅₀, frente ao radical DPPH[•], foi determinado como 2,56 mg/mL.

Em estudo realizado por Dolwitsch e colaboradores, 2016, o extrato etanólico 10% de partes como folha, ramo, inflorescência e flor apresentaram valores 21%, 64%, 66% e 67%, respectivamente. Já Fabri *et al.*, 2011, determinaram a atividade antioxidante da inflorescência e encontraram o valor de 48 µg m.

Os resultados obtidos por Dolwitsch e Fabri, com seus colaboradores, são bem distantes do valor encontrado, que pode ser justificado por terem realizado com extrato de *A. millefolium* L. e não, o óleo essencial. Dolwitsch determinou em extrato etanólico das diferentes partes da planta, compostos com função antioxidante significativa, sendo eles os compostos canferol, ácido cafeico, quercetina e flavona.

A atividade antioxidante encontrada no óleo essencial pode ser atribuída ao composto sabinene (20,53%), conforme a caracterização química percentual obtida.

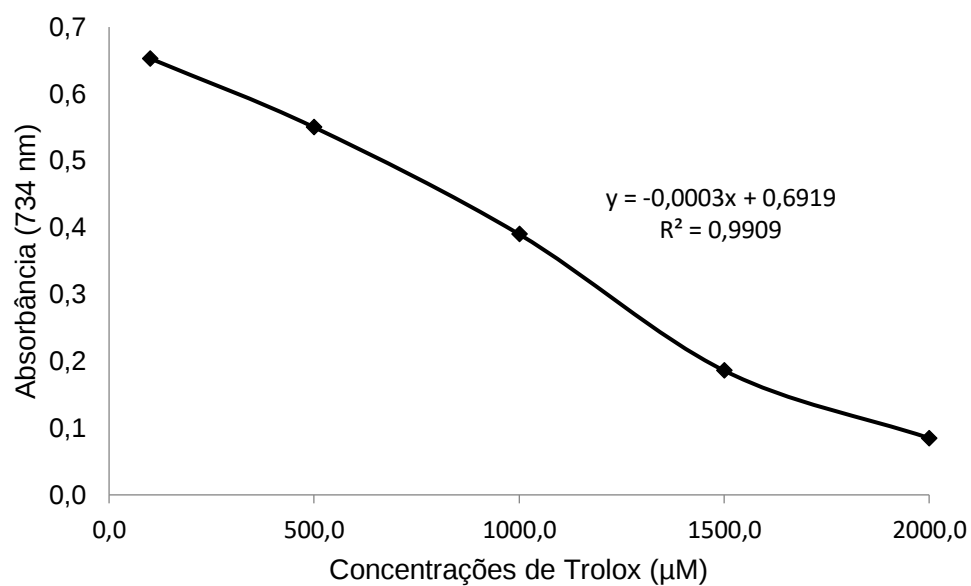
O valor de EC₅₀ varia de acordo com a composição química da espécie vegetal, visto que fatores ambientais como o clima de cultivo, época de coleta, horário de coleta e tipo de solo cultivado, interferem no processo de crescimento e desenvolvimento da espécie vegetal (Borges *et al.*, 2011), assim como a metodologia de extração e tempo de estocagem (Silva, 2015), o que justifica as variações nos valores encontrados.

5.3.2. Captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+})

A capacidade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L. também foi analisada pela metodologia de inibição do radical ABTS^{•+}. Essa metodologia se trata de uma reação colorimétrica, na qual há a redução da absorbância, a 734 nm, conforme ocorre a captura do radical pelo óleo essencial de *A. millefolium* L. (Rufino *et al.*, 2007).

A curva analítica do padrão Trolox é ilustrada na Figura 11.

Figura 11 – Curva analítica do Trolox.



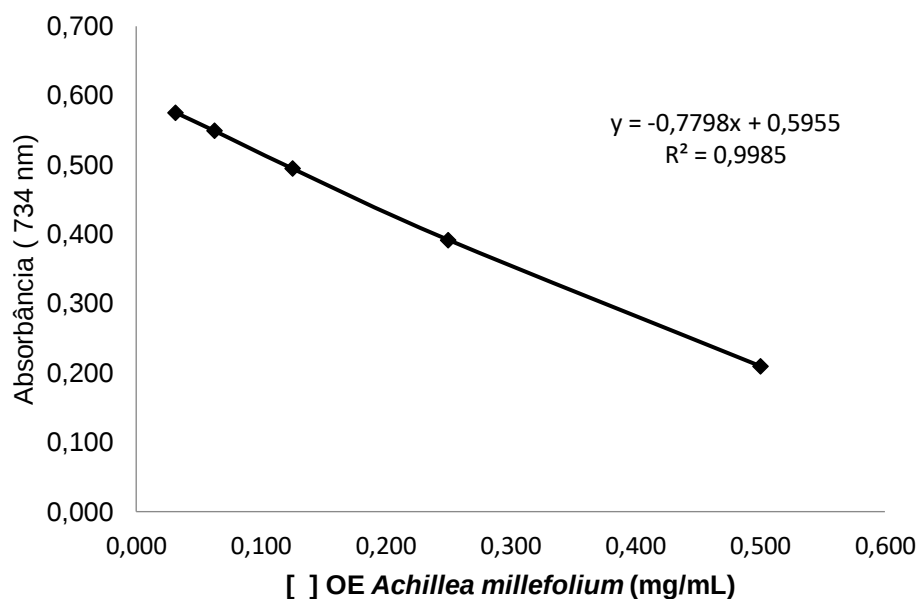
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 12 – Diluição seriada do óleo de *A. millefolium* L. após inibição pelo radical ABTS^{•+}.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 13 – Curva de inibição do radical ABTS^{•+} pelo óleo essencial de *A. millefolium* L.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para avaliar a capacidade antioxidante do óleo de *A. millefolium* L. frente ao radical ABTS^{•+}, foi calculado o valor da capacidade antioxidante do equivalente Trolox, ou TEAC. Para calcular o valor de TEAC, foi substituindo o y, da equação da reta da curva de inibição do radical ABTS^{•+}, pelo valor da absorbância encontrada para 1000 µM de Trolox e, em seguida, o resultado foi dividido por 1000, obtendo-se, assim, o valor de 0,00026 µM Trolox/mg de óleo.

A atividade antioxidante é uma análise importante para estabelecer a relação sinérgica de extratos e óleos vegetais, com os benefícios de substâncias isoladas já comercializadas. É notória a diferença de valores de inibição dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} respectivamente, pelo óleo essencial de *A. millefolium*. Frente ao radical DPPH[•], foi determinado o valor de EC₅₀ como 2,56 mg/mL, enquanto o radical ABTS^{•+} apresentou o valor de 0,00026 µM Trolox/mg de óleo. A atividade antioxidante encontrada no óleo essencial pode ser atribuída ao composto sabinene (20,53%), conforme a caracterização química percentual obtida.

A diferença nos valores encontrados frente aos radicais testados, se dá mediante as diferenças estereoquímicas na estrutura dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} que influencia, diretamente, no mecanismo de reação de diferentes compostos presentes nas espécies vegetais, que podem ter ação antioxidante (Pérez-Jiménez *et al.*, 2008). Existem diversas metodologias para a avaliação da atividade antioxidante, além das metodologias propostas neste estudo. Há o ensaio de capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), método de captura de ânion radical superóxido e potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) (Almeida-Cincotto, 2016).

A atividade antioxidante encontrada é um fator que corrobora no cuidado da acne, pois diminui o estresse oxidativo, prevenindo o envelhecimento precoce da pele e a formação de lesões causadas pela acne (Cefali *et al.*, 2020).

5.4. DETERMINAÇÃO DO EQUILÍBRIO HIDRÓFILO-LIPÓFILO REQUERIDO (EHLr)

A metodologia de baixo aporte de energia foi a escolhida para a execução dessa pesquisa. A nanoemulsão foi obtida pelo método EPI – *Emulsion Phase Inversion*, quando os tensoativos são solubilizados na fase oleosa. Posteriormente, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa em agitação constante, a 870 rpm, até a completa homogeneização (Agostinho, 2017).

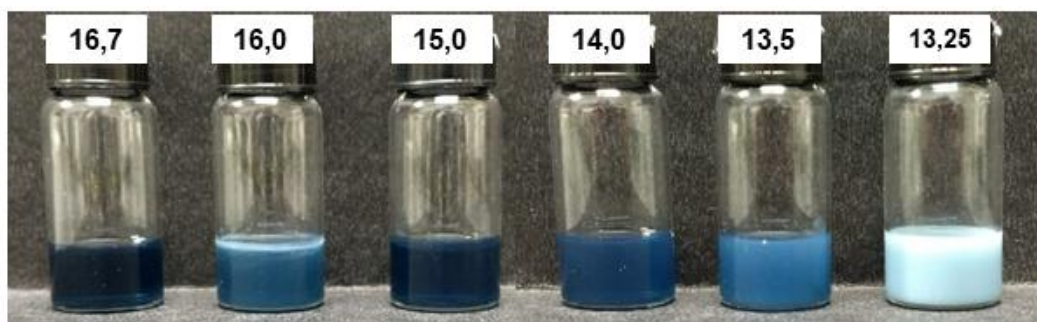
Para a determinação do EHLr da fase oleosa, foram preparadas diferentes proporções de Polysorbate 20 (T20) e Sorbitan Trioleate (S85), na qual apresentam valor de EHL de 16,7 e 1,8 respectivamente. Desta forma, foi possível obter uma ampla faixa de EHL, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Composição percentual das formulações para determinação do EHLr.

COMPOSIÇÃO (%m/m)				
EHL	T20	S85	OE	H ₂ O
16,7	5,00	-	1,00	94,00
16,0	4,72	0,28	1,00	94,00
15,0	4,32	0,68	1,00	94,00
14,0	3,91	1,09	1,00	94,00
13,5	3,77	1,23	1,00	94,00
13,25	3,70	1,30	1,00	94,00
13,0	3,51	1,49	1,00	94,00
12,0	3,10	1,90	1,00	94,00
11,0	2,70	2,30	1,00	94,00
10,0	2,30	2,70	1,00	94,00
9,0	1,90	3,10	1,00	94,00
8	1,49	3,51	1,00	94,00

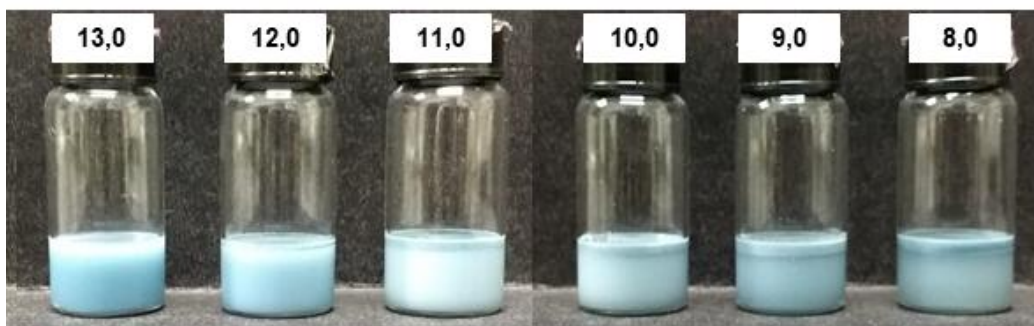
Fonte: Elaborada pela autora.

