

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/01/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

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



**Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do
ácido ursólico e sua incorporação em emulsão
cosmética**

Fernanda Cardoso Colombo

Araraquara - SP
2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do
ácido ursólico e sua incorporação em emulsão
cosmética**

Fernanda Cardoso Colombo

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C718a

Colombo, Fernanda Cardoso

Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do ácido ursólico e sua incorporação em emulsão cosmética / Fernanda Cardoso Colombo. – Araraquara, 2018.
123 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.

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. Ácido ursólico (AU). 2. Antioxidante. 3. Despigmentante. 4. Antimicrobiana. 5. Citotóxico.
6. CLAE. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAL	41
4.2. MÉTODOS	43
4.2.1. Caracterização de MPAU	44
4.2.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU	45
4.2.3. Preparo das emulsões	55
4.2.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão	56
4.2.5. Avaliação da estabilidade das emulsões	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Caracterização de MPAU	65
5.1.1. Identificação qualitativa do AU por espectroscopia na região IV	65
5.1.2. Avaliação da solubilidade do AU	67
5.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU	68
5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante	68
5.2.2. Avaliação da atividade despigmentante	72
5.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	75
5.2.4. Avaliação do potencial citotóxico	79
5.3. Preparo das emulsões	81

5.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão	85
5.4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE	85
5.4.2. Validação da metodologia desenvolvida.....	90
5.5. Avaliação da estabilidade das emulsões.....	100
5.5.1. Teste de centrifugação	101
5.5.2. Aspecto, cor e odor.....	102
5.5.3. Determinação de pH.....	105
5.5.4. Determinação da viscosidade.....	106
5.5.5. Determinação do teor de AU	108
6. CONCLUSÕES	110
7. REFERÊNCIAS.....	112

RESUMO

O aumento da preocupação com a estética e saúde corporal vem elevando a demanda por produtos cosméticos contendo ativos que previnam o envelhecimento e outras alterações cutâneas. O ácido ursólico (AU), ativo natural extraído de plantas como o alecrim e o manjeriço, tem se demonstrado interessante para incorporação em cosméticos por possuir potencial antioxidante, despigmentante, propriedade antimicrobiana, entre outras. Este trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade da utilização do AU como um ativo cosmético multifuncional através da avaliação da eficácia e citotoxicidade *in vitro* do AU, bem como o preparo e avaliação de uma emulsão contendo o ativo. O potencial antioxidante do AU foi avaliado por meio de métodos de inibição de radicais como o 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH^{*}) e o 2,2 -azino bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS⁺), tendo demonstrado atividade antioxidante, com IC₅₀ de 235,61 µg/mL para técnica com DPPH^{*} e 107,17 µg/mL para técnica com ABTS⁺. A atividade despigmentante foi verificada através da inibição da enzima tirosinase, utilizando 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) como substrato, e apresentando como resultado um IC₅₀ de 338,00 µg/mL. Para a avaliação da atividade antimicrobiana diversas cepas foram testadas a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas, e da concentração bactericida mínima (CBM) pela replicação em placa de Petri, seguindo suplemento M100-S16 do CLSI. O AU demonstrou atividade antimicrobiana frente a cepa *S.aureus* com CIM de 25 µg/mL e CMB de 50 µg/mL; para *S. epidermides* com CIM de 25 µg/mL e CBM de 50 µg/mL; para *E.coli*, com CIM de 50 µg/mL e CBM de 50 µg/mL; a cepa *P. aeruginosa* revelou uma CIM de 25 µg/mL e CBM= 0. O potencial citotóxico *in vitro* foi avaliado através de técnica utilizando o corante 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- (MTT) e queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes, não tendo demonstrado citotoxicidade às células em uma concentração máxima de 50 µg/mL. Para incorporação em cosmético foi escolhida uma emulsão de alta estabilidade e como técnica de controle de qualidade do AU nessa emulsão foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE, utilizando os preceitos de química verde. Um estudo de estabilidade preliminar da emulsão preparada foi conduzido a fim de se avaliar a estabilidade do AU em uma emulsão estável frente a condições extremas, como temperaturas de 25, 40 e 5 °C, luz indireta e ciclos de congelamento/ descongelamento. A emulsão preparada com AU demonstrou estabilidade para as características de pH e viscosidade, e com relação ao teor, foi mais estável a temperatura de 25 e 5 °C. O AU, através dos ensaios *in vitro* realizados demonstrou caráter antioxidante, despigmentante e antimicrobiano, não sendo observada citotoxicidade às células utilizadas na faixa de concentração testada, além de ter demonstrado certa estabilidade na emulsão de escolha. Como pôde ser observado, este composto multifuncional demonstrou características *in vitro* de grande interesse para ser utilizado como ativo cosmético de uso tópico e possivelmente como um agente antimicrobiano, sendo assim necessário estudos mais aprofundados que possam garantir sua completa segurança e eficácia de uso.

Palavras-chave: ácido ursólico (AU); antioxidante; despigmentante; antimicrobiana; citotóxico; CLAE.

