



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Micropartículas poliméricas biodegradáveis
contendo ácido cafeico para aplicação tópica**

Caroline Magnani Spagnol

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Hérica Regina Nunes Salgado

Araraquara- SP

2018



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



Micropartículas poliméricas biodegradáveis contendo ácido cafeico para aplicação tópica

Caroline Magnani Spagnol

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Hérica Regina Nunes Salgado

Araraquara- SP

2018

Ficha Catalográfica

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

S735m Spagnol, Caroline Magnani
Micropartículas poliméricas biodegradáveis contendo ácido cafeico para
aplicação tópica / Caroline Magnani Spagnol. – Araraquara, 2018.
198 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.
Coorientadora: Hérica Regina Nunes Salgado.

1. Ácido cafeico. 2. Micropartículas. 3. Emulsão. 4. Filme. 5. Permeação
Cutânea. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Salgado, Hérica Regina Nunes,
coorient. III. Título.

CAPES: 40300005



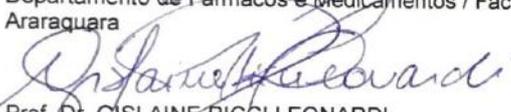
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS BIODEGRADÁVEIS CONTENDO ÁCIDO
CAFEICO PARA APLICAÇÃO TÓPICA

AUTORA: CAROLINE MAGNANI SPAGNOL
ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA
COORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA
COORIENTADORA: HERIDA REGINA NUNES SALGADO

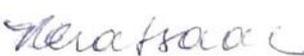
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão
Examinadora:


Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de
Araraquara


Prof. Dr. GISLAINE RICCI LEONARDI
Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNICAMP


Prof. Dr. ANDRÉ ROLIM BABY
Departamento de Farmácia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP-São Paulo


Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de
Araraquara


Profa. Dra. VERA LUCIA BORGES ISAAC
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP-Câmpus de
Araraquara

Araraquara, 26 de julho de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que coloca as pessoas certas em meu caminho, por ser meu porto seguro e estar presente em todos os momentos da minha vida auxiliando no meu crescimento pessoal, profissional e espiritual.

Dedico também a meus pais, pois sempre estiveram prontos a me apoiar e me aconselhar quando necessário, não medindo esforços para que eu pudesse tornar-me quem eu sou e atingir meus objetivos oferecendo-me carinho, força, consolo, sendo exemplos para minha vida e meu porto seguro.

Ao meu marido, Heitor, que enfrentou ao meu lado os momentos mais difíceis, por todo carinho e paciência nos períodos que estive ausente. Eu te amo muito.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. **Marcos Antonio Corrêa**, por ter me orientado durante todo período, desde estágios durante a graduação, pelos ensinamentos e pela amizade.

À minha coorientadora, Prof^a. Dr^a. **Hérída Regina Nunes Salgado**, por ter lido e corrigido incansavelmente todos os meus trabalhos. Por estar sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida, pela confiança, compreensão, incentivo e colaboração. Posso considerar-me abençoada por ter esses dois como verdadeiros pais científicos.

À Prof^a. Dr^a. **Ana Melero Zaera** da Universidade de Valência por ter me recebido tão bem para a realização do Doutorado Sanduíche. Que, além de uma grande pesquisadora e professora, se tornou uma grande amiga.

À Prof^a. Dr^a. **Vera Lucia Borges Isaac**, pela amizade e parceria.

Agradecemos ao GFQM-IQ pelas medidas de Difração de Raios X. Aos professores da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”: Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, Prof^a. Dr^a. Marisa Spirandeli Crespi, por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos e ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro, do Instituto de Química da UNESP-Araraquara pela disponibilização do seu laboratório para que fossem realizadas as análises DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) e TG (Termogravimetria), e por disponibilizar seu tempo para discussão dos resultados. Obrigada pela sua contribuição. Ao Jovan Duran, por toda ajuda na execução das análises, disposição e atenção.

A toda minha **família**, em especial minhas tias que sempre estiveram presentes me auxiliando em todos os momentos.

Aos meus **colegas** de laboratório, com os quais compartilhei conhecimentos, alegrias, conquistas, frustrações, tristezas, anseios que a pesquisa nos proporciona. Do time Lacos: Alessandra, Amanda, Ana Carolina, Beatriz, Dani, Fernanda, Isa, Leo, Lia, Wagner e Ilza querida. A Ana Carolina, Bruna, Daniele, Gabi Romão, pela ajuda e companheirismo, mesmo não

estando mais presentes no laboratório. Da família Controle: Bia, Carol Kogawa, Danilo, Eliane, Mariana, Rubia, Tahisa, Felipe e Fátima. Aos meus **amigos**, da dança, do pedal e da vida que sempre estiveram ao meu lado tornando meus dias mais felizes e minha jornada mais leve.

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*. Aos funcionários da **biblioteca** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, sempre dispostos a ajudar.

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

À **Shimadzu do Brasil**, pela doação da balança ao nosso laboratório, à **Allcrom** pela doação de colunas cromatográficas.

À **Fapesp** (Fundação de Amparo à Pesquisa) pelo apoio financeiro concedido, Fapesp (2015/02619-3) e BEPE Fapesp (2016/06742-7).

Muitas vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas.

Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta, interesseiro.

Seja gentil, assim mesmo.

Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.

Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo.

Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para outra.

Construa assim mesmo.

Se você tem Paz e é Feliz, as pessoas podem sentir inveja.

Seja Feliz assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante.

Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja que, no final das contas, é entre você e DEUS.

Nunca foi entre você e as outras pessoas.

(Kent M. Keith/ Madre Tereza)

RESUMO

Os compostos fenólicos ocorrem de maneira universal no reino vegetal, sendo os ácidos cinâmicos integrantes desse grupo de compostos orgânicos. O ácido cafeico (AC) é um representante, com potente ação antioxidante, prevenindo o envelhecimento precoce da pele. As clássicas emulsões são muito utilizadas pelo consumidor pelo sensorial agradável e refrescante que proporcionam; no entanto, preparações desenvolvidas na forma de filme ou película seca apresentam-se como uma alternativa tecnológica pela sua facilidade e segurança no transporte. Para vencer a barreira cutânea, sistemas micro e nanoestruturados têm sido desenvolvidos, a fim de facilitar a entrega de ativos disponibilizando-os ao tecido por um período de tempo prolongado, sem causar danos ou toxicidade. O objetivo deste trabalho foi a avaliação exploratória das atividades antioxidante e antimicrobiana do AC a fim de utilizá-lo como um ativo multifuncional veiculado em micropartículas (MP) de quitosana. Assim, foi determinada a atividade antioxidante e antimicrobiana do ácido cafeico. Em seguida, dois tipos de micropartículas de quitosana contendo AC foram obtidas por *spray drying*. As oriundas de solução hidroalcoólica, denominadas MPI, e as oriundas de solução aquosa, denominadas MP II. As MPs foram caracterizadas físico-quimicamente e incorporadas em uma emulsão e uma preparação cosmética em filme. Por fim foi avaliado o perfil de liberação, permeação *in vitro* das micropartículas de AC a partir da emulsão e do filme. Os valores de atividade antioxidante do ácido cafeico foram muito próximos dos padrões em todos os testes. Além disso, o AC apresentou atividade antioxidante maior que o ácido ascórbico e trolox, e tem a vantagem de ser mais estável que o ácido ascórbico e ser extraído de fontes naturais quando comparado ao trolox. O *screening* realizado revelou que o ácido cafeico apresenta atividade antimicrobiana frente à *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. acnes* com concentrações variando de 375 a 1500 µg/mL, sendo um composto promissor pela sua multifuncionalidade, além de atender à crescente demanda por substâncias que substituam ou reduzam as concentrações de antimicrobianos clássicos. O desenvolvimento da emulsão e da preparação cosmética em filme propiciou a obtenção de formulações compatíveis com as micropartículas e com aspecto sensorial e características físico químicas as mais adequadas possíveis. Os resultados mostraram que o *spray drying* é um método eficiente para obtenção de MP de quitosana contendo AC, produzindo microestruturas de 1 a 5 µm de diâmetro. As MP II oriundas de solução aquosa demonstraram-se esféricas e com superfície lisa, ideal para liberação controlada, já as oriundas de solução hidroalcoólica (MPI) apresentaram-se porosas e com material residual não internalizado. Esse resultado foi condizente com o perfil de liberação e permeação já que as MP II apresentaram liberação e permeação mais lenta e controlada que as MPI. Os resultados mostraram-se promissores em relação a proposta de desenvolvimento de formulações contendo AC como um ativo multifuncional veiculado em micropartículas (MP) de quitosana destinadas a aplicação facial.

Palavras-chave: Ácido cafeico; Micropartículas; Emulsão; Filme; Permeação Cutânea.