A quantidade de óleo de *A. millefolium* L. e de água foram mantidas fixas e a quantidade de cada tensoativo foi modificada, a fim de se obter o respectivo valor de EHL, para cada formulação. Ao total, foram 12 formulações, com diferentes valores de EHL, e diferentes aspectos macroscópicos, conforme as Figuras 14 e 15.

Figura 14 – Formulações para a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.

Fonte. Elaborada pela autora.

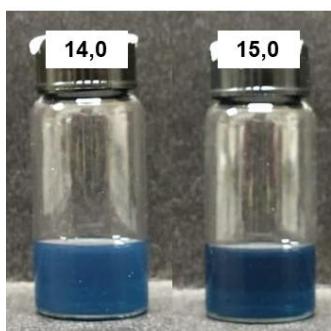
Figura 15 – Formulações para a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.



Fonte: Elaborada pela autora.

Após a avaliação visual dos aspectos macroscópicos de estabilidade, como a formação de cremagem, floculação e separação de fases, somente as formulações com EHL 14,0 e 15,0 não apresentaram nenhum sinal de instabilidade. Conforme a Figura 16, ambas se caracterizaram como estáveis visualmente, e com aspecto translúcido.

Figura 16 – Formulações estáveis após a determinação do EHLr, após 24 horas em repouso.



Fonte: Elaborada pela autora.

Para escolher a melhor formulação, foi realizada a medição do tamanho de gotícula, pela técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS), 24 horas após o preparo das formulações, conforme Tabela 5.

Tabela 5. Tamanho médio das formulações de EHL 15 e EHL 14.

EHL	Tamanho (nm)
15,0	19 nm
14,0	36 nm

Fonte: Elaborada pela autora.

O tamanho das gotículas é determinado a partir das mudanças na frequência do feixe de luz, que incide sobre a amostra, devido ao movimento Browniano das gotículas presentes na suspensão. Uma nanoemulsão, tipicamente estável, apresenta-se com tamanho de gotícula de até 200 nm (Solans *et al.*, 2005; Jafari; McClements, 2018; Almeida, 2020).

Frente à análise do tamanho de gotícula, foi definida a melhor formulação, aquela com EHLr 15,00, por ter apresentado menor tamanho e aparência mais translúcida que a formulação de EHL 14,00, sugerindo uma dispersão mais homogênea das gotículas de óleo na fase aquosa (Jafari; McClements, 2018). Sendo assim, a formulação de EHL 15 foi a eleita para continuação dos ensaios.

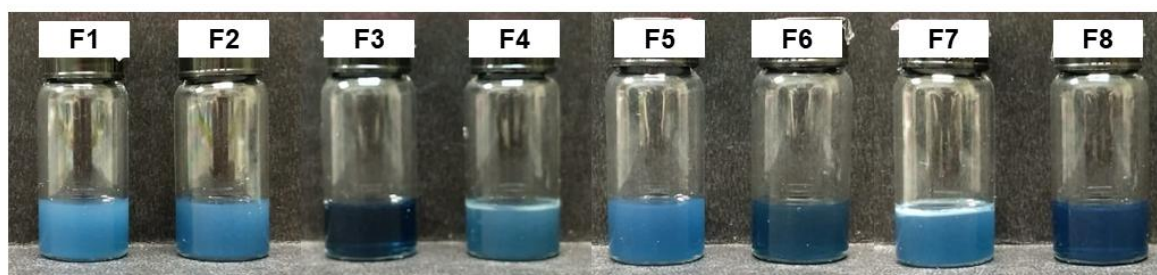
5.5. PARES DE TENSOATIVOS

Foram propostos 24 pares diferentes de tensoativos, a fim de avaliar o comportamento das formulações, frente às alterações dos tensoativos quanto às suas estruturas químicas, para o EHL 15. À medida que os pares de tensoativos fossem alterados, era avaliadas se as alterações promoveriam modificações nos parâmetros macroscópicos de estabilidade. Nas tabelas 6, 7 e 8 estão descritas as composições das formulações com as respectivas quantidades de tensoativos, óleo e água e as imagens das nanoemulsões obtidas, para cada par de tensoativos.

Tabela 6. Composição percentual das formulações F1 a F8.

COMPOSIÇÃO % (m/m)													
FORM	T20	PAWS	T40	T60	P6MO	P4MO	T85	P6DO	P4DO	S80	S85	OE	H ₂ O
F1	0,2			4,8								1,00	94,00
F2	2,8				2,2							1,00	94,00
F3	3,6					1,4						1,00	94,00
F4	3,6						1,4					1,00	94,00
F5	3,8							0,06				1,00	94,00
F6	4,0								1,0			1,00	94,00
F7	4,4									0,6		1,00	94,00
F8	4,4										0,6	1,00	94,00

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 17 – Formulações (F1 a F8), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos

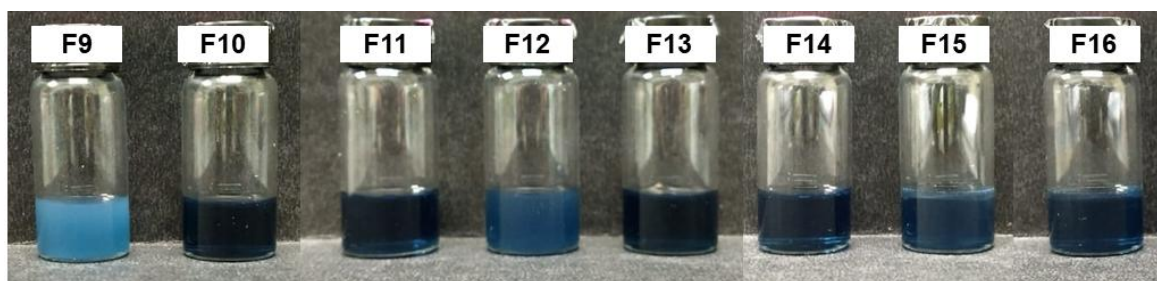
Fonte: Elaborado pela autora.

Após 24 horas em repouso, pode-se avaliar que apenas as formulações F3 e F8, mantiveram-se estáveis, quanto aos parâmetros de estabilidade, uma vez que não apresentaram formação de cremagem ou floculação. Após isso, o tensoativo T20 foi substituído pelo tensoativo PAWS, e as formulações foram preparadas conforme composição descrita na tabela 6, e as formulações obtidas estão mostradas na Figura 17.

Tabela 7. Composição percentual das formulações F9 a F16.

FORM	T20	PAWS	T40	T60	P6MO	P4MO	T85	P6DO	P4DO	S80	S85	OE	H ₂ O
F9		0,4		4,6								1,00	94,00
F10		3,4			1,6							1,00	94,00
F11		4,0				1,0						1,00	94,00
F12		4,0					1,0					1,00	94,00
F13		4,2						0,8				1,00	94,00
F14		4,4							0,6			1,00	94,00
F15		4,6								0,4		1,00	94,00
F16		4,6									0,4	1,00	94,00

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 18 – Formulações (F9 a F16), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos.

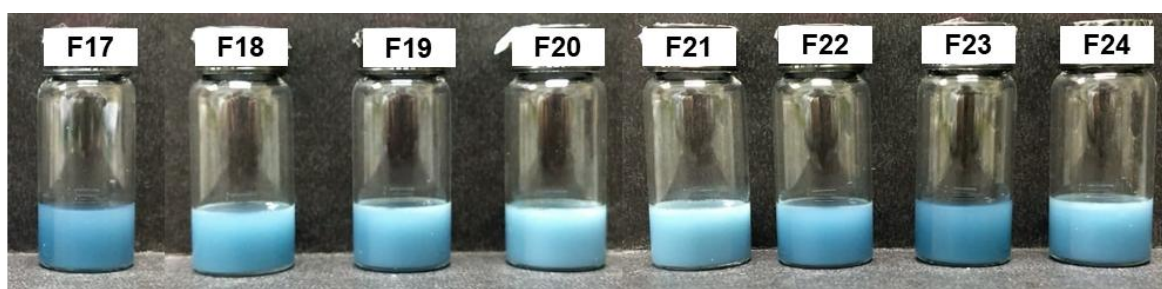
Fonte: Elaborado pela autora.

Após 24 horas em repouso, pode-se avaliar que apenas as formulações F10, F11, F13 e F14, mantiveram-se estáveis quanto aos parâmetros de estabilidade, uma vez que não apresentaram formação de cremagem ou floculação. Após isso, o tensoativo PWS foi substituído pelo tensoativo T40, e as formulações foram preparadas conforme composição descrita na tabela 8, e as formulações obtidas estão mostradas na Figura 18.

Tabela 8. Composição percentual das formulações F17 a F24.

FORM	T20	PAWS	T40	T60	P6MO	P4MO	T85	P6DO	P4DO	S80	S85	OE	H ₂ O
F17			0,8	4,2								1,00	94,00
F18			3,8		1,2							1,00	94,00
F19			4,4			0,6						1,00	94,00
F20			4,4				0,6					1,00	94,00
F21			4,4					0,6				1,00	94,00
F22			4,6						0,4			1,00	94,00
F23			4,8							0,2		1,00	94,00
F24			4,8								0,2	1,00	94,00

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 19 – Formulações (F17 a F24), 24 horas após o preparo, em repouso, para determinar o melhor par de tensoativos.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após 24 horas em repouso, pode-se avaliar que nenhuma das formulações se manteve estável quanto aos parâmetros de estabilidade, uma vez que todas se apresentaram com formação de cremagem e aspecto leitoso.

Para escolher uma formulação entre as seis que se apresentaram estáveis 24 horas após o preparo, foi realizada a caracterização dos parâmetros: tamanho (nm), PDI e Potencial Zeta (mV). Para isso, em outro dia, foram preparadas/manipuladas as seis formulações, que permaneceram em repouso por 24 horas e, por fim, foram realizadas as leituras, em DLS, que se encontram descritas na Tabela 9.

Tabela 9. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) das formulações F3, F8, F10, F11, F13 e F14, em DLS.