ABSTRACT

Increased concern with body esthetics and health has raised the demand for skin cosmetics containing actives that prevent aging and other skin changes. Ursolic acid (UA), a natural active extracted from plants as rosemary and basil, has shown an interesting compound for cosmetic incorporation, to possess antioxidant activity, depigmenting, antimicrobial property, among others. This study aimed to evaluate the possibility of using UA as a multifunctional cosmetic compound through the UA efficacy and cytotoxicity *in vitro*, and to prepare and evaluate an emulsion containing the substance. Antioxidant potential was tested using inhibition methods of radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) and radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) showing antioxidant activity, with IC₅₀= 235,61 µg/mL for DPPH[•] technique and 107,17 µg/mL to ABTS^{•+} method. The depigmenting activity was given by inhibition of the enzyme tyrosinase with 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) substrate and show IC₅₀ de 338,00 µg/mL. For evaluation of antimicrobial activity, many strains were tested from the minimum inhibitory concentration (MIC) determined by dilution method on microplates, and minimum bactericidal concentration (MBC) by Petri dish replication, following M100-S16 supplement CLSI. The UA demonstrated antimicrobial activity, with a MIC to *S. aureus* strain of 25 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; to *S. epidermidis* a MIC of 25 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; to *E. coli* a MIC of 50 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; the *P. aeruginosa* strain revealed a MIC of 25 µg/mL and MBC= 0. The cytotoxicity *in vitro* was determined for metabolically incompetent human keratinocytes ability reduce 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and as result the UA didn't present cellular cytotoxicity in a maximum concentration of 50 µg/mL. To cosmetic incorporation, a high stability emulsion was choice and as quality control technique of UA in this emulsion, an analytical methodology for HPLC was developed and validated, using green chemistry precepts. To evaluate the emulsion, a preliminary stability study was conducted, for the purpose evaluate the stability of UA in a stable emulsion, front of extreme conditions as 25, 40 e 5 °C temperatures, indirect light and freezing/ thawing cycles. The emulsion containing UA demonstrated stability for the pH and viscosity characteristics, and about content, was more stable with 25 and 5 °C. The UA, through *in vitro* assays performed demonstrated antioxidant, depigmenting and antimicrobial character, no cytotoxicity was observed in the used cells in the concentration range tested, besides showing some stability in the emulsion of choice. As noted, this multifunctional compound demonstrated *in vitro* characteristics of great interest for use as topical cosmetic active and possibly as an antimicrobial agent, thus further studies are needed to ensure its complete safety and efficacy of use.

Keywords: ursolic acid (UA), antioxidant, tyrosinase, antimicrobial, cytotoxic, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do AU e do AO.....	26
Figura 2. Radical DPPH [*] e sua forma reduzida.	30
Figura 3. Cascata de reações na produção dos pigmentos melânicos	32
Figura 4. Espectrofotômetro de absorção na região IV Vertex 70- Bruker	44
Figura 5. Esquema do preparo das microplacas para determinação da CIM	51
Figura 6. Preparo das amostras finais do ensaio com MTT.	53
Figura 7. Esquema da montagem das placas para o ensaio com MTT.....	54
Figura 8. Cromatógrafo Líquido Perkin Elmer Flexar	57
Figura 9. Espectro de absorção IV de PDAU	65
Figura 10. Espectro de absorção IV de MPAU	66
Figura 11. Sobreposição dos espectros IV de PDAU e MPAU.....	67
Figura 12. Tubos reacionais do AU frente ao DPPH [*]	69
Figura 13. Curva analítica do AU para a porcentagem de inibição de DPPH [*]	69
Figura 14. Curva analítica do AA para a porcentagem de inibição de DPPH [*]	70
Figura 15. Tubos reacionais do AU frente ao ABTS ⁺⁺	71
Figura 16. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição do ABTS ⁺⁺	71
Figura 17. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição do ABTS ⁺⁺	72
Figura 18. Placa reacional do ensaio com tirosinase e AU	73
Figura 19. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição da tirosinase	74
Figura 20. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição da tirosinase	74
Figura 21. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>S. aureus</i>	77
Figura 22. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>S. epidermidis</i>	77
Figura 23. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>E. coli</i>	77
Figura 24. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente a cepa <i>P. aeruginosa</i>	78
Figura 25. Placa reacional do ensaio de citotoxicidade com MTT.....	80
Figura 26. Emulsões preparadas sem AU (EM-BS) e com AU (EM-AU).....	83