ABSTRACT

Phenolic compounds occur universally in the plant kingdom, with cinnamic acids being part of this group of organic compounds. Caffeic acid (CA) is one representative, with potent antioxidant action, preventing the premature aging of the skin. The classic emulsions are widely used by the consumer for the pleasant and refreshing sensory they provide, however, preparations developed in the form of dry film present themselves as a technological alternative for their ease and safety in transportation. To overcome the cutaneous barrier, micro and nanostructured systems have been developed to facilitate the delivery of substances by making them available to the tissue for an extended period of time, without causing damage or toxicity. The objective of this work was the exploratory evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of CA in order to use it as a multifunctional active carried in microparticles (MP) of chitosan. Thus, the chitosan microparticles containing CA were obtained by spray drying and physico-chemically characterized, and then they were incorporated into an emulsion and a cosmetic preparation on film. The antimicrobial and antioxidant activity of caffeic acid was determined and the profile of the release, permeation and *in vitro* retention of the microparticles of CA from the emulsion and the film were evaluated. The antioxidant activity values of CA were similar to the standards in all tests. In addition, CA showed higher antioxidant activity than ascorbic acid and trolox, and has the advantage of being more stable than ascorbic acid and extracted from natural sources when compared to trolox. The present study showed that caffeic acid has antimicrobial activity against *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *P. acnes* with concentrations varying from 375 to 1500 µg/ mL, being a promising compound for its multifunctionality. In addition to meeting the growing demand for substances that replace or reduce the concentrations of classical antimicrobials. The development of the emulsion and cosmetic preparation on film has shown that this is a crucial step in the execution of a project, since choosing the raw materials in a non-judgmental manner can compromise the entire planning of the research. Thus, it was possible to obtain formulations compatible with the microparticles under study and that had the most suitable sensorial aspect and physicochemical characteristics. The results showed that spray drying is an efficient method to obtain MP of chitosan containing CA, producing microstructures of 1 to 5 µm in diameter. The MPII originated from aqueous solution proved to be spherical and with smooth surface, suitable for controlled release, whereas those from hydroalcoholic solution (MPI) had become porous with waste material not internalized. This result was consistent with the release and permeation profile since the MPII showed slower and more controlled release and permeation than those obtained from MPI. The results were promising in relation to the development of formulations containing AC as a multifunctional active in microparticles (MP) of chitosan for facial application.

Key words: Caffeic acid, Microparticles, Emulsion, Film, Skin Permeation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele e anexos.....	26
Figura 2. Camadas da epiderme.	27
Figura 3. Esquema das diferentes camadas da pele, rotas de administração e exemplos de tratamentos para fins locais ou sistêmicos.	31
Figura 4. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose.	35
Figura 5. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico: $R_1=R_2=R_3=R_4=H$; ácido <i>o</i> -cumárico: $R_2=OH$; ácido <i>p</i> -cumárico: $R_3=OH$; ácido cafeico: $R_2=R_3=OH$; ácido ferúlico: $R_2=OCH_3$ e $R_3=OH$	36
Figura 6. Estrutura química do ácido cafeico e da <i>orto</i> -quinona.	38
Figura 7. Estrutura química dos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.	49
Figura 8. Esquema da placa utilizado no ensaio de atividade antioxidante pelo método de sequestro de ânions superóxido.	52
Figura 9. Esquema do preparo das micropelículas.	57
Figura 10. Fluxograma representativo da obtenção da MPI e MP2.	59
Figura 11. Mini <i>spray dryer</i> Buchi-191 e o esquema do processo de obtenção das micropelículas. Solução atomizada (1); bomba peristáltica (2); aspersor, formação das microgotas (3); câmara de secagem (4); saída de ar (5); ciclone (6); coletor (7) e aspirador (8).	60
Figura 12. Preparação das micropelículas para Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução.	61
Figura 13. Exemplos de arranjo atômico cristalino.....	129
Figura 14. Esquema representativo da reação entre o radical DPPH [•] e antioxidantes.	74
Figura 15. Perfil de captura do radical DPPH [•] pelo trolox.	75
Figura 16. Perfil de captura do radical DPPH [•] pelo ácido gálico.	76
Figura 17. Perfil de captura do radical DPPH [•] pelo ácido ascórbico.	76
Figura 18. Perfil de captura do radical DPPH [•] pelo ácido cafeico.	77
Figura 19. Esquema representativo da reação entre o radical ABTS ^{•+} e antioxidantes.	80

Figura 20. Tubos reacionais para obtenção da curva analítica da capacidade de captura sobre o ABTS ^{•+} do AC em concentração de 0 a 2,97µg.mL ⁻¹ .	80
Figura 21. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo trolox.	81
Figura 22. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo ácido gálico.	81
Figura 23. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo ácido ascórbico.	82
Figura 24. Perfil de captura do ABTS ^{•+} pelo ácido cafeico.	82
Figura 25. Estrutura química do DPPH [•] e do ABTS ^{•+} .	83
Figura 26. Representação esquemática da reação na qual o antioxidante atua como a SOD.	85
Figura 27. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo trolox (SOD-like activity).	86
Figura 28. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido gálico (SOD-like activity).	86
Figura 29. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido ascórbico (SOD-like activity).	87
Figura 30. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido cafeico (SOD-like activity).	87
Figura 31. Representação esquemática da formação do O ₂ ^{•-} <i>in vitro</i> e a reação com NBT na ausência (A) e presença de antioxidantes (B).	89
Figura 32. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo trolox.	90
Figura 33. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido gálico.	90
Figura 34. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido ascórbico.	91
Figura 35. Perfil de captura do O ₂ ^{•-} pelo ácido cafeico.	91
Figura 36. Representação da estrutura da crocina	93
Figura 37. Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH (adaptado de ASSIS et al., 2015); A, representa um antioxidante (amostra).	94
Figura 38. Esquema representativo da reação do radical peroxila com a substância antioxidante.	94
Figura 39. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox. v ₀ , velocidade na ausência de Trolox; v, velocidade na presença de Trolox.	95
Figura 40. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ácido gálico. v ₀ , velocidade na ausência de ácido gálico; v, velocidade na presença de ácido gálico.	96
Figura 41. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ácido ascórbico.	

v_0 , velocidade na ausência de ácido ascórbico; v , velocidade na presença de ácido ascórbico.	96
Figura 42. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AC. v_0 , velocidade em ausência de AC; v , velocidade na presença de AC.	97
Figura 43. Representação esquemática da reação de oxidação do TMB e da captura de HOCl/OCl ⁻ por um antioxidante.	100
Figura 44. Perfil de captura do HOCl/OCl ⁻ pelo trolox.	100
Figura 45. Perfil de captura do HOCl/OCl ⁻ pelo ácido gálico.	101
Figura 46. Perfil de captura do HOCl/OCl ⁻ ácido ascórbico.	101
Figura 47. Perfil de captura do HOCl/OCl ⁻ pelo AC.	102
Figura 48. Representação esquemática da reação entre H ₂ O ₂ e TNB e da captura do H ₂ O ₂ por substâncias antioxidantes.	104
Figura 49. Perfil de Captura (CE ₅₀ µmol/L) do H ₂ O ₂ pelo ácido ascórbico.	105
Figura 50. Perfil de Captura do H ₂ O ₂ (CE ₅₀ µmol/L) pela catalase.	105
Figura 51. Reação de redução da resazurina.	109
Figura 52. Teste da Concentração Inibitória Mínima e teste da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo em placas de ágar do AC frente ao <i>S. aureus</i> (a, b); <i>S. epidermidis</i> (c, d); <i>E. coli</i> (e, f); <i>P. aeruginosa</i> (g, h).	111
Figura 53. Teste da Concentração Inibitória Mínima do AC frente à <i>P. acnes</i>	112
Figura 54. Obtenção de micropartículas por <i>spray drying</i>	115
Figura 55. Fotomicrografias das MPI (aumentos: 10.000x, 18.000x, 20.000x e 25.000x).	117
Figura 56. Fotomicrografias das MP II (aumentos: 2.000x, 2.000x, 20.000x e 25.000x).	117
Figura 57. Espectro de absorção na região infravermelho de ácido cafeico.	119
Figura 58. Espectro de absorção na região infravermelho de quitosana.	120
Figura 59. Espectro de absorção na região infravermelho de estearilamina.	121
Figura 60. Estrutura molecular da estearilamina.	122
Figura 61. Espectro de absorção na região infravermelho do Polysorbate 80.	123
Figura 62. Estrutura molecular do Polysorbate 80.	124
Figura 63. Espectro de infravermelho da mistura física I.	124