Formulação	Tamanho (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
F3	23,58 ± 1,977 ^a	0,640 ± 0,004 ^d	-20,7 ± 0,924 ^h
F8	13,44 ± 0,199 ^b	0,184 ± 0,016 ^e	-8,10 ± 1,440 ⁱ
F10	18,94 ± 0,792 ^{a,b}	0,485 ± 0,029 ^f	-19,8 ± 2,630 ^{h,j}
F11	30,92 ± 4,695 ^c	0,325 ± 0,074 ^g	-13,3 ± 3,380 ^{i,j}
F13	16,78 ± 2,654 ^{a,b}	0,296 ± 0,022 ^g	-7,81 ± 2,050 ⁱ
F14	19,75 ± 0,0838 ^{a,b}	0,280 ± 0,009 ^{e,g}	-14,3 ± 0,757 ⁱ

Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA One-way, pós teste Tukey
p<0,05

Fonte: Elaborado pela autora

Uma nanoemulsão tipicamente estável, apresenta-se com tamanho de gotícula de até 200 nm, índice de polidispersão menor que 0,5 e potencial maior que 30 mV em módulo (Solans *et al.*, 2005; Jafari; McClements, 2018).

Analisando os dados obtidos na Tabela 9, todas as formulações apresentaram o tamanho de gotícula como o esperado para uma nanoemulsão.

A formulação F3, apresentou o PDI superior a 0,5 e todas as formulações não apresentaram o potencial Zeta maior que 30 mV, em módulo. Os valores de potencial Zeta são negativos, o que sugere uma interferência do tipo do tensoativo, o que pode ter acarretado a instabilidade. O tensoativo Procetyl é uma mistura de álcoois graxos etoxilados, saturada em álcool cetílico etoxilado (ULPROSPECTOR, 2020).

As forças de atração e repulsão entre as partículas da dispersão, determinam a estabilidade e formação de agregados. Os valores de potencial Zeta altamente negativos e positivos, se dão pelas interações eletrostáticas de repulsão (Jiang *et al.*, 2009). Esses valores de potencial Zeta negativos são significativos em faixas de pH entre 5 e 7, que é a faixa segura para produtos de aplicação tópica, além de prevenir a aglomeração das nanopartículas, que é diretamente relacionada à transparência do sistema (Manaia, 2012).

Para a escolha da melhor formulação, foi realizado o teste estatístico ANOVA One-Way, pós teste Tukey.

Após a análise estatística e a verificação dos gráficos obtidos no *software* do equipamento, apenas F13 e F14 não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A partir disso, a formulação F14 foi a escolhida, uma vez que o Potencial Zeta era o mais alto, e o desvio padrão era o mais baixo quando comparado com a F13.

5.6. FORMULAÇÕES FINAIS

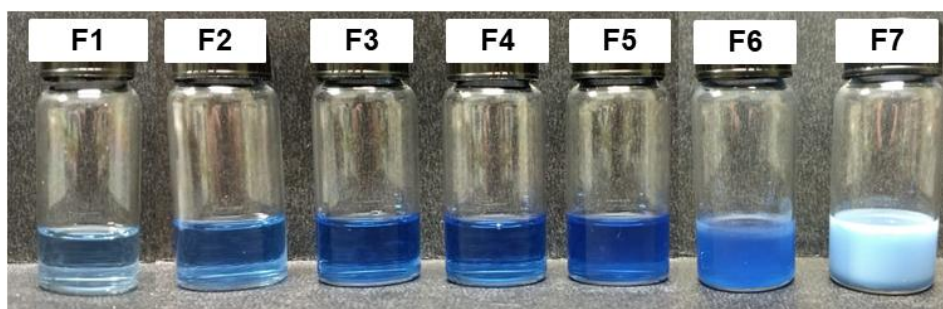
Mediante a impossibilidade de determinação da região de nanoemulsão, devido à instabilidade das formulações, foram definidas novas formulações com percentual de óleo próximo a 1% mantendo o valor de EHLr, a fim de avaliar o comportamento e melhorar a estabilidade das formulações. A composição das formulações se encontra na Tabela 10.

Tabela 10. Composição percentual das formulações finais com percentuais de OE, de 0,25 a 1,75%.

FORM	PAWS	P4DO	OE	H ₂ O
F1	4,40	0,6	0,25	94,75
F2	4,40	0,6	0,50	94,50
F3	4,40	0,6	0,75	94,25
F4	4,40	0,6	1,00	94,00
F5	4,40	0,6	1,25	93,75
F6	4,40	0,6	1,50	93,50
F7	4,40	0,6	1,75	93,25

Fonte: Elaborado pela autora

Figura 20 – Formulações finais com percentuais de OE, de 0,25 a 1,75%.



Fonte: Elaborado pela autora

Conforme demonstrado na Figura 20, as formulações F1 a F5, não demonstraram sinais de instabilidade; portanto, foram avaliadas quanto aos parâmetros de tamanho (nm), PDI e Potencial Zeta (mV). Para isso, em outro dia, foram manipuladas as cinco formulações, permaneceram em repouso, por 24 horas e, por fim, realizadas as leituras, que se encontram descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Tamanho médio de gotícula, índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (mV) das formulações F1, F2, F3, F3 e F5.

Formulação	Tamanho (nm)	Pdi	Potencial Zeta (mV)
F1	18,89 ± 0,213 ^a	0,168 ± 0,011 ^d	-5,99 ± 6,260 ^f
F2	20,73 ± 0,200 ^a	0,247 ± 0,033 ^{d,e}	-5,71 ± 0,536 ^f
F3	21,45 ± 0,263 ^a	0,187 ± 0,024 ^{d,e}	-5,19 ± 1,820 ^f
F4	13,72 ± 1,761 ^b	0,237 ± 0,059 ^{d,e}	-10,9 ± 2,690 ^{f,g}
F5	17,96 ± 1,420 ^{a,c}	0,294 ± 0,029 ^e	-17,9 ± 2,500 ^g

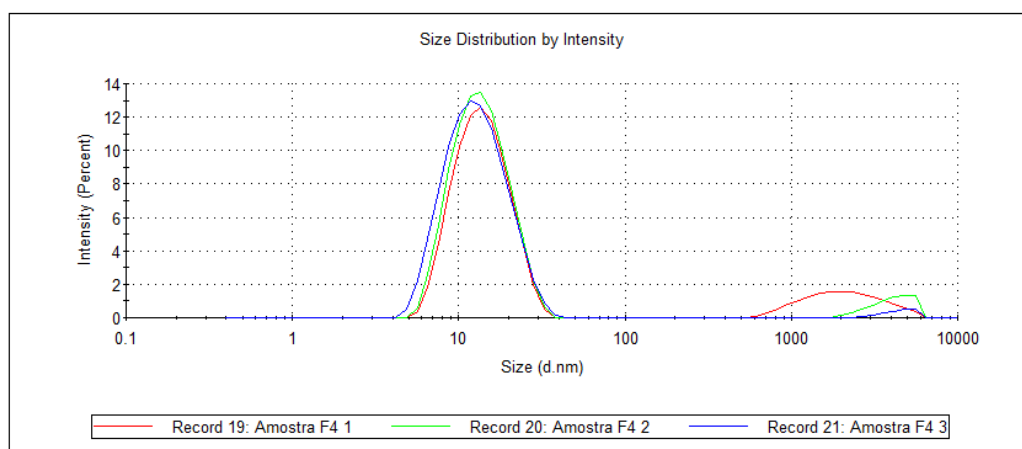
Letras iguais não apresentam diferença estatística significativa. ANOVA One-way, pós teste Tukey.

p<0,05

Fonte: Elaborado pela autora

Após a análise dos resultados da Tabela 11, foi escolhida a formulação F4 como a formulação final, visto que apresentou diferença significativa em relação às demais e possuía o menor tamanho médio, além de possuir uma maior homogeneidade, conforme figura 21.

Figura 21 – Gráfico de distribuição de tamanho de gotícula por intensidade percentual da formulação F4.



Fonte: Zetasier Software.

As demais formulações foram descartadas e a formulação F4 foi a eleita para a continuidade dos testes de estabilidade e avaliação antimicrobiana. A formulação foi renomeada como NE-MF.

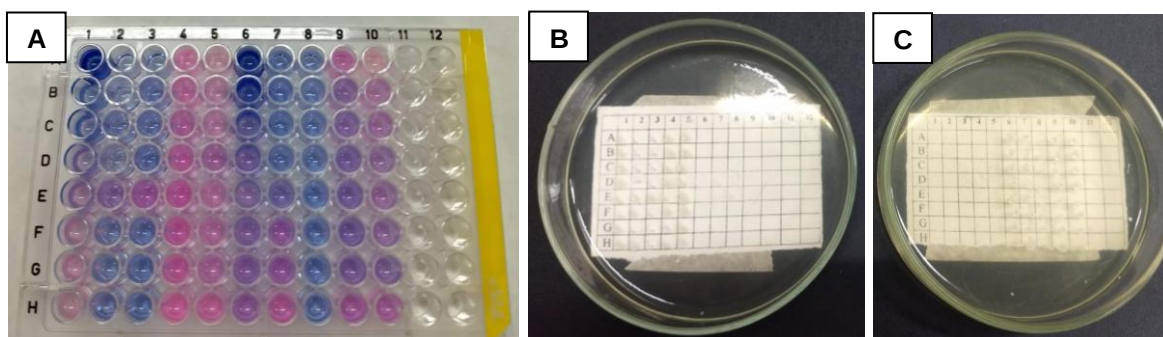
5.7. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.7.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

5.7.1.1. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*

A partir do delineamento das figuras 04 e 05, foram executados os testes com as cepas *S. aureus* e *S. epidermidis*, tanto com o óleo, quanto para a nanoemulsão NE-MF obtida. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 22 e 23, e descritos na Tabela 12.

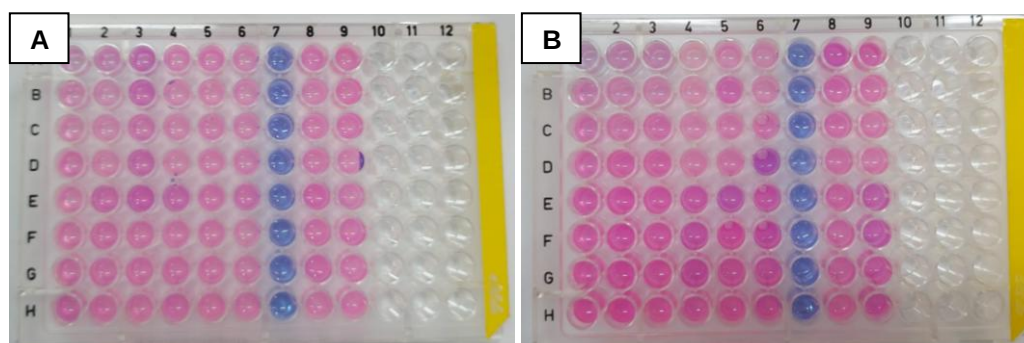
Figura 22 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo essencial, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Observações: **A:** CIM utilizando cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. **B:** CBM utilizando cepa de *S. aureus*. **C:** CBM utilizando cepa de *S. epidermidis*.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 23 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) da nanoemulsão NE-MF, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*.