Figura 27. Características microscópicas de EM-BS (a) e EM-AU (b).	84
Figura 28. Estrutura química do Poliacrilato de Sódio.....	84
Figura 29. Espectro UV de MPAU.	86
Figura 30. Espectro UV de PDAU.	86
Figura 31. Teste de concentrações	87
Figura 32. Comparação dos cromatogramas das amostras de PDAU e MPAU.....	88
Figura 33. Cromatograma final de MPAU 600 µg/mL.....	89
Figura 34. Curva analítica final de linearidade.....	91
Figura 35. Gráfico de dispersão de resíduos.....	92
Figura 36. Cromatogramas sobrepostos das SPcb, SPd e SAm.....	95
Figura 37. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de HCl.....	96
Figura 38. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de NaOH	96
Figura 39. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H ₂ O ₂	97
Figura 40. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H ₂ O a 80 °C.....	97
Figura 41. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de luz UV	98
Figura 42. Emulsões submetidas à centrifugação a 3000 rpm.	101
Figura 43. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 25 °C	102
Figura 44. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 40 °C	103
Figura 45. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em luz indireta	103
Figura 46. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em 5 °C	104
Figura 47. Aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T12 no ciclo de congelamento/descongelamento.....	104
Figura 48. Valores de pH da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar	105
Figura 49. Valores de pH da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar	106
Figura 50. Valores de viscosidade da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar ..	107
Figura 51. Valores de viscosidade da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar ..	107
Figura 52. Valores de teor de EM-AU ao longo dos 15 dias de experimento	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos tubos reacionais para ensaio com o radical DPPH*.....	46
Tabela 2. Composição dos tubos reacionais para ensaio com ABTS* ⁺	47
Tabela 3. Composição dos poços reacionais do ensaio com tirosinase.	49
Tabela 4. Fórmula da emulsão utilizada	55
Tabela 5. Preparo das soluções diluídas para análise da exatidão.	62
Tabela 6. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio antimicrobiano.....	76
Tabela 7. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio com MTT.....	80
Tabela 8. Resultados obtidos para conformidade do sistema.....	90
Tabela 9. Análise de variância dos valores obtidos na linearidade.....	92
Tabela 10. Teste t homocedástico para análise da precisão entre analistas	94
Tabela 11. Resultado final para exatidão.....	99
Tabela 12. Resultados obtidos no parâmetro de robustez.....	100
Tabela 13. Média e desvio padrão das concentrações (µg/mL) de AU na EM-AU no início, meio e fim do estudo de estabilidade preliminar, frente às condições submetidas	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de estudos em diversas áreas utilizando AU.	28
Quadro 2. Estudos envolvendo metodologias por CLAE para AU.....	38
Quadro 3. Significado dos termos descritivos de solubilidade.....	45
Quadro 4. Solubilidade do AU frente a solventes diversos.....	67
Quadro 5. Análise detalhada da emulsão utilizada.....	82
Quadro 6. Características físico-químicas das emulsões obtidas	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA-** Ácido ascórbico
- ABTS^{•+}**- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- AC-** Ácido Cafeico
- ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AO-** Ácido oleanólico
- AU-** Ácido Ursólico
- BPF-** Boas práticas de fabricação
- CG-** Cromatografia gasosa
- CIM-** Concentração Inibitória Mínima
- CLAE-** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CBM-** Concentração Bactericida Mínima
- DMSO-** dimetilsulfóxido
- DMEM-** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DPPH[•]**- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DPR-** Desvio padrão relativo
- EDTA-** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EM-AU-** Emulsão contendo ácido ursólico
- EM-BS-** Emulsão base
- F calc.** - Valor calculado do teste estatístico
- F tab.** - Valor tabelado do teste estatístico
- IC₅₀**- Concentração inibitória de 50%
- IV-** Infravermelho
- HaCat-** Queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes
- LD-** Limite de detecção
- L- Dopa** - 3,4- Dihydroxy-L-phenylalanine
- LQ-** Limite de quantificação
- MPAU-** Matéria-prima ácido ursólico
- MTT**- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
- O/A-** Óleo/água

OMS- Organização Mundial da Saúde
PBS- Phosphate Buffer Saline
PDAU- Padrão ácido ursólico
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SAm- Solução amostra
SPcb- Solução placebo
SPd- Solução padrão
TSA- Triptona de Soja
TSB- Tripticaseína Soja
UV-VIS- Ultravioleta visível

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas para que fosse possível seu desenvolvimento e conclusão. Assim, esta dedicatória vai para Deus, para toda minha família e amigos. Sem a amizade, tantos ensinamentos, carinho e força de vocês, eu não teria conseguido. Portanto, vocês são completamente merecedores desta dedicatória.

Muito obrigada por estarem ao meu lado e fazerem parte dessa curta, porém grandiosa experiência da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Doutor **Marcos Antonio Corrêa**, por ter confiado a mim o desenvolvimento de um de seus projetos e me aceitado como sua primeira orientanda de mestrado, por sempre ter me incentivado, se mostrado solícito e compreensivo, pela paciência, amizade e por ter me mostrado caminhos mais leves e tranquilos, tanto profissionais quanto pessoais, enfim por todos os enormes ensinamentos da pessoa grandiosa que é.

À colaboradora e amiga Ms. **Caroline Magnani Spagnol**, por sempre ter estado disposta a me auxiliar em todo o desenvolvimento deste trabalho de forma integral e dedicada, pela amizade nos momentos de alegria e nos momentos de dificuldades, pela paciência e compreensão.

À professora Dra. **Vera Lucia Borges Isaac**, ao professor Dr. **André Gonzaga dos Santos** e à professora Dra. **Hérída Regina Nunes Salgado** por todo o auxílio dado em partes importantes do desenvolvimento deste trabalho.

Aos **professores**: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Prof.^a Dra. Regina Cicarelli e Prof.^a Dra. Juliana Álvares Duarte Bonini Campos por compartilharem seus conhecimentos e equipamentos no decorrer deste trabalho.

Aos **amigos** que fiz na universidade durante todo o meu tempo de mestrado, e que sempre me auxiliaram de alguma forma, seja com conhecimento, troca de experiências, auxílio nos experimentos, conversas amigas nos momentos difíceis, e que além de tudo dividiram comigo os momentos de felicidade, conquistas e anseios: Bia Leone, Carol Kogawa, Dani Marcato, Alessandra Custódio, Gabi Prado, Gabi Almeida, Wagner, Isa Freitas, Ana Carolina, Ilza, Claudia, Jussara, Mari, Mateus, Caio, Vinícius, Fátima, Bia, entre outros.

À minha **família**, por ter me dado todo suporte, apoio e incentivo, mesmo sem entender meus desejos e objetivos, e em especial à minha mãe Célia e meu pai Sérgio, que sempre acreditaram e investiram parte de seus sonhos em mim, estiveram

ao meu lado e me deram toda e a melhor base e educação para que eu me tornasse quem sou hoje, motivo pelo o qual se tornou possível o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Agradeço imensamente à Deus por ter permitido vocês como minha família.