Figura 64. Espectro de infravermelho da MPI.	125
Figura 65. Espectro de infravermelho da mistura física II (quitosana + AC). .	126
Figura 66. Espectro de infravermelho da MP II	127
Figura 67. Difrátograma da quitosana.	130
Figura 68. Difrátograma da estearilamina.	130
Figura 69. Difrátograma ácido cafeico.....	131
Figura 70. Difrátograma da mistura física I.	131
Figura 71. Difrátograma da mistura física II.	132
Figura 72. Difrátograma das MPI.	132
Figura 73. Difrátograma das MPII.	133
Figura 74. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da quitosana.	135
Figura 75. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da estearilamina.....	136
Figura 76. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) do ácido cafeico.	136
Figura 77. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da mistura física I.....	137
Figura 78. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da Mistura física II.....	138
Figura 79. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) das MPI.....	139
Figura 80. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da MPII.....	140
Figura 81. Curvas DSC de todas as substâncias estudadas. MP2: Micropartículas 2; MPI: Micropartículas I; Mistura física 2; Mistura física 1; Ácido cafeico; Estearilamina; Quitosana.....	141
Figura 82. Curvas de DSC modulado da MPI mostrando os eventos reversíveis e irreversíveis.....	142
Figura 83. Curvas de DSC modulado da MPII mostrando os eventos reversíveis e irreversíveis.....	143
Figura 84. Curvas de TG/DTG da MP2: micropartícula 2, MP1: micropartícula 1; mistura física 2; mistura física 1.....	144
Figura 85. Curvas de TG/DTG da quitosana, estearilamina e ácido cafeico.	145
Figura 86. Perfil de distribuição de tamanho das MPI (a) e MPII (b).....	147
Figura 87. Fórmula estrutural da quitosana e do poliacrilato de sódio.....	151
Figura 88. Formação de agregados entre as cargas opostas do poliacrilato de sódio (carga negativa) e da quitosana (carga positiva).	151
Figura 89. Teste piloto de liberação das formulações E14 e E17.	154
Figura 90. Emulsão E17 base e emulsão E17 com AC.	154
Figura 91. Formulação em filme F6.....	156

Figura 92. Estabilidade do ácido cafeico em três diferentes tipos de soluções receptoras, tampão pH 5,5 + etanol (50:50); tampão pH 7,4 + etanol (50:50); água + etanol (50:50) ao longo de 336 h.....	157
Figura 93. Perfil de liberação do AC a partir das dispersões de MPI e MP11 ao longo de 104 h (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	158
Figura 94. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir da dispersão de MPI nas primeiras 10 h. cm ²	159
Figura 95. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir da dispersão de MPI (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	160
Figura 96. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir da dispersão de MP11 (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	161
Figura 97. Perfil de liberação do AC a partir dos filmes de MPI e MP11 por 104 h (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).	162
Figura 98. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir do filme de MPI nas primeiras 10 h.	163
Figura 99. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir do filme de MPI (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	164
Figura 100. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir do filme de MP11 (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	164
Figura 101. Perfil de liberação do AC a partir das emulsões de MPI e MP11 ao longo de 104 h (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	165
Figura 102. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir das emulsões de MPI nas primeiras 10 h.	165
Figura 103. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir das emulsões de MPI (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento <i>t</i> e tempo infinito respectivamente).....	166

Figura 104. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir das emulsões de MP11 (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).....	166
Figura 105. Porcentagem de liberação das formulações contendo AC.	167
Figura 106. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir de diferentes controles AC: solução controle de ácido cafeico; AC + Q: solução controle de ácido cafeico e quitosana; AC+Q+T: solução controle de ácido cafeico, quitosana e polissorbato 80.	170
Figura 107. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir da MPI e da MP11.	171
Figura 108. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir do filme com MPI e do filme com MP11.	171
Figura 109. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir da emulsão com MPI e da emulsão com MP11.	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos reagentes para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS ^{•+}	51
Tabela 2. Composição percentual e função dos componentes das emulsões inicialmente propostas.	65
Tabela 3. Composição percentual e função dos componentes das emulsões propostas na segunda etapa do desenvolvimento.....	65
Tabela 4. Composição percentual das emulsões propostas na terceira etapa do desenvolvimento.	66
Tabela 5. Composição percentual das emulsões propostas e função dos componentes na quarta etapa do desenvolvimento.	66
Tabela 6. Composição percentual da emulsão escolhida para prosseguimento dos testes.....	67
Tabela 7. Composição percentual e função dos componentes da formulação em filme proposta.....	69
Tabela 8. Valores de CE ₅₀ para o AC e padrões pelo método de captura do radical DPPH [•]	78
Tabela 9. Valores de CE ₅₀ para o AC e padrões pelo método de captura do radical ABTS ^{•+}	83
Tabela 10. Valores de CE ₅₀ para o AC e padrões método de captura do O ₂ ^{•-} (SOD-like activity).....	88
Tabela 11. Valores de CE ₅₀ para o AC e padrões método de captura do O ₂ ^{•-}	92
Tabela 12. Equação da reta e valores de CE ₅₀ para o AC e os padrões pelo método de clareamento da crocina.....	97
Tabela 13. Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO [•] do AC em equivalentes aos padrões.	98
Tabela 14. Valores de CE ₅₀ para o AC e padrões pelo método de captura do HOCl/OCl ⁻	102
Tabela 15. Valores de CE ₅₀ para os padrões pelo método de captura de H ₂ O ₂	106
Tabela 16. Atividades de eliminação de EROs pelo trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e ácido cafeico expressos como concentração necessária para 50% de captura (CE ₅₀ , µg/mL).....	106

Tabela 17. Concentração AC nos poços.	110
Tabela 18. Atividade antimicrobiana do ácido cafeico frente às bactérias estudadas.....	113
Tabela 19. Bandas características da quitosana, do ácido cafeico, da estearilamina, da mistura física I e II e das micropartículas estruturadas I e II, obtidas por espectroscopia na região do infravermelho.	128
Tabela 20. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AC nos controles.....	169
Tabela 21. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AC microparticulado nas formulações.	173

LISTA DE ABREVIATURAS

A/O - Água em Óleo

AA: ácido ascórbico

AAPH: 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) dihidroclorato

Abs: Absorbância

ABTS^{•+}: Radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid

AC: ácido cafeico

AF: ácido ferúlico

ANOVA: *Analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHA: butil hidroxianisol

BHT: butil hidroxitolueno

CBM: Concentração bactericida mínima

CE₅₀: concentração efetiva 50, necessária para capturar 50% de espécies reativas

CIM: concentração inibitória mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPH[•]: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DRX: Difração de raios X

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

DTG: Termogravimetria derivada

DTNB: ácido 2-nitrobenzoico

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

ERNs: Espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

HO[•]: radical hidroxila

HO₂[•]: radical hidroperoxila

HOCl: ácido hipocloroso

HPMC: hidroxipropil metilcelulose

INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

J: Fluxo do AC através da epiderme
Kp: coeficiente de permeabilidade
LDL: lipoproteína de baixa densidade
LPO: lipoperoxidação
MP: micropartícula
N₂: nitrogênio
Na₄P₂O₇: pirofosfato de sódio
NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT: azul de tetrazólio
O/A: óleo em água
O₂: oxigênio molecular
O₂^{•-}: radical ânion superóxido
OCl⁻: ânion hipoclorito
pH: potencial hidrogeniônico
PMS: metossulfato de fenazina
q.s.p.: quantidade suficiente para
r: Coeficiente de correlação
r²: Coeficiente de determinação
SAXS: espalhamento de raios x a baixo ângulo
SOD: superóxido dismutase
TG: termogravimetria
TI: tempo de latência
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNB: ácido 2-nitro-5-tiobenzoico
TSB: caldo de triptona soja
UFC: Unidades formadoras de colônia
UV: ultravioleta
v/v: Volume por volume
WST: 2-(2-iodophenyl)-3-(4-(nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 A Pele.....	25
2.2 Administração tópica de ativos.....	30
2.3 Ácido cafeico.....	36
2.3.1 Atividade antioxidante	37
2.3.2 Atividade antimicrobiana	41
3 OBJETIVO GERAL.....	46
3.1 Objetivos Específicos	46
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
Material	47
Equipamentos	48
Métodos	49
4.1 Determinação do potencial antioxidante	49
4.1.1 Capacidade de captura sobre o DPPH [•]	49
4.1.2 Capacidade de captura sobre o ABTS ^{•+}	50
4.1.3 Método enzimático de captura de ânion superóxido- Kit SOD Assay.....	51
4.1.4 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido.....	53
4.1.5 Ensaio do Clareamento (<i>Bleaching</i>) da Crocina	53
4.1.6 Captura do ácido hipocloroso.....	54
4.1.7 Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	54
4.2. Determinação da atividade antimicrobiana	55
4.2.1. Preparo do inóculo	55
4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	56
4.3. Obtenção das micropartículas por <i>spray drying</i>	58
4.4 Caracterização físico-química das micropartículas.....	60
4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura	60
4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho	61
4.4.3 Difração de raios-X.....	61
4.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)/ Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)	62
4.4.5. Determinação do potencial zeta da dispersão de micropartículas.....	62
4.4.6. Quantificação do AC nas micropartículas	63
4.5. Desenvolvimento das formulações	63
4.5.1. Desenvolvimento do sistema emulsionado	63
4.5.2. Desenvolvimento de um sistema em filme.....	68
4.6. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i>	70
4.6.1 Estabilidade do AC na solução receptora	70