Observações: **A:** CIM utilizando cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis*. **B:** CIM utilizando cepas de *S. epidermidis*

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 12. Concentrações Inibitórias mínimas do óleo essencial e da nanoemulsão NE-MF obtida

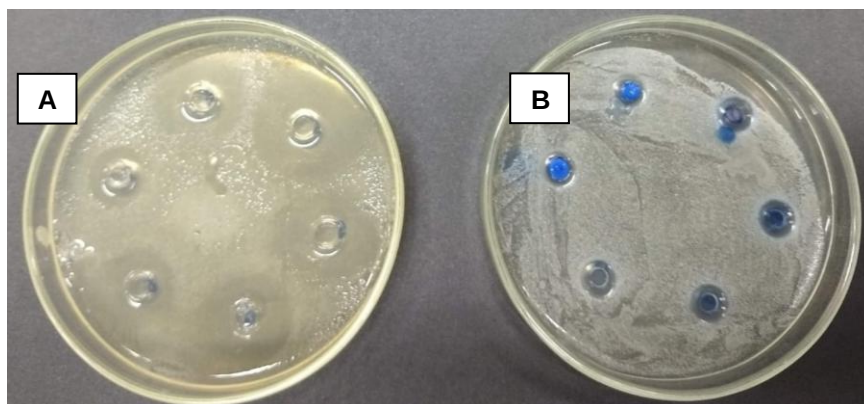
	CIM OU CMB (mg/mL)			
	<i>S. aureus</i>		<i>S. epidermidis</i>	
	CIM	CBM	CIM	CBM
OE	0,375	0,375	0,75	0,75
Nanoemulsão	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu	Não inibiu

Fonte: Elaborado pela autora

O óleo essencial inibiu o crescimento do microrganismo *S. aureus* em uma concentração mínima de 0,375 mg/mL e para o microrganismo *S. epidermidis* inibiu em uma concentração mínima de 0,750 mg/mL. Já a NE-MF não inibiu o crescimento dos microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*.

A NE-MF não apresentou um desempenho superior ao óleo puro, pois a quantidade de óleo empregada na formulação é de 1%, ou seja, a quantidade óleo na nanoemulsão é bem inferior à quantidade do óleo essencial puro que inibiu os microrganismos *S. aureus* e *S. epidermidis*.

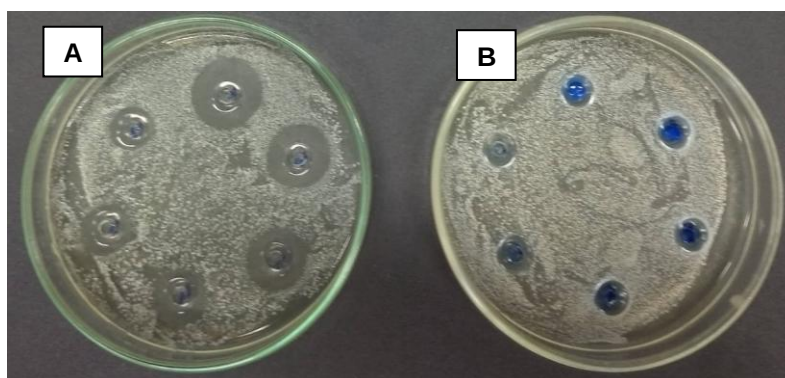
Figura 24 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do óleo, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepa de *S. aureus* na técnica de difusão em ágar, usando *template*.



Observações: **A:** Controle. **B:** Óleo essencial.

Fonte: elaborado pela autora.

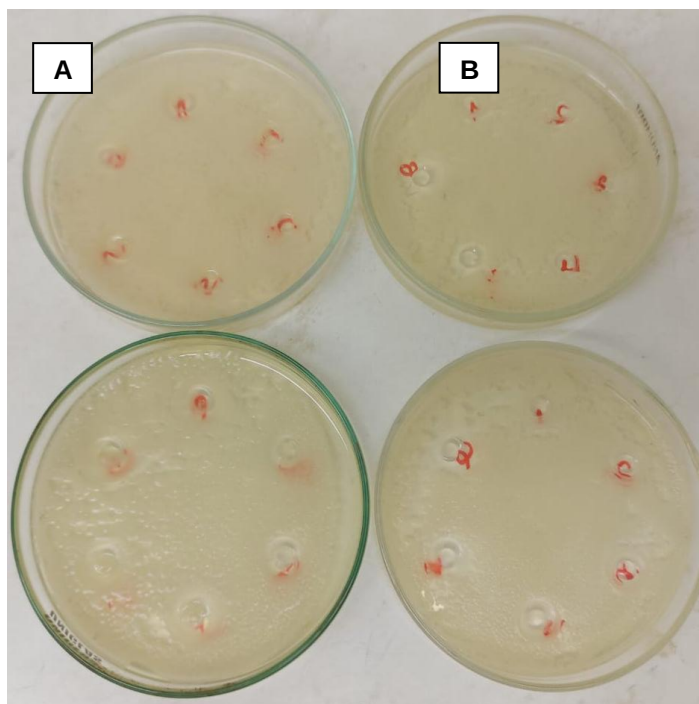
Figura 25 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) do controle e óleo respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepa de *S. epidermidis* na técnica de *template*.



Observações: **A:** Controle. **B:** Óleo essencial.

Fonte: elaborado pela autora.

Figura 26 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) da nanoemulsão, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *S. aureus* e *S. epidermidis* na técnica de difusão em ágar, usando *template*.



Observações: **A:** Controle. **B:** Nanoemulsão.

Fonte: elaborado pela autora.

As cepas bacterianas *S. aureus* e *S. epidermidis* mostraram-se sensíveis às concentrações testadas do óleo essencial. Verificou-se que os valores de CIM variaram de 0,375 a 0,750 mg/mL do óleo essencial respectivamente. Saddiq e Al-Ghamdi (2018), avaliaram o potencial antimicrobiano da *Aloe vera* em cepas de *S. aureus* obtendo um CIM de 20 mg/mL. Sadrnia e Arjomandzadegan (2014), avaliaram o potencial antimicrobiano da *Aloe vera* em cepas de *S. epidermidis* obtendo um CIM de 30 mg/mL. Cruz e colaboradores (2019) avaliaram o potencial antimicrobiano do *Thymus vulgaris* contra *S. aureus* e *S. epidermidis*, obtendo um CIM de $\geq 0,10$ uL.mL.

Lima classificou a atividade inibitória como forte a moderada, mediante os valores definidos de 12,5 a 25 mg/mL (Lima, 2013.) Essa diferença na atividade antimicrobiana do óleo essencial *A. millefolium* L., é justificada devido à variabilidade na composição química e a parte da espécie vegetal utilizada, sendo composta por monoterpenos, sesquiterpenos e compostos fenólicos (Hofmann *et al.*, 1992).

As cepas testadas não demonstraram sensibilidade à nanoemulsão testada, visto que não houve inibição, em nenhuma concentração. A concentração ativa de óleo presente na formulação, é de 1% em uma solução composta por 94% de água e 5% de tensoativos. A quantidade de óleo essencial puro testado é superior quando comparada à quantidade de óleo na composição da NE-MF, o que pode explicar a não ocorrência da inibição.

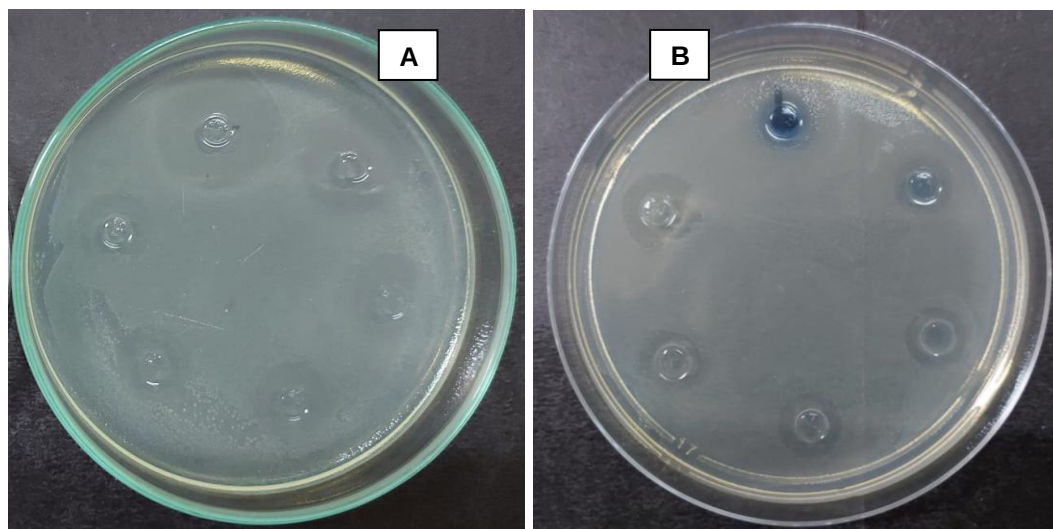
5.7.2. *Cutibacterium acnes*

O principal foco do cuidado atual da patologia ocasionada pelo microrganismo *C. acnes*, é controlar e tratar as lesões, limitar a duração da doença e prevenir as cicatrizes permanentes. Dentre as diversas formas de tratamento da acne, há diferentes possibilidades, como: os antibióticos que podem ser utilizados de forma tópica e/ou sistêmica, e diversos ativos como o ácido azelaico, peróxido de benzoíla e ácido salicílico (Abascal, 2006; Fox *et al.*, 2016). Uma outra vertente importante refere-se às práticas integrativas, como a utilização de óleos essenciais, vegetais e extratos de espécies vegetais, como a *A. millefolium*, o foco dessa pesquisa.

Para o ensaio de atividade antimicrobiana, foram considerados algumas dessas substâncias, já utilizadas de forma rotineira em cuidado da acne, para a comparação da efetividade do óleo essencial de *A. millefolium* e a nanoemulsão desenvolvida.

Os resultados obtidos no ensaio de Difusão em ágar pela técnica de *template* estão demonstrados nas Figura 27 e 28.

Figura 27 – Concentração inibitória mínima (CIM) do controle e do óleo, respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *C. acnes* na técnica de difusão em ágar pela técnica de *template*.