Ao meu **companheiro de vida**, Carlos, por toda dedicação, amor e carinho, paciência, os mais sábios conselhos, apoio incondicional em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis de ansiedade e angústia e nos momentos de felicidade e conquista, me mostrando todo o lado mais leve e mais simples das coisas. Sou eternamente grata a você por tudo e à Deus por ter colocado você em meu caminho. Sem você não teria sido possível chegar até aqui.

À **família que a vida me deu**, meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado tornando meus dias mais felizes e minha jornada mais leve, em especial aos amigos da *Casa de Fraternidade Chico Xavier* sempre presentes e dispostos a me trazerem a paz e a alegria que eu precisava para me manter firme do início ao fim, à minha sogra Neusa por todo o auxílio e apoio, e aos meus queridos amigos de longa data que sempre fizeram questão de tornar meu caminho mais alegre e divertido, além de me ensinarem a ser alguém melhor a cada dia.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que sempre se mostraram solícitos em ajudar no que fosse necessário.

À secretaria de pós-graduação, em especial *Cláudia, Aniele, Daniela e Christiane*.

Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da UNESP.

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido.

Fernanda Cardoso Colombo

*“Nascestes no lar que precisavas, vestistes o corpo
físico que merecias, moras onde melhor Deus te
proporcionou, de acordo com o teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as
tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o
justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste
espontaneamente para a tua realização.
Teus parentes, teus amigos são almas que
atraístes, com a tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente sob
teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas,
expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a
existência.
Teus pensamentos e vontades são a chave de teus
atos e atitudes.
São as fontes de atração e repulsão na tua
jornada e vivência.
Não reclames nem te faças de vítima.
Antes de tudo, analisa e observa.
A mudança está nas tuas mãos.
Reprograma a tua meta, busca o bem e viverás
melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um
novo começo, qualquer um pode começar agora e
fazer um novo fim”.*

Francisco Cândido Xavier

Fernanda Cardoso Colombo

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida começou a ganhar força em meados de 1950 e vem aumentando em todo o mundo, principalmente graças aos avanços na área da saúde. No entanto, para garantia da qualidade de vida, uma série de fatores deve ser levada em consideração, como o bem-estar físico, a boa saúde mental e a interação social do indivíduo. Para isso, é necessário considerar necessidades individuais, tais como autonomia, novos significados de vida e autoestima (KALACHE et al., 1987; CAMARANO et al., 2004; VERAS, 2009).

Assim, a fim de garantir um corpo saudável e autossatisfação, uma crescente preocupação com a saúde e com a estética corporal tem aumentado a demanda por produtos cosméticos capazes de prevenir o envelhecimento cutâneo e o aparecimento de patologias, uma vez que, com o aumento de idade, fatores genéticos e hormonais podem reduzir a atividade plena do sistema imunológico, causando inúmeras alterações no tecido cutâneo, podendo resultar em uma pele fina e ressecada, com manchas, rugas e possíveis carcinomas. Dentre estes produtos, tem recebido considerável atenção e interesse pelo mercado, seja por forte apelo de “marketing” ou não, os que possuem ativos de origem vegetal e que, de certa forma, reforçam a crescente preocupação atual com a sustentabilidade. Por esse motivo, a pesquisa de novos ativos para incorporação em produtos de administração tópica torna-se de grande relevância (RESENDE, 2013).

Além dos fatores intrínsecos do indivíduo, fatores externos como a radiação solar também podem acelerar o envelhecimento, ocasionando uma das mais pronunciadas alterações à pele, denominadas de fotoenvelhecimento, que ocorre principalmente pela ação dos raios UV, a partir da produção de espécies químicas altamente reativas e instáveis (formadas por um não-emparelhamento de elétrons), chamadas de radicais livres, que são capazes de ligar-se a diferentes classes de moléculas, como o DNA, promovendo assim danos a vários tipos celulares do organismo, inclusive os produtores de colágeno e elastina. Nesse contexto, os antioxidantes, que podem ser naturais, adquiridos na dieta, ou sintéticos, atuam combatendo essas espécies altamente reativas, auxiliando na prevenção de danos celulares (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006; MONTAGNER et al., 2009).

Outro composto importante na proteção da pele é a melanina, um pigmento produzido por células especializadas do corpo humano, os melanócitos, que confere fotoproteção contra danos causados pela radiação UV. Sua produção ocorre a partir de organelas específicas geradas pelo retículo endoplasmático dos melanócitos, os melanosomos, em cujo interior produz-se o pigmento. Tal produção é mediada pela tirosinase, uma enzima chave responsável por iniciar a cascata de processos na produção da melanina, uma vez que transforma tirosina em L-DOPA que dará continuidade ao restante da cascata. Porém, a produção exacerbada deste pigmento pode causar certos inconvenientes, como o aparecimento de manchas na pele (ANTELO et al., 2008; SPAGNOL, 2014).

Alguns ativos naturais ainda pouco explorados comercialmente, têm sido estudados por apresentarem potencial atividade preventiva contra danos causados ao tecido cutâneo, destacando-se as atividades antioxidante, despigmentante, antineoplásica e anti-inflamatória. O AU, um composto triterpenóide pentacíclico é um deles, e pode ser encontrado em uma grande variedade de espécies vegetais, muitas delas de origem brasileira que possuem grande importância na medicina fitoterápica. Além de todas as atividades anteriormente citadas, também é reportado ao AU atividade antimicrobiana, tornando-o um ativo multifuncional de grande interesse para incorporação em produtos de administração tópica, uma vez que pode contribuir para a prevenção de danos diversos causados à pele e atuar, ao mesmo tempo, como um conservante antimicrobiano (LIU, 1995; FRIGHETTO et al., 2005; SILVA et al., 2008; ELOY et al., 2012).