4.6.2. Estudo de liberação.....	70
4.7. Avaliação da permeação <i>in vitro</i> do AC	71
5 RESULTADOS	E
	DISCUSSÃO
.....	73
5.1 Determinação do potencial antioxidante	73
5.1.1 Capacidade de captura sobre o DPPH'	73
5.1.2 Capacidade de captura sobre o ABTS ^{•+}	79
5.1.3 Método enzimático de captura de ânion radical superóxido- <i>Kit SOD Assay</i>	84
5.1.4 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido	88
5.1.5 Ensaio do Clareamento (<i>Bleaching</i>) da Crocina	93
5.1.6 Captura do ácido hipocloroso.....	99
5.1.7 Capacidade de captura sobre o H ₂ O ₂	103
5.1.8. Análise comparativa entre os testes	106
5.2. Determinação da atividade antimicrobiana	108
5.3 Obtenção das micropartículas por <i>spray drying</i>	114
5.4. Caracterização das micropartículas	116
5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura	116
5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho	118
5.4.3 Difração de raios-X.....	129
5.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)/Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)	134
5.4.5. Determinação do potencial zeta da dispersão de micropartículas	146
5.4.6. Quantificação do AC nas micropartículas	147
5.5. Desenvolvimento das formulações	148
5.5.1. Desenvolvimento do sistema emulsionado	148
5.5.2. Desenvolvimento de um sistema em filme	154
5.6. Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do AC.....	156
5.6.1. Estabilidade do AC na solução receptora	156
5.6.2. Estudo de liberação.....	158
5.7. Avaliação da permeação <i>in vitro</i> do AC	169
6. CONCLUSÃO	175
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	176
ANEXO I	200

1 INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de cosméticos está entre os mais importantes, ocupando a 4ª posição no ranking mundial, perdendo para Estados Unidos, China e Japão. Nos últimos 20 anos, a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) exibiu um crescimento médio de 11,4%. Esse crescimento se deve a vários fatores, dentre eles o aumento da expectativa de vida, que trouxe a necessidade de conservar uma impressão de juventude (ABIHPEC, 2017).

Considerando o panorama atual onde a longevidade concretiza-se como grande avanço, do ponto de vista da cosmetologia, vislumbram-se novas perspectivas de crescimento para o setor que pode e deve enxergar como uma oportunidade de negócios as preparações que envolvam o cuidado da pele, conhecidas como preparações *skin care*. No Brasil esta expectativa ganha contornos mais relevantes ao considerar-se tratar de um setor com altíssimas perspectivas de crescimento. Dados recentes informam que o país é o 2º maior mercado em proteção solar, desodorantes, produtos masculinos, fragrâncias e depiladores; o 3º mercado em preparações capilares, preparações para uso infantil e higiene oral; o 4º mercado em preparações para o banho, o 5º mercado para as maquiagens e apenas o 8º mercado para as preparações que objetivam tratar a pele (ABIHPEC, 2018).

Apesar desta 8ª posição no mercado mundial de produtos para pele, esses representavam 39% do consumo nacional em 2014 (ABIHPEC, 2017). Fatores como o aumento da expectativa de vida, o maior consumo das jovens brasileiras, o aumento do consumo masculino e a maior procura por produtos de limpeza e hidratação foram fatores que contribuíram para esta posição (ABIHPEC, 2018).

Outro conceito que vem ao encontro às tendências e é justificável em função das dificuldades técnicas encontradas em algumas associações de ativos, bem como a possibilidade de se ter menores custos para a aplicação diz respeito ao conceito do “multifuncional”. A alta demanda por preparações que ofereçam mais de um benefício é uma realidade para o setor cosmético. Fatores tecnológicos e de marketing têm conduzido a esta situação. Do ponto de vista tecnológico diversas matérias-primas têm sido introduzidas facilitando

as técnicas de formulações e proporcionando habilidades para desenvolver produtos que possam atender a estas multifunções (WIECHERS, 2003). Concentrar esforços na busca deste tipo de quesito consoma-se em uma temática de real valor a ser almejado.

Além disso, as preparações antienvhecimento ou anti-idade que contenham ativos naturais vêm ganhando destaque no setor cosmético. Esses ativos se mostram tecnicamente e economicamente mais viáveis quando possuem propriedades multifuncionais (WIECHERS, 2003). O ácido cafeico (AC) é um dos metabólitos fenilpropanoides mais amplamente distribuído nos tecidos das plantas e se destaca por sua atividade antioxidante. Este polifenol está presente em muitas fontes alimentares, incluindo bebidas de café, mirtilos, maçãs e cidras. Além dos alimentos, o AC está presente em vários medicamentos de uso popular, na maioria, à base de própolis, sendo responsável pelo poder antibiótico da resina (LUSTOSA et al., 2008; MAGNANI et al., 2014a).

Para incorporação de ativos, as clássicas emulsões são muito utilizadas pelo consumidor pelo sensorial agradável e refrescante que proporcionam; no entanto, preparações desenvolvidas na forma de filme ou película seca apresentam-se como uma alternativa tecnológica pela sua facilidade e segurança no transporte pois o peso e o risco de vazamento são inconvenientes praticamente eliminados. Além disso, esse tipo de produto apresenta praticidade e comodidade no uso, uma vez que, ao ser aplicado na pele úmida, deve dissolver-se rapidamente, deixando sobre a mesma seus componentes (SANFELICE & TRUITI, 2010).

O desafio da aplicação tópica é vencer a barreira do estrato córneo e disponibilizar a concentração efetiva do ativo nas camadas mais profundas da epiderme e derme. Considerando as propriedades dos princípios ativos e as características da pele, nem sempre os ativos conseguem exercer a sua função da maneira mais adequada (CORRÊA, 2012). Assim, para vencer a barreira cutânea, sistemas micro e nanoestruturados têm sido desenvolvidos a fim de facilitar a entrega de ativos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos, cujo principal objetivo é disponibilizar o ativo no tecido por um período de tempo prolongado, sem causar danos ou toxicidade.

Assim, esse trabalho pretendeu realizar uma avaliação exploratória das atividades antioxidante e antimicrobiana do AC a fim de utiliza-lo como um ativo multifuncional veiculado em micropartículas (MP) de quitosana.

A relevância deste estudo baseia-se no uso cada vez mais frequente de produtos cosméticos, dessa forma estudos que evidenciem e esclareçam as suas funções são de extrema importância.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Pele

A pele é um órgão muito atrativo para administração de substâncias devido à sua considerável superfície. A aplicação de substâncias sobre a pele pode ter duas finalidades: ação local ou liberação transdérmica atingindo os tecidos e a circulação sistêmica (BARRY, 2001).

As culturas antigas já consideravam a pele para essa finalidade. Desde o antigo Egito já foram encontrados relatos de utilização de unguentos para preservação de corpos. Existem também referências da antiga Grécia: Homero, em *Ilíadas* usa uma pomada para poder voar sobre as montanhas mais altas do mundo. Na Idade Média, bruxas misturavam alcaloides com gordura de porco e aplicavam a formulação na pele para ter alucinações e acreditar que podiam voar. No entanto, a pele como via de administração de fármacos para efeito sistêmico foi principalmente um assunto de interesse nas últimas décadas (UJVARI, 2015).

A pele é a interface entre o corpo e o ambiente. Muitas vezes, é considerada uma barreira que protege o corpo contra uma grande variedade de produtos químicos e microrganismos devido à sua baixa permeabilidade, além de proteção contra o estresse mecânico. Também impede a desidratação do corpo, regula a homeostase e protege dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta, por exemplo através do seu teor de melanina e espessamento da camada córnea. Muitos receptores sensíveis à temperatura ou às mudanças de pressão, a dor ou o toque estão presentes neste tecido para permitir as interações com o meio ambiente. Ele regula a temperatura corporal através do seu sistema capilar e tecido adiposo e produz vitamina D, essencial para o crescimento e manutenção óssea. Entre todas as funções da pele, para esta pesquisa é de especial interesse a sua função como barreira, já que os produtos cosméticos não podem ter efeito sistêmico e devem agir apenas na superfície da pele (CHIEN, 2001).