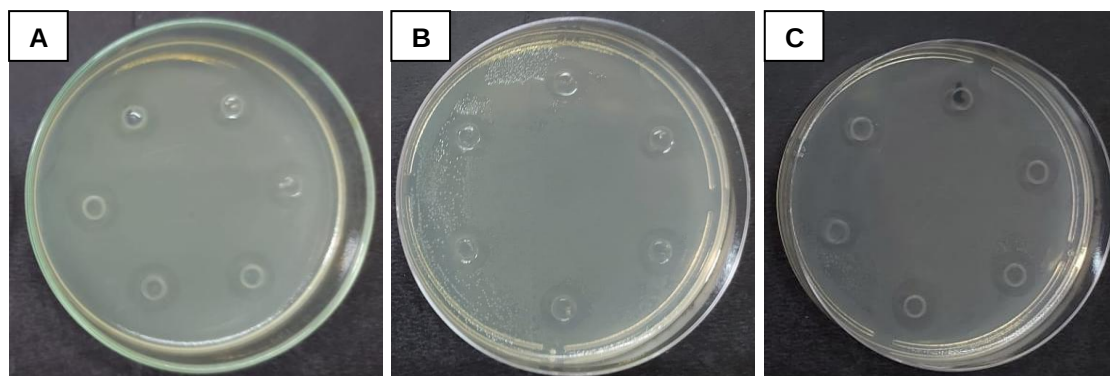
Observações: **A:** Controle. **B:** Óleo essencial.

Fonte: elaborado pela autora.

A esquerda da Figura 27, está mostrado o controle com o antibiótico Clindamicina, nas concentrações de 0,500 a 0,0156 mg/mL, que foi capaz de inibir o crescimento da *C. acnes* a partir da menor concentração testada, de 0,0156 mg/mL. A direita da figura 27 está mostrado o óleo essencial de *A. millefolium* L., nas concentrações de 1,5 mg/mL a 0,046 mg/mL, que apresentou halo de inibição semelhante em todas as concentrações testadas.

Além do óleo essencial e do controle de clindamicina, foram testadas substâncias comerciais frente à NE-MF desenvolvida, conforme resultados expressos na Figura 28.

Figura 28 – Concentração inibitória mínima (CIM) dos controles de peróxido de benzoila 75%, ácido azelaico e a nanoemulsão, respectivamente, obtidos no ensaio de atividade antimicrobiana, utilizando cepas de *C. acnes* na técnica de *template*.



Observações: A: peróxido de benzoila 75%. B: ácido azelaico; C: nanoemulsão de *A. millefolium*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Na Figura 28, estão mostrados os controles com substâncias já utilizadas comercialmente, para o cuidado da acne, sendo elas o peróxido de benzoila 75% e ácido azelaico, nas concentrações de 0,500 a 0,0156 mg/mL.

Nota-se que tanto o peróxido de benzoila 75% quanto o ácido azelaico, foram capazes de inibir o crescimento da *C. acnes* a partir da menor concentração testada, de 0,0156 mg/mL. Na terceira placa está representada a NE-MF obtida a partir do óleo essencial de *A. millefolium* L., cujo halo de inibição foi semelhante aos controles testados.

Em estudo realizado por Apel e colaboradores, em 2020, os autores mostraram a investigação antimicrobiana das espécies de *Achillea*. Comparadas ao presente estudo, extratos de *Achillea millefolium* L., *Achillea moschata* e *Achillea atrata* L., ambos os extratos apresentaram redução do crescimento da cepa *C. acnes*, na concentração de 8 mg/mL.

A variabilidade dos valores de inibição se dá devido à composição química da espécie vegetal, que se altera mediante a sazonalidade. Outro fator importante que pode explicar os diferentes valores de inibição, é a forma em que essa espécie vegetal é utilizada no estudo. Em extratos, é notória essa diferença quando se muda o tipo de solvente extrator, como Shah e seus colaboradores, definiram essa variação, utilizando extratos de *Achillea moonshine*, uma espécie híbrida, a base de Éter de

Petróleo, Acetato de Etila e Etanol. Definiram a concentração inibitória mínima frente a *C. acnes* como: 0,83 mg/mL para o extrato a base de Éter de Petróleo; 1,25 mg/mL para o extrato a base de Acetato de Etila e 1 mg/mL para o extrato etanólico (Shah *et al.*, 2015). Essa diferença de inibição em ambos os extratos se dá mediante a polaridade dos solventes, que seleciona compostos diferentes, durante a extração.

Dentre as medicinas alternativas já supracitadas, destaca-se a utilização de óleos essenciais, que já tiveram seus efeitos comprovados em estudos clínicos, tais como o óleo de melaleuca e o óleo de manjerição (Orchard *et al.*, 2018).

Frente à semelhança na inibição da cepa *C. acnes*, pode-se inferir que a NE-MF obtida resultou em uma inibição do crescimento do microrganismo causador da acne vulgar, podendo ser promissora na utilização como um cosmético para o cuidado da acne, uma vez que, quando comparada ao óleo essencial puro e substâncias já utilizadas rotineiramente no tratamento da acne, apresentou inibição satisfatória.

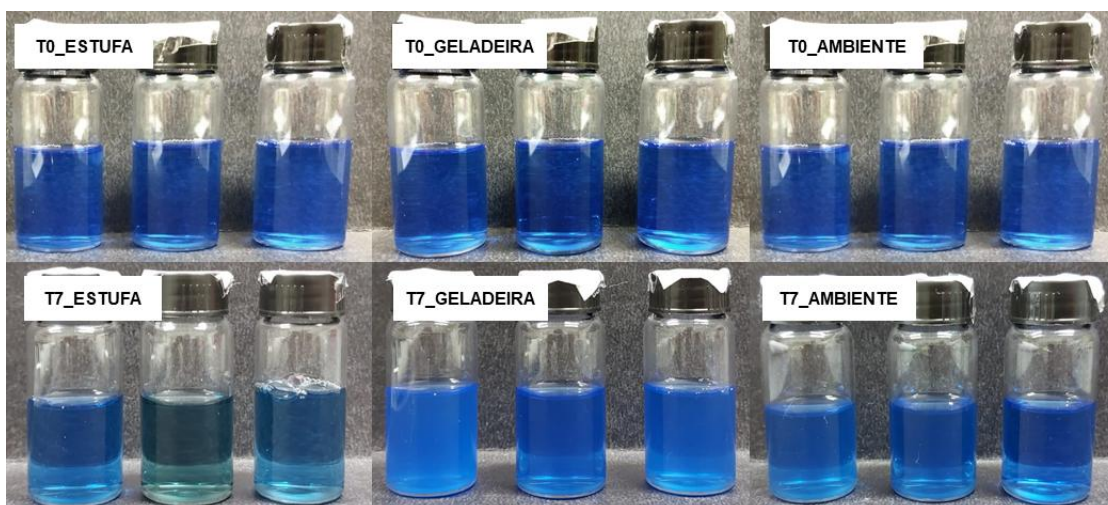
5.7.3. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Após a determinação da melhor nanoemulsão, foi iniciado o estudo de estabilidade, para avaliar a influência do tempo e temperatura sobre o tamanho médio de gotícula, PDI, potencial zeta e pH.

Todas as formulações foram avaliadas macroscopicamente durante os 90 dias de análise, também como foram avaliados o pH, o tamanho médio de gotícula, PDI e o potencial zeta.

A figura 29, mostra a influência nos parâmetros macroscópicos das formulações durante o período de 7 dias, nas condições de temperatura, em estufa, em geladeira e em temperatura ambiente. Foi possível perceber a mudança de coloração, logo nos primeiros 7 dias, nas formulações que estão armazenadas na estufa. A coloração azul começa a ter alterações de azul escuro para azul claro. Após 14 dias de estudo, a coloração mudou totalmente de azul para amarelo.

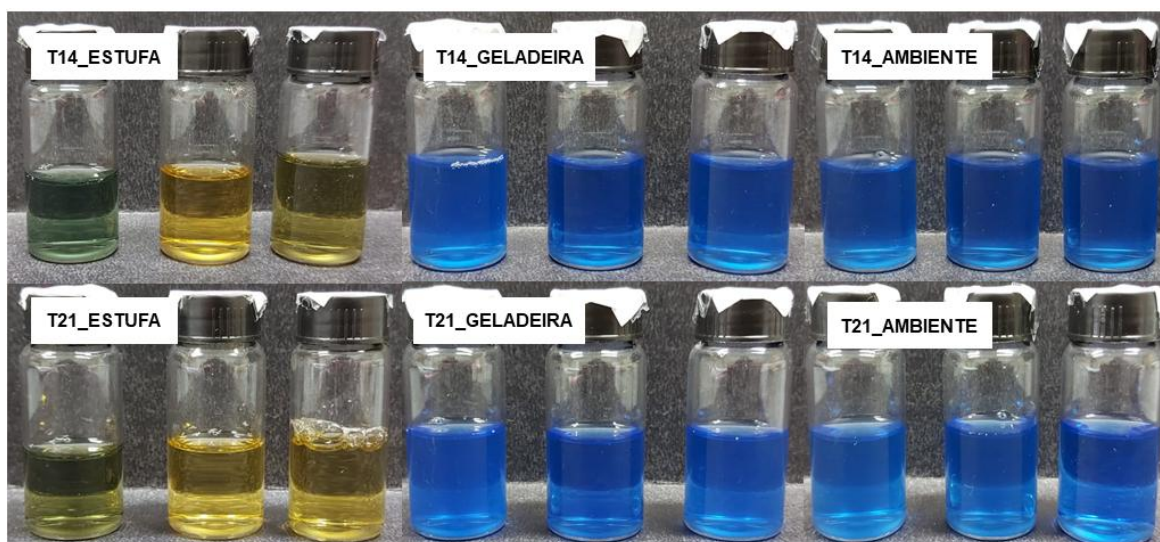
Figura 29 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 7 dias, às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

Nos primeiros sete dias de análise, notou-se uma diferença de coloração das amostras que estavam acondicionadas em estufa, enquanto nas outras condições permanecem iguais.