Os produtos cosméticos, segundo a RDC Nº 7 da ANVISA de 2015, podem ser classificados em produtos de grau 1 e grau 2, sendo considerados os produtos de grau 2 como “*produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (...) que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso*”, ou seja, produtos cosméticos que apresentam substâncias ativas em suas formulações, e, por esse motivo, seu desenvolvimento e produção requerem altos padrões de qualidade para garantir eficácia e segurança ao consumidor. De um modo geral, um dos aspectos inerentes à segurança do consumidor, diz respeito à presença de um adequado sistema conservante (incluindo conservantes antimicrobianos), já que as

matérias primas utilizadas podem oferecer um ambiente adequado à proliferação de microrganismos que podem prejudicar a qualidade do produto, podendo ser responsáveis por sua deterioração, baixa eficácia e possíveis danos à saúde do consumidor. A atividade antimicrobiana do AU foi avaliada em alguns estudos que comprovaram um potencial antimicótico e um amplo espectro contra bactérias, principalmente as gram-positivas, podendo dessa forma, sugerir estudos mais aprofundados do AU como um possível conservante antimicrobiano (AMARAL, 2010; BRASIL, 2015; JESUS et al., 2015).

A fim de avaliar a segurança de um novo ativo em estudo, também devem ser realizados ensaios de toxicidade. O potencial citotóxico de um composto pode ser traduzido como a capacidade de gerar apoptose em uma célula. No caso do AU consiste na indução da apoptose de células tumorais sem afetar as células normais, além de prevenir a transformação de células normais em cancerígenas. O mecanismo dessa citotoxicidade ainda não foi completamente esclarecido, mas sabe-se que pode estar relacionado com a habilidade do AU em inibir a replicação do DNA, à medida que inibe suas enzimas metabólicas (DALLA VECHIA et al., 2009; RESENDE, 2013).

Para a escolha da veiculação de ativos no desenvolvimento de novos produtos cosméticos grau 2, existem atualmente no mercado os mais variados tipos de cosméticos para a pele, sendo que as emulsões são uma das formas mais antigas e utilizadas graças às vantagens que possui, como facilidade de aplicação e preparo, possibilidade de utilização de categorias diversas de matérias-primas e obtenção de produtos de baixo custo. Estes sistemas emulsionados são definidos como sistemas dispersos formados pela junção de dois líquidos imiscíveis, em que um se apresenta como disperso e outro como dispersante e, devido às suas grandes vantagens citadas e a possibilidade de veiculação de compostos ativos em suas fórmulas, são amplamente escolhidas para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente aqueles com maior estabilidade (CORRÊA et al., 2012).

Uma questão importante no que diz respeito à garantia da qualidade de produtos é o emprego de técnicas analíticas qualitativas e quantitativas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados, e consiste em uma técnica de separação analítica que permite a realização de testes qualitativos e quantitativos de amostras de diversas naturezas. O desenvolvimento e

a validação de novas metodologias (para essa e outras técnicas) exigem diversas etapas, e uma delas é a escolha dos materiais a serem utilizados, mediante as condições adotadas. Como nos últimos tempos, as mudanças climáticas ocorridas têm gerado preocupação no mundo todo, uma mudança de postura e de pensamento neste quesito tem trazido alterações significantes, principalmente para a indústria. Assim, os conceitos de sustentabilidade e química verde vêm ganhando bastante força no desenvolvimento de novos produtos e novas metodologias analíticas, uma vez que esses conceitos incluem redução da emissão de poluentes para o meio ambiente, maior segurança ao operador e menor custo (RIBANI et al., 2004; ALVES et al., 2010; ÇELIK et al., 2017; HAO et al., 2017).

Ainda que o AU seja um composto natural e que apresente propriedades muito interessantes para incorporação em cosmético, é um ativo pouco explorado neste sentido no mercado e há poucos estudos que mostram a eficácia desse ácido incorporado a uma preparação com característica e apelo cosmético. Deste modo, este trabalho procurou avaliar a possibilidade da utilização do AU como um ativo cosmético multifuncional, explorando as possíveis atividades antioxidante, despigmentante e antimicrobiana. Além disso, propôs-se avaliar seu comportamento em relação à um dos quesitos de segurança, a partir do modelo de citotoxicidade *in vitro* realizado com cultura de células, e a avaliação de seu comportamento frente a incorporação em uma emulsão.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O controle de qualidade da MP avaliada forneceu dados que proporcionaram confiabilidade à amostra. Porém através do ensaio de solubilidade foi possível perceber a dificuldade de solubilização que o AU apresenta, principalmente em água, o que acaba limitando a escolha dos materiais a serem utilizados e dos ensaios a serem realizados. Sendo assim, torna-se necessário o estudo de mecanismos que facilitem a solubilização do AU;
- ✓ A avaliação da eficácia do AU com relação à atividade antioxidante, despigmentante e antimicrobiana foi comprovada através dos ensaios empregados, tendo o AU apresentado uma boa atividade frente a todos os testes, principalmente no antimicrobiano, em que demonstrou um forte potencial para inibição e morte celular, o que reforça a ideia de um ativo bastante interessante, com características multifuncionais para prevenção de alterações indesejadas na pele e como um possível agente antimicrobiano de formulações, a ser mais explorado na área cosmética;
- ✓ Apesar do AU exigir uma concentração mais alta que o AA para inibição de 50% dos compostos nos ensaios realizados para atividade antioxidante e despigmentante, ele apresenta a vantagem de possuir atividade antimicrobiana e diversas outras reportadas em literatura, como atividade anti-inflamatória e antineoplásica, o que o tornam um ativo multifuncional interessante para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos multifuncionais. Além disso, sua associação com outros ativos antioxidantes e despigmentantes poderia aumentar a potência dos mesmos;
- ✓ Em concentrações até 50 µg/mL o AU não demonstrou citotoxicidade, porém é necessário o desenvolvimento de mecanismos que melhorem sua solubilidade, a fim de que se possa aumentar a concentração para o teste até a obtenção da máxima concentração em que não se observa citotoxicidade;
- ✓ A metodologia desenvolvida e validada apresentou a vantagem de, além de empregar preceitos de química verde, utilizando solventes menos tóxicos em comparação com as metodologias encontradas em literatura, ter apresentado um tempo de retenção menor do que os encontrados em literatura;