Para entender os efeitos das formulações cosméticas, é necessário rever a anatomia, a fisiologia e a estrutura química da pele. A pele é o maior órgão do corpo humano com uma superfície de aproximadamente 1,5-2 m² e 4 kg de peso. Sua espessura varia de 0,05 a 2 mm. Pode ser dividida em três

camadas: epiderme, derme e tecido subcutâneo (Figura 1). Além dessas estruturas, existem também vários anexos associados: folículos capilares, glândulas sudoríparas, glândulas endócrinas e unhas (ROSA et al., 2014).

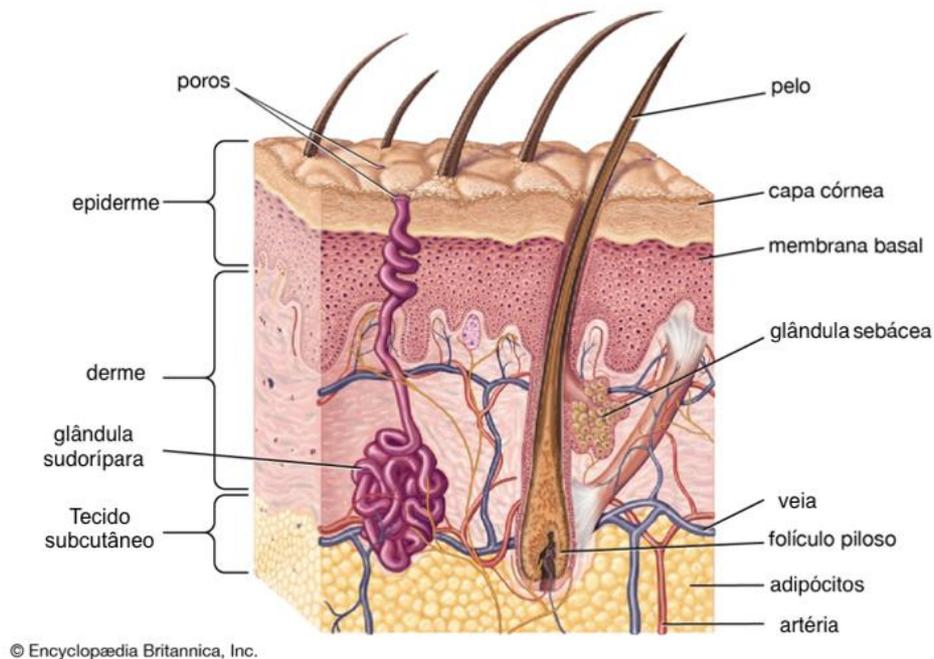


Figura 1. Camadas da pele e anexos.

(Fonte: Adaptado de enciclopédia britânica)

A pele é composta por uma porção epitelial, chamada de epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme (CORRÊA, 2012).

Epiderme

A epiderme é a camada mais externa da pele com uma espessura média de 0,1-0,15 mm (MENON, 2002). Quatro camadas compõem a epiderme dependendo do seu grau de diferenciação: camada basal, espinhosa, granulosa e córnea. Em algumas áreas anatômicas, como a planta dos pés e a palma da mão, está presente uma quinta camada: a camada lúcida (Figura 2) (PIROT et al., 1998; KUMAR et al., 2007).

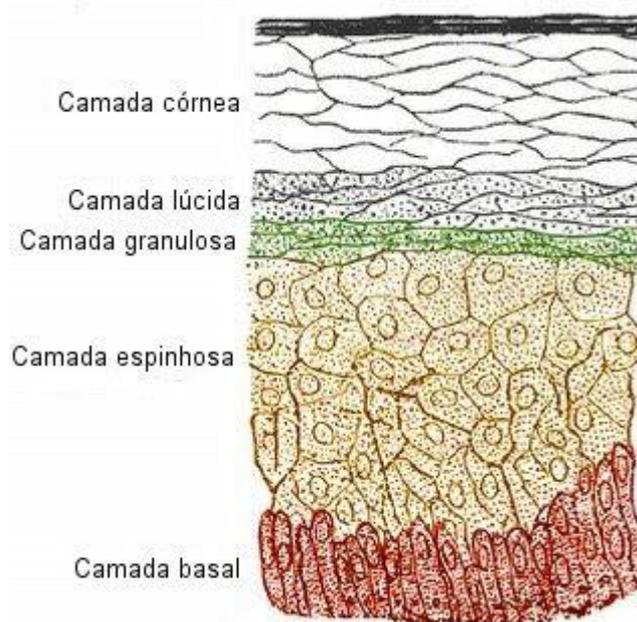


Figura 2. Camadas da epiderme.

(Fonte: <https://skincareclub.wordpress.com/2011/02/04/skin-structure/>)

A camada basal é a camada mais profunda da epiderme que faz contato direto com a derme. É formada por uma única fileira de células prismáticas em intensa divisão celular. Essas células sofrem diferenciação e vão migrando para a camada mais externa, enquanto ocorrem alterações metabólicas e anatômicas (perda de fosfolipídios, aumento do teor de colesterol e perda de organelas celulares). Nesse processo as células partem da camada basal e vão sendo deslocadas para a periferia até a camada córnea, num período de 21 a 28 dias, processo responsável pela renovação da epiderme, fornecendo células para substituir as que são perdidas na camada córnea (CORRÊA, 2012).

A camada espinhosa está localizada acima da camada basal e é formada por 4 a 10 fileiras de células ligeiramente achatadas, com núcleo central e pequenas expansões no citoplasma que dá o aspecto espinhoso. Os queratinócitos continuam produzindo queratina e apresentam-se ligeiramente achatados e unidos entre si, permanecendo na camada espinhosa por aproximadamente 26 a 42 dias (PIROT et al., 1998).

A camada granulosa é caracterizada pela presença de células poligonais com núcleo central, achatadas, com a presença de grânulos de queratina no citoplasma. Estas células produzem grânulos de queratina e grânulos de

substância fosfolipídica associada à glicosaminoglicanos que são expulsos das células, formando uma barreira entre as células e impedindo a passagem de compostos e água. Esta barreira proteica confere grande resistência às células. Na camada granulosa os queratinócitos encontram-se menos hidratados, achatados e com maior produção de queratina (CORRÊA, 2012).

A camada lúcida é constituída por uma fina camada de células achatadas, cujos núcleos celulares apresentam sinais de degeneração e existem poucas organelas citoplasmáticas. Estas células estão parcialmente preenchidas por queratina e sobre elas existe uma cobertura glicolipídica que, juntamente com a queratina, torna a membrana plasmática impermeável a fluidos. Nem todas as regiões do corpo possuem esta camada que existe mais comumente nas regiões palmoplantares (HONEYWELL-NGUYEN et al., 2003).

A camada mais superficial, camada córnea, com 10 a 20 μm de espessura é formada por 18 a 21 camadas de corneócitos, que são células mortas superpostas muito finas completamente cornificadas com apenas 13% de conteúdo de água em condições normais. Esta quantidade mínima de água é necessária para manter a flexibilidade da pele (PIROT et al., 1998; HONEYWELL-NGUYEN et al., 2003). O lado externo da pele é coberto por uma emulsão percutânea levemente ácida (pH 5-6) para proteção antimicrobiana.

Os corneócitos ficam dispersos em uma matriz rica em lipídios não polares. Essa matriz é constituída principalmente por ceramidas (18%), ácidos graxos livres (19%), esteroides (14%) e triacilgliceróis (25%). Essa camada de lipídios intercelulares é a responsável direta por evitar a perda de água transcutânea (FARTASCH, 1997). Pela sua estrutura e composição, o estrato córneo é a principal barreira limitante à difusão percutânea de fármacos (CORRÊA, 2012).

Os corneócitos são continuamente removidos por um processo natural de descamação da pele. Este fato requer uma produção e diferenciação constante e controlada de células novas para reabastecer a camada mais externa, o estrato córneo. A proliferação é regulada por muitos fatores intrínsecos, ou seja, o fator de crescimento epidérmico, por enzimas, como a proteína quinase e por fatores extrínsecos, como temperatura, radiação UV, vitamina D3 (VAN ROSSUM et al., 1998; NEMANIC et al., 1983). Em algumas

doenças como na psoríase, ocorre um aumento do fator de crescimento epidérmico provocando uma descamação incomum, já alguns fármacos, como a dexametasona, inibem o fator de crescimento epidérmico (KONDO et al., 1990).

Alguns outros tipos de células também estão presentes na epiderme, como melanócitos, que são células dendríticas produtoras de melanina responsáveis pela proteção a radiação solar UV; células de Langerhans, relacionadas ao sistema imunológico; e células de Merkel, responsáveis pela percepção sensorial. As enzimas esterases, fosfatases e lipases também podem ser encontradas na epiderme (STROHAL et al., 1993).