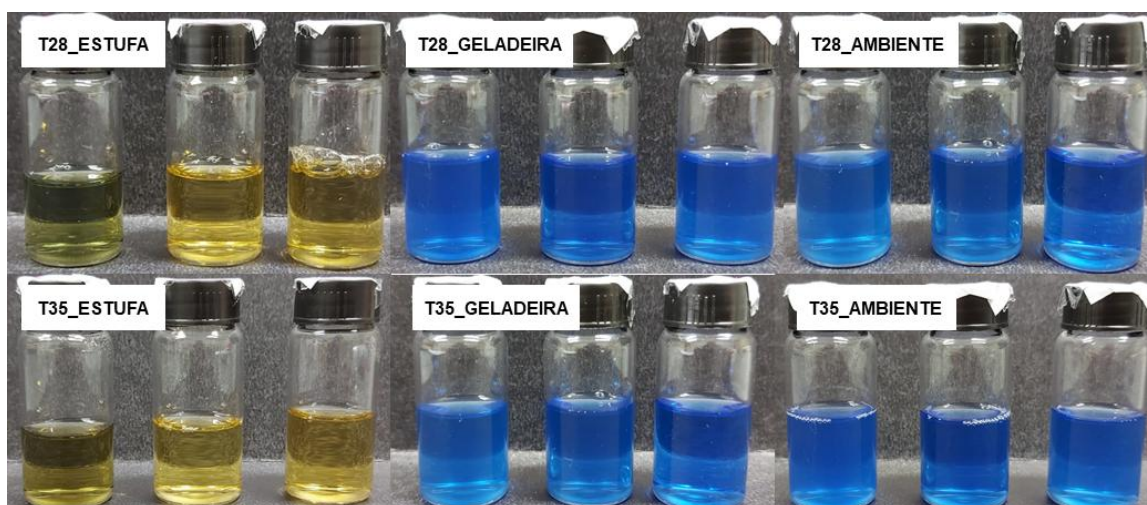
Figura 30 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 21 dias, às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

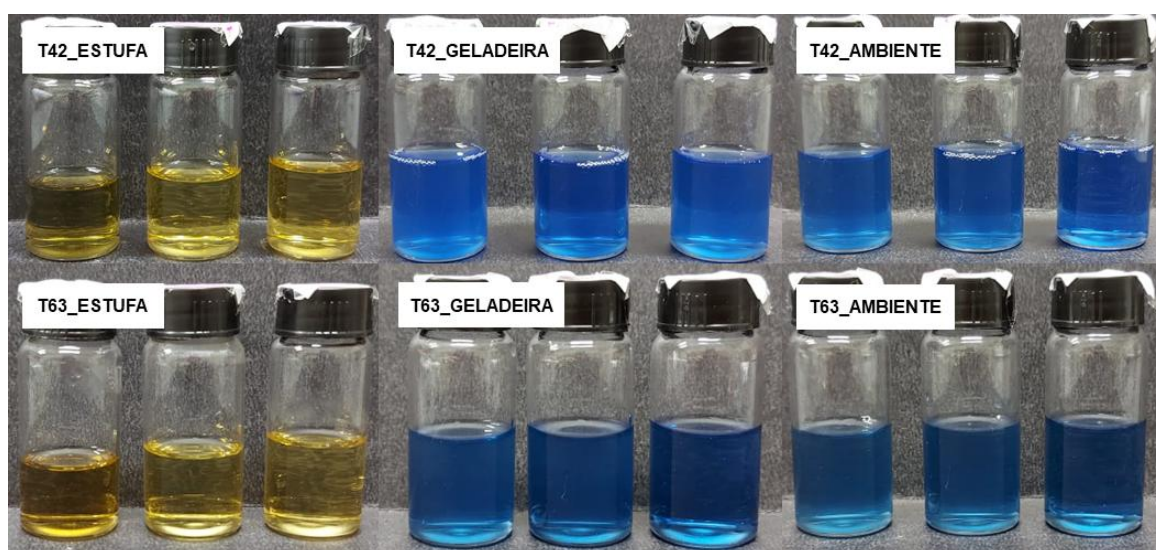
Após 14 dias, as amostras armazenadas na estufa mudaram a coloração totalmente, de azul para amarelo, o que pode indicar uma instabilidade ao calor.

Figura 31 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 35 dias, às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)



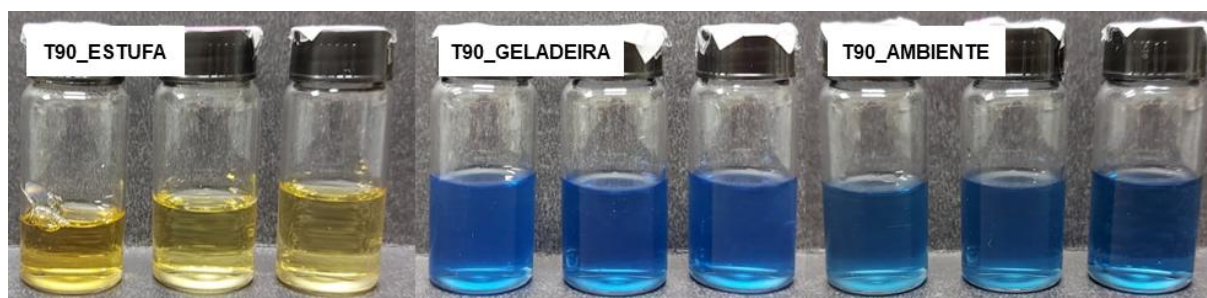
Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 32 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 63 dias, às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

Figura 33 – Nanoemulsões submetidas, durante o período de 90 dias, às condições de armazenamento: estufa ($37 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$), geladeira ($5 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e ambiente ($25 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$)



Fonte: Elaborado pela autora.

Avaliando macroscopicamente as formulações, após 90 dias de análise, já é possível perceber, que nas condições ambiente e geladeira não houve degradação.

A tabela 13 apresenta os valores de tamanho médio de gotícula $\pm$ desvio padrão, no período de 90 dias de análise, para as condições de estresse: estufa, geladeira e temperatura ambiente.

Tabela 13. Tamanho médio de gotícula $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	Tamanho (nm)		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
0	$14,926 \pm 0,493$	$15,43 \pm 0,902$	$29,292 \pm 21,302$
7	$14,531 \pm 0,510$	$16,326 \pm 0,812$	$17,090 \pm 2,330$
14	$12,996 \pm 0,264$	$17,19 \pm 1,344$	$20,61 \pm 7,503$
21	$14,390 \pm 0,926$	$17,377 \pm 1,264$	$14,775 \pm 0,736$
28	$14,881 \pm 2,413$	$17,866 \pm 3,356$	$17,504 \pm 1,448$
35	$13,718 \pm 0,144$	$16,387 \pm 0,491$	$15,994 \pm 0,602$
42	$17,895 \pm 0,607$	$13,723 \pm 0,560$	$18,235 \pm 1,418$
63	$11,970 \pm 0,635$	$15,92 \pm 0,488$	$15,463 \pm 1,048$
90	$13,020 \pm 0,951$	$18,922 \pm 0,710$	$17,152 \pm 0,421$

Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 14 apresenta os valores de PDI $\pm$ desvio padrão, no período de 90 dias de análise, para as condições de estresse: estufa, geladeira e temperatura ambiente.

Tabela 14. Valor médio de PDI $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	PDI		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
0	0,212 $\pm$ 0,075	0,249 $\pm$ 0,041	0,296 $\pm$ 0,086
7	0,162 $\pm$ 0,032	0,266 $\pm$ 0,079	0,291 $\pm$ 0,067
14	0,120 $\pm$ 0,050	0,328 $\pm$ 0,061	0,345 $\pm$ 0,026
21	0,188 $\pm$ 0,014	0,317 $\pm$ 0,052	0,249 $\pm$ 0,037
28	0,151 $\pm$ 0,047	0,297 $\pm$ 0,090	0,307 $\pm$ 0,036
35	0,184 $\pm$ 0,024	0,321 $\pm$ 0,039	0,315 $\pm$ 0,033
42	0,381 $\pm$ 0,048	0,184 $\pm$ 0,011	0,403 $\pm$ 0,051
63	0,096 $\pm$ 0,045	0,286 $\pm$ 0,032	0,313 $\pm$ 0,037
90	0,163 $\pm$ 0,035	0,382 $\pm$ 0,042	0,362 $\pm$ 0,023

Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 15 apresenta os valores de potencial zeta médio, em módulo, $\pm$ desvio padrão, no período de 90 dias de análise, para as condições de estresse: estufa, geladeira e temperatura ambiente.

Tabela 15. Potencial zeta médio $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	Potencial Zeta (mV)		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
0	10,272 $\pm$ 5,522	20,877 $\pm$ 3,107	21,766 $\pm$ 6,463
7	1,519 $\pm$ 1,790	16,855 $\pm$ 4,120	20,067 $\pm$ 2,434
14	0,519 $\pm$ 4,670	21,39 $\pm$ 6,733	17,888 $\pm$ 3,164
21	2,419 $\pm$ 1,299	17,057 $\pm$ 7,643	17,607 $\pm$ 5,797
28	0,086 $\pm$ 2,466	18,9 $\pm$ 3,769	11,362 $\pm$ 1,305
35	1,012 $\pm$ 3,428	16,116 $\pm$ 4,779	13,744 $\pm$ 1,467
42	15,067 $\pm$ 5,253	0,907 $\pm$ 1,501	12,965 $\pm$ 0,995
63	1,190 $\pm$ 1,469	13,864 $\pm$ 5,292	12,900 $\pm$ 0,816
90	0,606 $\pm$ 1,219	15,388 $\pm$ 2,674	13,100 $\pm$ 1,476

Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 16 apresenta os valores médio de pH $\pm$ desvio padrão, no período de 90 dias de análise, para as condições de estresse: estufa, geladeira e temperatura ambiente.

Tabela 16. Valores médio de pH $\pm$ desvio padrão, durante 90 dias de análise.

Dia	pH		
	Estufa	Geladeira	Ambiente
1	3,75 $\pm$ 0,01	3,75 $\pm$ 0,10	3,78 $\pm$ 0,02
7	3,92 $\pm$ 0,27	3,32 $\pm$ 0,05	3,66 $\pm$ 0,04
14	3,12 $\pm$ 0,01	3,36 $\pm$ 0,04	3,6 $\pm$ 0,03
21	2,85 $\pm$ 0,01	3,08 $\pm$ 0,01	2,98 $\pm$ 0,01
28	2,71 $\pm$ 0,07	3,07 $\pm$ 0,07	2,94 $\pm$ 0,04
35	0,00	2,92 $\pm$ 0,14	2,58 $\pm$ 0,10
42	0,00	2,86 $\pm$ 0,13	2,54 $\pm$ 0,10
63	0,00	2,84 $\pm$ 0,13	2,50 $\pm$ 0,09
90	0,00	2,80 $\pm$ 0,13	2,48 $\pm$ 0,08

Fonte: Elaborado pela autora.

As tabelas apresentadas mostram que ocorreu variação superior a 10% no tamanho médio de gotícula no período de 90 dias de análise, para todas as condições de armazenamento: estufa, geladeira e ambiente.

A análise do tamanho médio de gotícula é um fator que deve ser considerado, para determinar a estabilidade das nanoemulsões, pois o movimento Browniano das gotículas e o pequeno tamanho, permite a redução do efeito da gravidade sobre as formulações, porém, o fenômeno de *Ostwald ripening*, provoca o aumento da gotícula, afetando a estabilidade do sistema e podendo ocasionar uma possível separação de fases (McClements, 2018; Figueiredo, 2019).