- ✓ A emulsão preparada com AU revelou poucas diferenças nas características físico-químicas como aspecto, pH e viscosidade comparada com a emulsão preparada sem AU;
- ✓ O estudo de estabilidade preliminar da emulsão contendo AU demonstrou que as características de pH e viscosidade da emulsão se mantêm estáveis quando submetida a condições extremas. Porém o teor de AU é alterado, sofrendo decaimento, principalmente em temperaturas elevadas, indicando que alguns cuidados devem ser tomados quanto a temperatura de armazenamento de um produto acabado.

7. REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.4168-4170, 2001.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORREA, M.A.; MAN CHIN, C.; ISAAC, V.L.B. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 32, p. 90-95, 2013.

ALMEIDA, J.R.G.S.; ARAÚJO, C.S.; PESSOA, C.; COSTA, M.P.; PACHECO, A.G.M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Rev. Bras. Frutic.**, v.36, p.258-264, 2014.

ALVARADO, H.L.; ABREGO, G.; SOUTO, E.B.; GARDUÑO- RAMIREZ, M.L.; CLARES, B.; GARCIA, M.L.; CALPENA, A.C. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo an in vivo characterization. **Colloi Surf B: Biointerfaces**, v.130, p.40-47, 2015.

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; NETO, P.J.R.; SOARES, M.F.L.R.; SOBRINHO, J.L.S. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-VIS. **Quim. Nova**, v.33, n.9, p.1967-1972, 2010.

AMARAL, L.F.B. **Avaliação da eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 xilitol como alternativa conservante para produtos cosméticos**. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

ANCHISI, C.; MACCIONI, A.M.; SINICO, C.; VALENTI, D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. **II Farmaco**, v.56, p.427-431, 2001.

ANTELO, D.P.; FIGUEIRA, A.L.; CUNHA, J.M.T. Aspectos imunológicos do vitiligo. **Med. Cutan. Iber. Latin. Am**, v.36, n.3, p.125-136, 2008.

ANTIENÈ, D.; LEKAVICIENE, R. Psychological and physical well-being of Lithuanian youth: Relation to emotional intelligence. **Medicina**, n.53, p.277-284, 2017.

ANTONIO, E.; JUNIOR, O.R.A.; ARAUJO, I.S.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. Poly (lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and *in vitro* evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. **Materials Sci. Eng. C**, n.71, p.156-166, 2017.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 16, n.4, p. 517-524, 2006.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**- Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012.

BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n 1, p.113-123, 2006.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BERGAMIN, L.S.; FIGUEIRÓ, F.; DIETRICH, F.; MANICA, F.M.; FILIPPI-CHIELA, E.C.; MENDES, F.B.; et al. Interference of ursolic acid treatment with glioma growth: an *in vitro* and *in vivo* study. **Eur Jour Pharmacology**, v. 811, p.268-75, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RES n. 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 set.1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada. RDC n.17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 abr., 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC n.7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 fev., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC n.166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BUENO, C.; VILLEGAS, M.L.; BERTOLOTI, S.G.; PREVITALI, C.M.; NEUMANN, M.G.; ENCINAS, M.V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. *Photophysics and photochemical reaction. Photochem Photobiol*, v.76, n.4, p.385-390, 2002.

CAMARANO, A.A.; PASINATO, M.T. O envelhecimento populacional na agenda das políticas públicas. **Os novos idosos brasileiros: muito além dos 60?**. Capítulo 8, p.253, 2004.

ÇELIK, D.; YILDIZ, M. Investigation of hydrogen production methods in accordance with green chemistry principles. **Int. J. Hydrogen Energy**, n.42, p.23395- 23401, 2017.

CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; PAULI-CREDENDIO, P. A.; SYLOS, C. M.; VILEGAS, W.; CORREA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **JPPS**. v. 4, p. 331-336, 2012.

CHIARI, B.G.; TROVATTI, E.; PECORARO, E.; CORREA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; RIBEIRO, S.J.L.; ISSAC, V.L.B. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for healthcare application. **Ind. Crops Prod.**, v.52, p.389-393, 2014.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6^a ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Information Supplement. Document M2-A9 Disk Diffusion, v.26, n.3, 2006b.

CORRÊA, M.A.; KUREBAYASHI, A.K.; ISAAC, V.L.B. **Cosmetologia** Ciência e Técnica. São Paulo: Livraria e editora MEDFARMA, 2012.

COSTA, A.; CORDERO, T.; MARMIRORI, J.; MOISES, T.A.; ALVES, C.R.T. Associação de emblica, licorice e belides como alternativa à hidroquinona no tratamento clínico de melasma. **An Bras Dermatol.**v.85, n.5, p.613-620, 2010.