Derme

Esta é a camada localizada sob a epiderme. A derme é o elemento de sustentação e nutrição da epiderme e seus anexos. É um tecido essencialmente fibroso, constituído de fibras colágenas e elásticas, imersas em um gel de proteoglicanos, onde o elemento celular principal é o fibroblasto. A camada superior da derme é formada por papilas que se projetam em direção à epiderme e que contêm vasos sanguíneos e linfáticos, as terminações nervosas e os apêndices cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas (ELDER et al., 2011).

A abundante irrigação desta camada garante a nutrição das células da própria derme e da epiderme. Além dos fibroblastos, os macrófagos, mastócitos e leucócitos também estão presentes nesta camada. Inseridos na derme, aparecem os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas que atravessam todas as estruturas da pele até a superfície.

A derme contém entre 20 e 40% da água total do corpo graças, em parte, às propriedades hidrofílicas dos proteoglicanos, responsáveis pela elasticidade e flexibilidade da pele (CHIEN, 2001).

Tecido Subcutâneo

Abaixo e em continuidade com a derme está o tecido subcutâneo, que embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele. O acúmulo de gordura neste tecido representa um dos fatores contribuintes para a força tênsil da pele (CUNHA et al., 2014).

Além do alto teor de tecidos gordurosos, apresenta fibras de colágeno, que conectam a estrutura da pele flexível com os tecidos subjacentes. Sua principal função é oferecer proteção térmica e mecânica do corpo. Está presente em todo o corpo, exceto nas sobrelanceias e nos órgãos genitais masculinos. Seu tamanho e composição variam de acordo com diversos fatores como sexo, idade, sistema endócrino e condições nutricionais (ELDER et al., 2011).

2.2 Administração tópica de ativos

Existem três possíveis objetivos para uma formulação tópica dependendo do sítio alvo (Figura 3) (MELERO, 2009):

- a) Simular a função de barreira da pele. É assim que funcionam os antibióticos ou os fármacos antifúngicos. Eles são administrados quando a pele está danificada para protegê-la contra infecções. A aplicação de protetores solares para proteger a pele contra radiação UV seria outro exemplo dessa aplicação.
- b) Permeação da substância nas camadas viáveis da pele. Este é o caso de anti-inflamatórios, anestésicos, anti-histamínicos e antioxidantes.
- c) Administração transdérmica de fármacos com finalidade sistêmica. Alguns fármacos como a nicotina e estrogênios são administrados por adesivos transdérmicos em terapias crônicas.

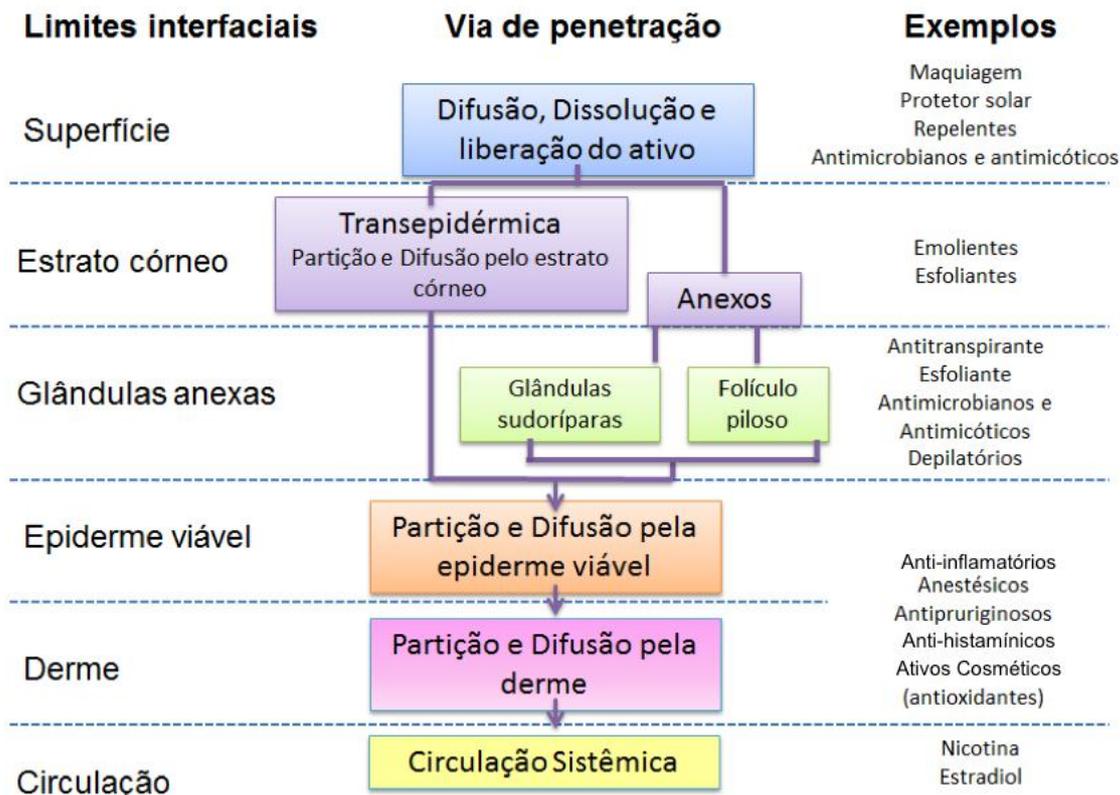


Figura 3. Esquema das diferentes camadas da pele, rotas de administração e exemplos de tratamentos para fins locais ou sistêmicos.

(Fonte: Adaptado de MELERO, 2009).

Para atingir a epiderme viável, os ativos cosméticos têm que difundir através de várias camadas com diferentes propriedades químicas. Após a liberação da formulação, a substância tem que passar pela superfície e difundir através do estrato córneo. Esta é a camada considerada como limitativa para a permeação de ativos pela pele. Depois de atravessar esta camada de alta lipofilicidade, o composto tem que passar da camada inferior do estrato córneo para a epiderme viável, que é uma camada mais hidrofílica (DANIELS, 2004).

Dentre as formulações destinadas à veiculação de substâncias por via tópica, as emulsões são muito utilizadas, pois são muitas as vantagens que elas oferecem sob o ponto de vista farmacêutico e cosmético. As emulsões possuem um sensorial agradável, são fáceis de aplicar e espalhar sobre a pele e por si só já melhoram o aspecto da pele pela hidratação fornecida (GENARO, 2000; SMITH et al., 2000; FONSECA, 2007).

Entretanto, os sistemas emulsionados são termodinamicamente instáveis, pois são formados por misturas complexas de uma grande variedade de excipientes com características apolares ou polares, imiscíveis entre si, e são estabilizadas por um agente tensoativo emulsificante. Dependendo da fase externa ou também denominada dispersante, as emulsões podem ser classificadas em O/A (óleo em água) e A/O (água em óleo) (SILVA & SOARES, 1996; PRISTA, 2008; CORRÊA, 2012).

Durante o desenvolvimento de uma emulsão cosmética, além do aspecto estético da formulação, o delineamento das propriedades físico-químicas e da estabilidade é fundamental (MOSTEFA et al., 2006), pois as emulsões podem sofrer alterações em decorrência da temperatura, transporte e tempo de armazenamento (ISAAC et al., 2008).

A utilização de filmes poliméricos no setor farmacêutico e alimentício não é novidade, já que servem de revestimento para sistemas terapêuticos sólidos orais, controle de liberação de fármacos e para a obtenção de embalagens ou produtos comestíveis biodegradáveis (BUNHAK et al., 2007; SINGH et al., 2008).

A produção de cosméticos em filme, particularmente no Brasil, ainda não é comum. Dentre as diferentes possibilidades, vale ressaltar o desenvolvimento de produtos destinados a serem aplicados em pequenas extensões tais como ao redor dos olhos ou em erupções acneicas (SPAGNOL et al., 2017).

Filmes poliméricos são preparações inovadoras desenvolvidas na forma de uma película seca que ao serem aplicados na pele úmida, devem ser dissolvidos rapidamente, deixando sobre a área aplicada os seus componentes. O benefício que esses produtos trazem é que podem ser transportados de modo prático e seguro, já que o peso e o risco de vazamento são inconvenientes praticamente eliminados (SPAGNOL et al., 2017).