Todas as formulações não apresentaram sinais de instabilidade, macroscopicamente, como cremeação, separação de fases ou sedimentação, o que justifica o tamanho permanecer na escala nanométrica, durante o período avaliado.

O valor médio de PDI também sofreu variações superiores a 10%; porém, nota-se que a variação foi inferior nas condições de armazenamento em geladeira e

temperatura ambiente, mostrando que o resultado final do valor médio de PDI não aumentou a ponto de indicar um sinal de instabilidade macroscópica.

O potencial zeta apresentou variação superior a 10% nas condições de temperatura ambiente e em geladeira, porém, na condição de temperatura ambiente, essa variação foi inferior. O potencial zeta é um parâmetro importante para a avaliação da estabilidade das formulações frente à floculação: quanto mais próximo de 30 mV, em módulo, maior a atuação das forças repulsivas da dupla camada, do que as forças atrativas de Vander Waals, sugerindo, assim, maior estabilidade (Friberg; Jansson; Cederberg, 1976; Jafari; McClements, 2018).

A diminuição nos valores de potencial zeta, podem gerar problemas na estabilidade das nanoemulsões, o que relata a possibilidade de aumento na tendência à floculação (Maruno e Filho, 2010). Apesar das formulações apresentarem valores inferiores a 30 mV, nenhuma formulação apresentou sinais de instabilidade, macroscopicamente.

O pH se manteve estável até o 28º dia de análise. Após esse período, não foi possível realizar a aferição do valor de pH para as amostras armazenadas em estufa, ou seja, houve a completa degradação da formulação. Nas condições de armazenamento em geladeira e em temperatura ambiente, isso não aconteceu, apesar da variabilidade ter sido superior a 10%, os valores tiveram um decaimento menor a partir do 35º dia.

Os valores de pH altamente negativos, são decorrentes da interação eletrostática de repulsão, que tornam os valores de pH afastados do ponto isoelétrico. Em consequência, tornam o potencial zeta mais positivo ou negativo.

Mediante os resultados apresentados e devido à atividade antioxidante apresentada, sugere-se que a formulação seja acondicionada em frasco opaco, com proteção da luz, de preferência um frasco sem entrada de luz, de vidro e com a tampa do tipo conta gotas.

6. CONCLUSÕES

Após a realização dos ensaios, pode-se concluir que o óleo essencial de *A. millefolium* L. é “ligeiramente solúvel” apenas na presença de Etanol 70% (v/v) e na presença de Metanol PA, Acetona PA, Clorofórmio PA, Etanol PA e Isoprapanol PA, apresentou-se como “muito solúvel”.

Foi possível caracterizar a composição percentual do óleo, tendo sido identificados 22 compostos.

O óleo apresenta atividade antioxidante frente aos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}.

Foi possível determinar o EHLr do óleo essencial de *A. millefolium* L. de 15,00 e verificar a influência de diferentes pares de tensoativos, sendo o mais eficaz o par formado por PPG-S-Ceteth 20 e o PPG 4 Dioleate.

Foi possível, ainda, determinar a CIM do óleo para as cepas *S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. acnes*. A nanoemulsão obtida promoveu uma inibição do crescimento do microrganismo causador da acne vulgar, podendo ser promissora na utilização como um cosmético para o cuidado da acne.

Foi possível avaliar a estabilidade da nanoemulsão que se mostrou estável ao ser armazenada em temperatura ambiente e na geladeira.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY**, ed. 4.1, 30 Jan. 2017.

Disponível em: https://diabloanalytical.com/ms/essential-oil-components-by-gcms/essential_oil_components_ebook.pdf. Acesso em: 12. Maio. 2022.

ADHAVAN, P.; KAUR, G.; PRINCY, A.; MURUGAN, R. Essential oil nanoemulsions of wild patchouli attenuate multi-drug resistant gram-positive, gram-negative and *Candida albicans*. **Industrial Crops and Products**, v. 100, p. 106–116, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.02.015>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092666901730105X>. Acesso em: 02. Fev. 2023.

AGOSTINHO, L. C. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsão cosmética à base de óleos naturais de urucum (*Bixa orellana*) e café verde (*Coffea arabica*)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, 2017. DOI: <https://doi.org/10.11606/D.60.2017.tde-03072017-100718>. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-03072017-100718/pt-br.php>. Acesso em: 12. Maio. 2022.

ALMEIDA-CINCOTTO, M. J. **Extrato de folhas de *Morus nigra* L.: prospecção de novo ativo e sua aplicação em produto cosmetodermatológico**. 2016. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara, 2016.

ALMEIDA, F. B. **Nanoemulsão contendo óleo fixo de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.)**: desenvolvimento de um produto cosmético inovador para a pele. 2021. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Araraquara, 2020.

ARTIGA-ARTIGAS, M.; ACEVEDO-FANI, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Improving the shelf life of low-fat cut cheese using nanoemulsion-based edible coatings containing orégano essential oil and mandarin fiber. **Food Control**, v. 76, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S095965261730105X>. Acesso em: 12. Maio. 2022.

APEL, L. *et al.* Phytochemical characterization of different yarrow species (*Achillea* sp.) and investigations into their antimicrobial activity. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 76, n. 1-2, 2021, p. 55-65. DOI: <https://doi.org/10.1515/znc-2020-0149>.

AYOABI, F. *et al.* Bio-effectiveness of the main flavonoids of *Achillea millefolium* in the pathophysiology of neurodegenerative disorders- a review. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 20, n. 6, p. 604–612, 2017.

BOU, G. Minimum inhibitory concentration (MIC) analysis and susceptibility testing of MRSA. In: JI, Y. (ed.). *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) protocols*. New York: Humana Press, 2007. p. 29–49. (Methods in Molecular Biology, v. 391). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59745-468-1_3. PMID: 18025667.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia: Centro Científico Conhecer, v. 7, n. 12, 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira: volume 1*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia de estabilidade dos cosméticos*. Brasília: Anvisa, 2004. (Série Qualidade em Cosméticos, v. 1). Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-de-estabilidade-de-cosmeticos.pdf>. Acesso em: 05. Ago. 2020.

CANDAN, F. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 87, p.215-220, 2003.

CAMARGO, M. F. P. De. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade anti-inflamatória tópica**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CEFALI, L. C. *et al.* Invitro activity and formulation of a flavonoid-containing cashew pulp extract for the topical treatment of acne and the protection of skin against premature aging. **Natural Product Research**. 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1747454.

CHIARI, Bruna Galdorfini *et al.* Estudo da segurança de cosméticos: Presente e futuro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 323–330, 2012.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. *Approved Standards* - 10 th ed. Wayne, PA: CLSI standard M07, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2018.

CRUZ, T. A. *et al.* Antimicrobial and synergistic activity of essential oils facing isolated bacteria from surgical staff's hands. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*, v. 5, 2019. DOI: <https://doi.org/10.26694/repis.v5i0.8970>.

Cruz, Tatiana & Torres, Fernanda & Petrucelli, Monise & Abreu, Mariana & Silva, Silvia & Marins, Mozart & Beleboni, Renê & Fachin, Ana. (2019). ANTIMICROBIAL AND SYNERGISTIC ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FACING ISOLATED

BACTERIA FROM SURGICAL STAFF'S. *Revista Prevenção de Infecção e Saúde*. 5. 10.26694/repis.v5i0.8970.

COBAN AY. Rapid determination of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* clinical isolates by colorimetric methods. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 7, p. 2191–2193, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00471-12>.

CORRÊA, M. A. **Cosmetologia**: ciência e técnica. São Paulo: Editora Medfarma, 2012.

DANIEL, P. S. **Composição e atividade antimicrobiana do óleo essencial de mil folhas (*Achillea millefolium* L.)**. 2019. Dissertação (Mestrado Profissional em Plantas Medicinais e Fitoterápicos na Atenção Básica) – UNIPAR, 2019.

DUARTE, J. L. *et al.* Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 2, p. 189–192, mar. 2015.

DUARTE, J. L. **Obtenção e caracterização de nano-emulsões contendo o óleo essencial de *Matricaria chamomilla* L.** Macapá. 2019. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Amapá, UNIFAP, 2019.

DUARTE, M.C.T. *et al.* Atividade antimicrobiana de extratos hidro alcoólicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 6–8, 2004.

EL-KALAMOUNI, Chaker *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France. **Medicines** (Basel, Switzerland), v. 4, n. 2, 30, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/medicines4020030>.

GAZIM, Z. C. Comparação da atividade antimicrobiana dos sabonetes contendo digluconato de clorexidina, triclosan e óleo essencial de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, Umuarama, v.11, n.1, p. 27-32, jan./abr. 2007.

FERNANDES, M. R. S. M. **Nanotecnologia na dermofarmácia**: Aplicação ao tratamento da acne. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2016.

FIGUEIREDO, B. K. **Caracterização química dos óleos essenciais de *Lavandula angustifolia* e *Lavandula dentata*, ensaios “in vitro” e aplicação em nanoemulsões**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2019.

FOX, L. *et al.* Treatment Modalities for Acne. Centre of Excellence for Pharmaceutical Sciences, North-West University, Private Bag X6001, Potchefstroom

2520, South Africa. **Molecules** 2016, 21(8), 1063.
<https://doi.org/10.3390/molecules21081063>.

FRIBERG, S.; JANSSON, P. O.; CEDERBERG, E. Surfactant association structure and emulsion stability. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 55, p. 614-623, 1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(76\)90072-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(76)90072-2). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0021979776900722>. Acesso em: 02. Mai. 2022.

GRICE, E. A. Genetics and Molecular Biology Branch, National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, 20892–4442, USA. **Nat Rev Microbiol**. 2011 April; 9(4): 244–253. doi:10.1038/nrmicro2537.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, abr. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2537>. PMID: 21407241. PMCID: PMC3535073. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3535073/> Acesso em: 02. Mai. 2022.

GUIMARÃES, L. G. DE L. *et al.* Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476–1480, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000600037>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/DLX5hbHSj4k9bszxxsZgGdk/> Acesso em: 02. Mai. 2022.

GUPTA, A.; *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, p. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1039/C5SM02958A>. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/295847717_Nanoemulsions_Formation_Properties_and_Applications. Acesso em: 30 abr. 2022.

GRICE, E. A. *et al.* A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v. 18, n. 7, p. 1043–1050, jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.075549.107>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18502944/>. Acesso em: 30. Abr. 2022.

Hofmann, L. *et al.* Essential oil composition of three polyploids in the *Achillea millefolium* ‘complex’. **Phytochemistry**. v. 31, n. 2, p. 537-542, 1992.