DALLA VECHIA. L.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim. Nova**, v. 32, n 5, p.1245-1252, 2009.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim Nova**, v.30, n.1, p.99-105, 2007.

DUARTE, A.F.S.; HIROTA, B.C.K.; DE OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS, R.; MURAKAMI, F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl. (Rubiaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.35, n. 4, p. 607-614, 2014.

ELOY, J.O.; OLIVEIRA, E.C.V.; OLIVEIRA, S.S.A.M.; SARAIVAI, J.; MARCHETTI, J.M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para

quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Quim. Nova**, v.35, n.5, p.1036-1040, 2012.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, n.37, p. 277-285, 2004.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERRAZ, M.S.F.C. O conceito de saúde. **Rev. Saúde Pública**, v.31, n.5, p.538-42, 1997.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n1, 1997.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, MTJ. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/ água: avaliação da estabilidade física. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n.3, p.263-271, 2009.

FRANZOL, A.; REZENDE, M.C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionante aniônico, catiônico e não- iônico. **Polímeros**, n.25, p.1-9, 2015

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R.M., SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra- corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev. Bras. Farmacogn.**, n.15(4), p.338, 2005.

GONCHOROSKI, D.D.; CORREA, G.M. Tratamento de hiperemia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**.v.17, n.3/4, p.84-88, 2005.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**.v.355, n.9210, p.1179-80, 2000.

HAMERMESH, D.S.; ABREVAYA, J. Beauty is the promise of happiness? **Eur. Eco. Review**, n.64, p.351-368, 2013.

HAO, Q.; TIAN, J.; LI, X.; CHEN, L. Using a hybrid of green chemistry and industrial ecology to make chemical production greener. **Resources, Conservation and Recycling**, n.122, p.106-113, 2017.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm Bonaer**. v. 23, n.3, p.418-24, 2004.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. Q2(R1). **Validation of Analytical Procedures: text and methodology**, 2005.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico- químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev.Ciênc.Farm.Básica Apl.**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JESUS, J.A.; LAGO, J.H.G.; LAURENTI, M.D.; YAMAMOTO, E.S.; PASSERO, L.F.D. Antimicrobial activity of oleanic and ursolic acids: an update. **Evidence-Based Comp.and Alt.Medicine**. v.2015, p.14, 2015.

JUNGINGER, H. I. Multiphase emulsions. In: RIEGER, M. M.; RHEIN, L. D. (Ed.). **Surfactants in cosmetics**. New York: Marcel Dekker, 1997. cap.7, p.155-182.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KALACHE, A.; VERAS, R.P.; RAMOS, L.R. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. **Rev.Saúde Publ**. v.21, n. 3, p.200-10, 1987.

KHAZAELI, P.; GOLDOOZIAN, R.; SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **Int. J. Cosm. Sci**. v.31, p.375-381, 2009.

KOZAI, K.; MIYAKE, Y.; KOHDA, H.; KAMETAKA, S.; YAMASAKI, K.; SUGINAKA, H.; NAGASAKA, N. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic and ursolic acid. **Caries Res**, v.21, n.2, p.104-108, 1987.

KUMAR, R.; PHILIP, A. Modified Transdermal Technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. **Trop. J. Pharm. Res**.v.6, n.1, p.633-44, 2007.

LABORATÓRIO DE PESQUISA MULTIUSUÁRIOS. **Imagens e informações do laboratório multiusuários.** Disponível em: < <http://www2.fcfar.unesp.br/#!/laboratorios-multiusuarios/laboratorios/>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

LABORATÓRIO I MULTIUSUÁRIOS DE ANÁLISES QUÍMICAS. **Imagens e informações do equipamento (3) Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com RAMAN acoplado- FT- RAMAN/ FTIR.** Disponível em: < <http://www.iq.unesp.br/#!/laboratorios-multiusuarios/lab-multiusuario-de-analises-quimicas---nova/laboratorio-i/>>. Acesso em: 18 out. 2017.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, 49, p.57-58, 1995.

LIPOWSKA, M.; LIPOWSKI, M.; OLSZEWSKI, H.; DYKALSKA- BIECK, D. Gender differences in body- esteem among seniors: Beauty and health considerations. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.67, p.160- 170, 2016.

MAGALHAES, W.S.; CORREA, C.M.; ALENCASTRO, R.B.; NAGEM, T.J. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. **Quim Nova**.v.35, n.2, p.241- 8, 2012.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Ciênc.Farm.**, v.38,n.1, 2002.

MCCOLL-KENNEDY, J.R.; DANAHER, T.S.; GALLAN, A.S.; ORSINGHER, C.; LERVIK-OLSEN, L.; VERMA, R. How do you feel today? Managing patient emotions during health care experiences to enhance well- being. **Journal of Business Research**, v.79, p.247-259, 2017.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.** v.15, p.127–130, 2001.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.** v.26, n.2. p.211-219, 2004.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases Biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An.Bras. Dermatol.** v.84, n.3, p.263-9, 2009.

MORAIS, S.M.; JUNIOR, F.E.A.C.; SILVA, A.R.A.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste brasileiro. **Quim Nova**, v.29, n.5, p.907-910, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55-63, 1983.

NICOLETTI, M.A.; ORSINE, E.M.A.; DUARTE, A.C.N.; BUONO, G.A. Hiper Cromias: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**.v.14, p.46-51, 2002.