Um exemplo de agente formador de filme muito utilizado industrialmente é o Pullulan[®], produto comercial formado por fermentação à base de polissacarídeo natural, constituído de unidades de maltotriose (KHAN et al., 2007). Ele pode ser usado como substituto do amido, como agente adesivo, ou pode ser usado para melhorar a aparência e/ou o sensorial do produto, bem como aumentar a vida de prateleira em produtos alimentícios. No setor farmacêutico pode ser empregado na produção de cápsulas, comprimidos,

pílulas, grânulos e sistemas de liberação controlada (KHAN et al., 2007; SINGH et al., 2008). Por não ser tóxico nem irritante para o corpo humano, pode ser aplicado em qualquer cosmético, mas tem sido mais utilizado como ingrediente em produtos para a área dos olhos, em xampus, dentifrícios, pós e loções cosméticas (SINGH et al., 2008).

Com o objetivo de promover liberação de ativos de forma mais lenta e controlada, para que sua ação seja prolongada, a indústria cosmética tem buscado desenvolver produtos baseados na nanotecnologia, garantindo a inovação e aperfeiçoamento do setor.

Tendo como foco o setor cosmético, a empresa pioneira a introduzir um cosmético de base nanotecnológica, no âmbito internacional, foi a Lancôme, divisão de luxo da L'Oréal, em 1995, com o lançamento de um creme para o rosto constituído por nanocápsulas de vitamina E, para combater o envelhecimento da pele. Diversas outras empresas internacionais renomadas também passaram a investir em pesquisa para desenvolver produtos nesta linha (ERENO, 2008; NEVES, 2008).

A nanotecnologia voltada para a cosmética tem como foco, sobretudo, os produtos destinados à aplicação na pele do rosto e do corpo, com ação antienvelhecimento, capazes de penetrar nas camadas mais profundas da pele, objetivando potencializar os efeitos do produto (NEVES, 2008).

Um nanocosmético seria uma formulação cosmética que veicula ativos ou outros ingredientes nanoestruturados. A nanoencapsulação de ativos pode aumentar a atividade ou até mesmo reduzir a concentração requerida do ativo para efetividade, pode também aumentar o prazo de validade, reduzir a cor ou odor dos ativos, proteger o ativo de degradação, aumentar a solubilidade, modificar o perfil de liberação, entre outros fatores (ROSEN, 2005; FRONZA et al., 2007).

O FDA não estabeleceu definições regulamentares de “nanotecnologia”, “nanomaterial”, “escala nanométrica” ou outros termos relacionados, mas emitiu uma orientação para as indústrias que produzem esses produtos que observassem: (1) se o produto foi projetado para ter dimensão entre 1 a 100 nm; e (2) se o produto foi projetado para exibir propriedades físicas, químicas e biológicas que são atribuíveis às suas dimensões, mesmo que essas dimensões estejam fora do alcance da nanoescala (ZANETTI-RAMOS, 2015).

Dentre os sistemas utilizados em nanotecnologia encontram-se os lipossomas (JUKANT et al., 2011), as nanoemulsões (GAN et al., 2013), as nanosuspensões (MUDGIL & PAWAR, 2013), as ciclodextrinas (SWAMINATHAN et al., 2010) e as micropartículas (GUO et al., 2012).

As micropartículas são sistemas sólidos, geralmente esféricos, com dimensões que vão desde 1 a 1000 µm até alguns milímetros. Podem ser constituídas por matrizes poliméricas (microesferas) nas quais o fármaco pode estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à rede tridimensional formada pelo polímero, ou por sistemas reservatórios (microcápsulas) nas quais o fármaco representa um núcleo sólido, líquido ou gasoso, separado do meio externo por uma membrana polimérica (UCHEGBU & SCHÄTZLEIN, 2006; ROSSANEZI, 2008; SILVA JUNIOR, 2008; ROY & NAYAK, 2017).

Existem aspectos muito importantes das micropartículas que as tornam aplicáveis para utilização em cosméticos, entre as quais pode-se citar a biodegradação, bioadesão, biocompatibilidade e baixa toxicidade. Além disso, o tipo de polímero utilizado determina o mecanismo de liberação do fármaco envolvido. Em matrizes biodegradáveis, a liberação ocorre pela entrada do solvente através de poros formados na matriz polimérica, dissolvendo e difundindo o fármaco para o meio de liberação, ou através da degradação ou erosão do polímero, expondo o fármaco ao meio de dissolução, sendo que a difusão ocorre na etapa inicial e a erosão tende a ocorrer numa fase mais tardia, com a liberação do fármaco disperso na matriz (BENITA, 2006; ROSSANEZI, 2008; RODRIGUES et al., 2017).

A escolha dos polímeros utilizados deve ser criteriosa já que deve ponderar também questões ambientais. Vem tramitando nos Estados Unidos há muitos anos, um projeto de proibição das esferas de polietileno em Produtos de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Até o momento nove Estados já proibiram o uso e o texto caminha para aprovação nacional (ABRAMS, 2018). O Reino Unido também sancionou uma lei em janeiro de 2018 com a proibição da fabricação de microesferas de plástico presentes em produtos como cosméticos e pastas de dente (BOAVENTURA, 2018).

Essa preocupação faz sentido, essas partículas chegam a ser tão pequenas que, quando despejadas no esgoto, passam de forma imperceptível

pelos filtros de tratamento, chegando aos rios e mares. No final, as partículas acabam sendo absorvidas ou consumidas pelos animais aquáticos.

Nesse contexto, a quitosana se destaca por ser um polímero natural, biodegradável, biocompatível, extremamente abundante e atóxico. É um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos, ou seja, sua fácil obtenção se dá principalmente por se tratar de rejeitos da indústria pesqueira (AZEVEDO et al., 2007).

A quitosana é um biopolímero que possui uma estrutura molecular quimicamente similar à celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. Grupos hidroxila (OH) estão dispostos na estrutura geral dos biopolímeros, mas a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino (NH_2) na estrutura da quitosana. Ela é solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino (NH_3^+), que confere propriedades especiais diferenciadas em relação às fibras vegetais (MENDES et al., 2011). A Figura 4 mostra a estrutura química dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose.

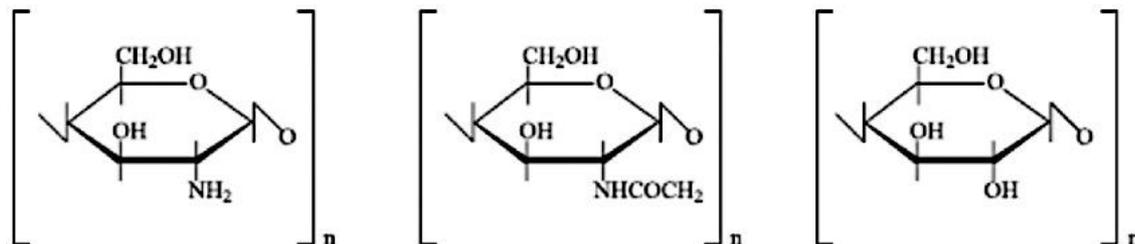


Figura 4. Estrutura dos biopolímeros quitosana, quitina e celulose.

Fonte: MENDES et al., 2011.

Apesar do grande potencial da quitosana para formação de micropartículas destinadas à veiculação de ativos cosméticos, sua aplicação na indústria cosmética já é reconhecida na encapsulação de fragrâncias e pigmentos, em loções e cremes protetores, produtos dentários, xampus e condicionadores. No meio industrial é usada na purificação de águas residuárias, estabilizantes de gorduras em preparações de alimentos e estabilizante de aromas. Na área da saúde, atua como agente absorvedor de gorduras, regeneração de ferimentos, regenerador de estrutura óssea, inibe a

formação de placas dentárias, além de suas inúmeras aplicações na agroindústria e biotecnologia (MENDES et al., 2011, AHMAD et al., 2017).

Por tudo isso, a quitosana se destaca por apresentar carga global positiva em pH biológico, e assim interage com tecidos negativamente carregados, tais como a pele (ITO et al., 2000; SINHA et al., 2004). Assim, a escolha da quitosana como biopolímero para microencapsulação do ácido cafeico como ativo cosmético mostra-se promissora.

2.3 Ácido cafeico

Os compostos fenólicos ocorrem de maneira universal no reino vegetal e fazem parte de um grande e complexo grupo de substâncias orgânicas. Os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma grande diversidade de compostos fenólicos, os quais conferem defesa contra os ataques dos radicais livres, que são formados como subprodutos provenientes do processo de fotossíntese e contra injúrias dos tecidos (SOARES, 2002; MAGNANI et al., 2014a).

Os derivados do ácido cinâmico, também chamados de fenilpropanoides, são estruturas com nove carbonos (Figura 5). O ácido cafeico (AC) é um representante deste grupo.