HOWYZEH, M. S.; ASLANI, S.; POORASKARI, O. Essential Oil Profile of an Iranian Yarrow (*Achillea millefolium*). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 22, n. 1, p. 295–300, 2019. DOI: 10.1080/0972060X.2019.1586589.

ISAAC, V. L. B. *et al.* Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

ISABEL, A. N. A.; DA, Ferreira; SOUSA, Silva. Orientadora: Maria Lídia Palma. **Monografia da Achillea millefolium L.** 2017. Dissertação (Mestrado). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa, PT, 2017.

JAFARI, S. M.; McCLEMENTS, D. J. **Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization**. London, UK: Academic Press, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-012-811838-2.09994-X>.

JESUS, F. L. M.; ALMEIDA, F. B.; DUARTE, J. L.; OLIVEIRA, A. E. M. F. M.; CRUZ, R. A.; SOUTO, R. N. P.; FERREIRA, R. M. A.; KELMANN, R. G.; CARVALHO, J. C. T.; LIRA-GUEDES, A. C.; GUEDES, M.; SOLANS, C.; FERNANDES, C. P. Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a LowEnergy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, Article ID 6756793, 8p., 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6756793>.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J Nanopart Res**, v. 11, p. 77-89, 2009.

KATZ, Linda M.; DEWAN, Kapal; BRONAUGH, Robert L. Nanotechnology in cosmetics. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 127–137, 2015.

LIMA, M. C. **Atividade biológica e parâmetros bioquímicos e fisiológicos influenciados por fatores abióticos em *Achillea millefolium* L.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013.

LYRA, Luciana. **Desenvolvimento de nanoemulsão de geraniol e óleo essencial da palmarosa (*Cymbopogon martinii*) e sua ação inibitória sobre linhagens de *Cutibacterium acnes***. 2019. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp, 2019.

MANAIA, E. B. **Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos multifuncionais contendo nanopartículas de TiO₂ para proteção solar e liberação controlada de terpinem-4-ol**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista. “Universidade Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, p. 91, 2012.

MARUNO, M.; ROCHA-FILHO, P. A. O/W Nanoemulsion after 15 years of preparation: A suitable vehicle for pharmaceutical and cosmetic applications. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 31, n. 1, p. 17–22, 2009.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. *Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity: based on recommendations from an international workshop organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM)*. [S.l.]: National Toxicology Program, 2001. 102 p. Disponível em:

https://ntp.niehs.nih.gov/sites/default/files/iccvam/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf. Acesso em: 30 jul. 2022.

NETTO, A. P. RAFFAELLI, G. Produção experimental de mil folhas (*Achillea millefolium* L.), visando à extração de óleo essencial. **Revista Acadêmica: ciências agrárias e ambientais**. Curitiba, v. 2, n. 3, p. 27-31, jul./set. 2004.

ORCHARD, A.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A.; KAMATOU, G. The in vitro antimicrobial evaluation of commercial essential oils and their combinations against acne. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 40, n. 3, p. 226–243, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/ics.12456>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/ics.12456>. Acesso em: 30 jul. 2022.

OSTROSKY, E.A. *et al.* Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2007. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-488670>. Acesso em: 14. Jul. 2025.

PAIN, S. *et al.* Surface rejuvenating effect of *Achillea millefolium* extract. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 6, p. 535–542, 2011.

PAIVA, M. R. F. **Produção e qualidade de óleo essencial da *Lippia gracilis* Schauer em função de doses de nitrogênio na ausência e presença de fósforo**. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2014.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. *et al.* Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, n. 3, p. 274-285, 2008.

PERRY, A. L.; LAMBERT, P. A. Propionibacterium acnes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 185–188, 2006.

PLATSIDAKI, E.; DESSINIOTI, C. Recent advances in understanding *Propionibacterium acnes* (*Cutibacterium acnes*) in acne. **F1000Research**, v. 7, p. 1953, 2018. DOI: <https://doi.org/10.12688/f1000research.15659.1>. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/7-1953/v1>. Acesso em: 30. Jul. 2022.

QIAN, C.; DECKER, E. A.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsion delivery systems: influence of carrier oil on β -carotene bioaccessibility. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1440–1447, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S030881461201054X>. Acesso em: 30. Jul. 2022.

SADDIQ AA, Al-Ghamdi H. Aloe vera extract: A novel antimicrobial and antibiofilm against methicillin resistant Staphylococcus aureus strains. **Pak J Pharm Sci**. v. 31, n. 5, (Supplementary), p. 2123-2130, 2018.

SADRNIA, M. ARJOMANDZADEGAN, M. Comparative study on the effects of *Aloe vera* extract in clinical strains of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* compared to antibiotics of choice. **Arak Medical University Journal** (AMUJ); 2014; 17(87): 39-46.

SANTOS, A. C. *et al.* Nanotechnology for the development of new cosmetic formulations. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 16, n. 4, p. 313–330, 2019.

SHAH, RAHUL. PATEL, A. SHAH, M. PEETHAMBARAN, B. Anti-acne activity of *Achillea* 'Moonshine' petroleum ether extract. **Journal of Medicinal Plants Research**. Vol. 9(27), pp. 755-763, 17 July, 2015. DOI: 10.5897/JMPR2015.5792.

SCHEFFER, MC. **Influência da adubação orgânica sobre a biomassa, o rendimento e a composição do óleo essencial de *Achillea millefolium* L.-mil folhas**. Dissertação (Mestrado) – Agronomia Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, 2012.

SERPA, R. Crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos em *Achillea millefolium* L. cultivada sob diferentes níveis de sombreamento e doses de nitrogênio. **Ciência Rural**, v.41, n.1, jan, 2011. p. 45–50, 2011.

SILVA, Rosali M.F. *et al.* Caracterização físico-química e análises por espectrofotometria e cromatografia de *Peperomia pellucida* L. (H. B. K.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. Suppl. 1, p. 717–726, 2014.

SILVA, M. O. **Atividade antioxidante e composição de oligossacarídeos em subproduto obtido do processamento industrial da goiaba (*Psidium guajava*)**. 2015. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 10, p. 102– 110, 2005.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012.

PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate, simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2720–2723, 2002.

PALOMINO J.C., MARTIN A., PORTAELS F. Rapid drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*: a review of colourimetric methods. **Clinical Microbiol. Infection**. v. 13, p. 754–762, 2007.

PEREIRA, T. A. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A à base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. 2011. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, 2011.

VERMA, Ram S. *et al.* Chemical composition and allelopathic, antibacterial, antifungal and in vitro acetylcholinesterase inhibitory activities of yarrow (*Achillea millefolium* L.) native to India. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. May, p. 144–155, 2017.

TIAN, H.; LI, D.; XU, T.; HU, J.; RONG, Y.; ZHAO, B. Citral stabilization and characterization of nanoemulsions stabilized by a mixture of gelatin and Tween 20 in an acidic system. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 2991–2998, 2017.

UL PROSPECTOR. Disponível em: <http://www.ulprospector.com>. Acesso em: 08. Abr. 2023.

YARNELL, E. ABASCAL, K. (2006). Herbal Medicine for Acne Vulgaris. **Alternative and Complementary Therapies**. New Rochelle, NY, v. 12, p. 303–309, 2006. DOI: 10.1089/act.2006.12.303. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/275200305_Herbal_Medicine_for_Acne_Vulgaris. Acesso em: 02. Fev. 2023.

Apêndice A – Certificado de análise química – Óleo essencial *Achillea millefolium*.



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química / Colegiado de Extensão
Telefax : (31) 3409-5724 – e-mail: núcleo@qui.ufmg.br

UFMG

CERTIFICADO DE ANÁLISE QUÍMICA

Solicitante: LASZLO AROMATERAPIA LTDA. CNPJ: 07.997.093/0001-10

ÓLEO ESSENCIAL de MILEFÓLIO AZUL DARK TP BULGÁRIA

Nome comercial: Óleo Essencial de Milefólio Azul, Mil Folhas

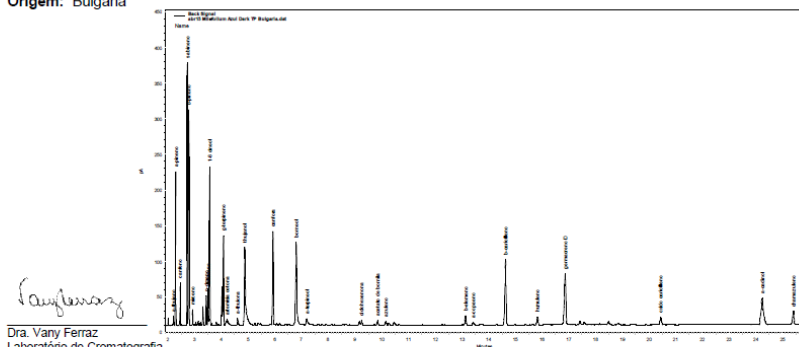
Nomenclatura botânica: *Achillea Millefolium*

Extração: Destilação por arraste a vapor

Método de cultivo: Orgânico não certificado

Parte da planta: Folhas

Origem: Bulgária



Dra. Vany Ferraz
Laboratório de Cromatografia
Departamento de Química – UFMG
vanyferraz@ufmg.br
Belo Horizonte, 17/04/2015

Método de análise:

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução. Cromatógrafo a Gás AGILENT 7820A.
Coluna: HP-5 30m x 0,32mm x 0,25 µm (AGILENT). Temp.: Coluna: 70°C (0min), 3°C/min a 250°C.
Injetor: 250°C. Split: 1/50. Detector FID: 250°C. Vol. de injeção: 1 µl (conc 1.0 % em clorofórmio)

Composição Química:

	Constituente ID	%
1	α-thujeno	0.4
2	α-pineno	4.7
3	canfeno	1.6
4	sabineno	9.5
5	β-pineno	7.8
6	mirreno	0.7
7	p-cimeno	1.3
8	limoneno	1.8
9	1-8 cineol	7.2
10	γ-terpineno	6.5
11	artemisia cetona	1.1
12	α-thuiona	0.5
13	thujanol	8.4
14	canfora	6.4
15	borneol	7.6
16	α-terpineol	1.0
17	ciclohexenona	0.4
18	acetato de bornila	0.4
19	azuleno	0.4
20	β-elemeno	1.0
21	α-copaeno	0.3
22	β-cariofileno	7.2
23	humuleno	0.9
24	germacreno D	6.3
25	óxido cariofileno	1.0
26	α-cadinol	5.4
27	chamazuleno	1.7

Av. Antônio Carlos, 6627 – Campus – Pampulha – Belo Horizonte/MG-Brasil - Cep: 31.270-901

Apêndice B – Caracterização química – Óleo essencial *Achillea millefolium*.