OLIVEIRA, E.C.V.; CARNEIRO, Z.A.; ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J.M. Development and evaluation of a nanoemulsion containing ursolic acid: a promising trypanocidal agent. **Pharm Sci Tech**.v.18, n. 7, p.2551-60, 2017.

OLOYEDE, H.O.B.; AJIBOYE, H.O.; SALAWU, M.O.; AJIBOYE, T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic and ursolic acid. **Microbial Pathogenesis**.v.111, p.338-44, 2017.

O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 13th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck, 2001. p.1761-1762.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17, n.1, p.102-107, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method

for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; DE MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação de estabilidade física. **Rev. Bras. Ciênc.Farm.**, v.44, n.2, p.249-259, 2008.

PORTAL MEC. Livro 092- arquivos. Disponível em: <<http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/livro092.pdf>>. Acesso em 27 out. 2017.

PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Quim Nova**, v.26, n.5, p.738-744, 2003.

PROTA, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. **J. Inv. Derm.**, v.75, p.122-127, 1980.

RESENDE, E.C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico: investigação da atividade citotóxica, antioxidante, antidegradação da matriz celular, toxicidade e permeação cutânea ex vivo e in vivo. 2013. F. 23-24. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal de Goiás.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, M.O.; GOMES, M.S.; SENNA, S.G.; ROSSETTI, M.L.R.; FONSECA, L.S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **J. Bras Pneumologia**, v. 30, n.4, p.455-460, 2004.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de toxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Res.**, v.6, n. 3, p.317-320, 2003.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; DA SILVA, L.P.; MANFRON, M.P.; CERON, C.S.; ALVES, S.H.; KARKOW, A.K.; SANTOS, J.P.A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Cienc. Rural**, v.39, n.3, p.941-944, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th.ed. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association, 2009.

SÁ JUNIOR, L.S.M. Desconstruindo a definição de saúde. **Jornal do Conselho Federal de Medicina**, p.15-16, jul/ago/set,2004.

SANFELICE, A. M.; TRUITI, M. C. T. Produtos em filme – Inovação na tecnologia de cosméticos. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2010.

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Rev Bras Cien Farmacêuticas**.v. 43, n.2, p. 195-203, 2007.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; BELLA CRUZ, A.B.; SCHMIT, A.P.; BELLA CRUZ, R.C.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição Química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Quim. Nova**, v.35, n.3, p.477-481, 2012.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I.C.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.43, n.2. p. 153-166, 2007.

SILVA, F.M.; LACERDA, P.S.B.; JUNIOR, J.J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Quim Nova**, v.28, n.1, p.103-110, 2005.

SILVA, M.G.V; VIEIRA, I.G.P, MENDES, F.N.P; ALBUQUERQUE, R.N.S; SILVA, F.O; MORAIS, S.M. Variation of Ursolic Acid Content in Eight Ocimum Species from Northeastern Brazil. **Molecules**, n.13, p.2482- 2487, 2008.

SILVA, H.S.; LIMA, A.M.M.; GALHARDONI, R. Successful aging and health vulnerability: approaches and perspectives. **Interface- Comunic., Saude, Educ.**, v.14, n.35, p.867-77, 2010.

SINGH, S.; LOHANI, A.; MISHRA, A.K.; VERMA, A. Formulation and evaluation of carrot seed oil- based cosmetic emulsions. **J. Cosmet. Laser Ther.**, v.20, p.1-9, 2018.

SOMOVA, L.O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**.v.10, p.115-21, 2003.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti- séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, n.1, p.71-75, 2007.

SPAGNOL, C.M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP Araraquara, 2014.

SPAGNOL, C.M.; FERREIRA, G.A.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Ascorbic acid in cosmetic formulations: stability, in vitro release, and permeation using a rapid, inexpensive, and simple method. **J. Disper. Sci. Technol.**, v. 38, n. 6., p. 901-908, 2017.

TARALKAR, S.V.; CHATTOPADHYAY, S. A HPLC method for determination of ursolic acid and betulinic acids from their methanolic extracts of vitex negundo linn. **J Anal Bioanal Techniques**, v. 3, n.3, 2012.

TOBIN, D.J. Introduction to skin aging. **J Tissue Viability**.n.26, n.1, p.37-46, 2017.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n.3, p.548-54, 2009.

USP. United States Pharmacopeia Convention. Chromatography- Physical tests. **U.S. Pharmacopeia National Formulary**, USP 40 NF 35, <621>, 2017.

VIEIRA, L.M.; CASTRO, C.F.S.; DIAS, A.L.B.; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. (Anacardiaceae). **Rev Bras PI Med**.v.7, n.4, p.521-527, 2015.

VUJCIC, M.; TOMICEVIC-DUBLJEVIC, J.; GRBIC, M.; LECIC-TOSEVSKI, D.; VUKOVIC, O.; TOSKOVIC, O. Nature based solution for improving mental health and well-being in urban areas. **Environmental Research**, n.158, p.385-392, 2017.

XU, X.H.; SU, Q.; ZANG, Z.H. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lidl. **J Pharma Analysis**, v.2, n.3, p.238-40, 2012.

ZHANG, Y.; WU, L.; TASHIRO, S.; ONODERA, S.; IKEJIMA, T. Evadamine induces tumor cell death through different pathways: apoptosis and necrosis. **Acta Pharm.**, v.25, p. 83-89, 2004.

ZHOU, C.; CHEN, K.; SUN, C.; CHEN, Q.; ZHANG, W. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl.by HPLC. **Biomed Chromatogr**, v.21, n.7, p.755-761, 2007.