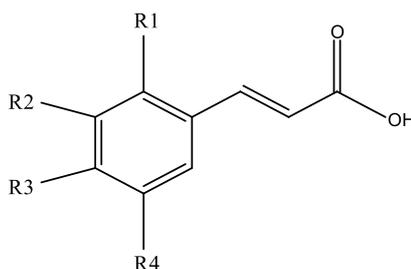


Figura 5. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico: $R_1=R_2=R_3=R_4=H$; ácido *o*-cumárico: $R_2=OH$; ácido *p*-cumárico: $R_3=OH$; ácido cafeico: $R_2=R_3=OH$; ácido ferúlico: $R_2=OCH_3$ e $R_3=OH$.

O AC é um dos metabólitos hidroxicinamatos ou fenilpropanoides mais amplamente distribuído nos tecidos das plantas. Este polifenol está presente em muitas fontes alimentares, incluindo bebidas de café, mirtilos, maçãs e cidras (CLIFFORD, 2000; MAGNANI et al., 2014a). Além dos alimentos, o AC

está presente em vários medicamentos de uso popular, na maioria, à base de própolis (LUSTOSA et al., 2008). Além de agir como um inibidor carcinogênico (HUANG et al., 1992; GREENWALD, 2004), também é conhecido como um antioxidante e antibacteriano *in vitro*, podendo contribuir para a prevenção de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (SANCHEZ-MORENO et al., 2000; VINSON et al., 2001; WORLDWIDE, 2018).

O AC apresenta alta solubilidade em etanol, metanol e DMSO; e é praticamente insolúvel em água. Não existem informações sobre a solubilidade do ácido cafeico em compêndios oficiais (SPAGNOL, 2014). No entanto, as informações encontradas no Merck Index (2006) comprovam a baixa solubilidade em água e alta solubilidade em etanol.

2.3.1 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes (SOARES et al., 2005). Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (DOSSIÊ DE ANTIOXIDANTES, 2018).

O AC atua como antioxidante por eliminação dos radicais livres de oxigênio e quelando íons metálicos pró-oxidantes, especialmente ferro (PAIVA-MARTINS et al., 2002; HYNES et al., 2004). Os grupos hidroxila dessas moléculas conferem a atividade antioxidante porque são capazes de doar átomos de hidrogênio às espécies reativas de oxigênio (EROs), mas eles não são os únicos fatores na determinação da potência de suas atividades (MAGNANI et al., 2014a).

A presença de um segundo grupamento hidroxila no AC em posição *orto*, além da posição *para*, é conhecido por aumentar a atividade antioxidante devido à estabilização por uma ressonância adicional e formação *o*-quinona

(Figura 6) (SALAS-REYES et al., 2011; OZTURK et al., 2012). Isto pode ser usado para explicar o fato de que a eficiência de antioxidantes como AC é maior do que a de outros ácidos fenólicos.

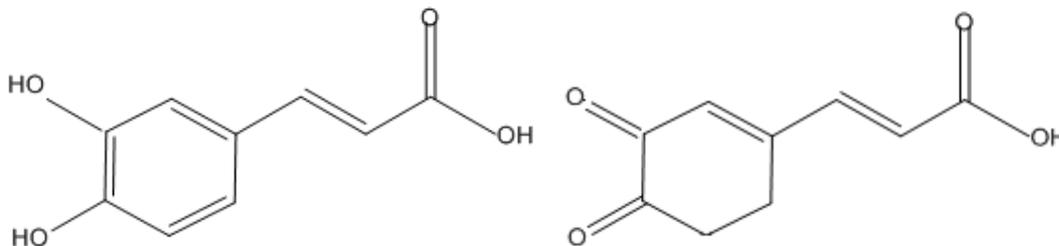


Figura 6. Estrutura química do ácido cafeico e da *orto*-quinona.

O AC tem demonstrado ser um protetor de α -tocoferol em lipoproteína de baixa densidade (LDL). Além disso, a sua conjugação com outros produtos, tais como com os ácidos clorogênicos e caftárico demonstrou potencialização da atividade antioxidante em diversos sistemas (FUKUMOTO & MAZZA, 2000).

Antioxidantes fenólicos naturais, incluindo o ácido cafeico, ganharam atenção notável como promissores agentes protetores dos danos fotoxidativos (YAMADA et al. 2006; MURRAY et al., 2008) e também têm estado presentes em produtos de cuidado para pele pela sua atividade antioxidante. Contudo, a literatura mostra poucas evidências sobre a utilidade dos ácidos hidroxicinâmicos para proteger a pele.

O metabolismo celular normal produz radicais livres, que incluem as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que são derivados tanto de processos metabólicos normais e essenciais ao organismo (endógenos), quanto da exposição a fatores ambientais (exógenos) como poluição, radiações, pesticidas, tabaco, entre outros (HADSHIEW et al., 2000; YAAR & GILCHREST, 2001; MENON et al., 2009).

A importância das EROs e os radicais livres têm atraído atenção crescente ao longo das últimas décadas. EROs incluem radicais livres tais como radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}) e espécies reativas de oxigênio tais como H_2O_2 e oxigênio singlete (O_2). Estas moléculas exacerbam fatores de lesão celular e processo de envelhecimento (GÜLÇİN et al., 2002).

As EROs são continuamente produzidas durante eventos fisiológicos normais e eles podem facilmente iniciar a peroxidação de lipídeos da membrana, conduzindo à acumulação de peróxidos lipídicos (DUH et al., 1999; BÜYÜKOKUROGLU et al., 2001). No entanto, as células desenvolveram mecanismos antioxidantes para protegerem-se da toxicidade promovida pelos radicais livres. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem: enzimas que removem cataliticamente os radicais como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre como, por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar espécies reativas de oxigênio via auto-oxidação como, por exemplo, glutatona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico (AA) e β -caroteno (CADENAS, 1989; BERRA & MENCK, 2006).

Quando há desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes ocorre o estresse oxidativo (SCHAFER & BUETTNER, 2001; FINKEL & HOLBROOK, 2000), que está relacionado com danos lipídicos, proteicos e genéticos e por isso, implica em uma grande variedade de doenças humanas, assim como no processo de envelhecimento (VALKO et al., 2007).

Os radicais livres também agem sobre o tecido cutâneo, sendo originados principalmente por ações exógenas, como é o caso da radiação ultravioleta. Dependendo da dose, tempo de exposição, comprimento de onda e área exposta, a radiação ultravioleta pode causar desde queimaduras na pele e envelhecimento cutâneo precoce até danos ao DNA celular cutâneo e carcinoma de pele (COTINGUIBA et al., 2013).

Assim, o envelhecimento natural da pele associado à ação dos radicais livres provoca redução da hidratação da pele, eventualmente pigmentação e rugas finas, sinais de flacidez e aumento da possibilidade de aparecimento de neoplasmas. Outra mudança dérmica é a diminuição das fibras colágenas que torna a pele mais fina. Essas alterações são ainda mais evidenciadas após a menopausa, em que ocorre uma rápida diminuição dos níveis de colágeno na pele e na massa óssea, sugerindo que o estrógeno influencia na síntese de colágeno tanto na pele quanto na massa óssea (YAAR & GILCHREST, 2007).

Com o intuito de manutenção da pele mais saudável e com aparência mais jovem, atenuando assim os efeitos do envelhecimento, cada vez mais estratégias têm sido sugeridas (MENON et al., 2009). A utilização de compostos antioxidantes naturais ou sintéticos em alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres (LOBO et al., 2010).

Um estudo realizado por Gülçin (2002) mostrou claramente a eficácia antioxidante do AC empregando-se diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, incluindo a atividade antioxidante total resultante pela aplicação do método tiocianato férrico, método de inibição do radical ABTS^{•+} e DPPH[•], radical ânion superóxido e atividade quelante de metais. Tais ensaios foram aplicados em comparação com compostos antioxidantes convencionais, tais como BHA, BHT, α -tocoferol, um antioxidante natural e trolox, que é um análogo hidrossolúvel do tocoferol.

Marti-Mestres e colaboradores (2007) estudaram três fenilpropanoides antioxidantes relacionados com a neutralização de radicais superóxido e radicais hidroxila, dentre eles o AC. Verificou-se a permeação cutânea desses compostos, já que podem ser usados na cosmetologia, a fim de proteger a pele contra o estresse oxidativo induzido por radiação UV. Foi observado que o AC a 2% a partir de uma solução de etoxidiglicol- propilenoglicol (1:1, v/v) conseguiu ultrapassar todas as camadas da pele de orelha de porco, podendo apresentar uma atividade sistêmica. Saija e colaboradores (2000) também realizaram estudos de permeação com pele humana e comprovaram a capacidade do ácido cafeico em permear a pele a partir de uma solução aquosa supersaturada e que esta característica é independente do pH da solução receptora ser 3,0 ou 7,2.

Como a radiação solar penetra profundamente na pele, deve-se garantir que substâncias aplicadas topicamente consigam permear através do estrato córneo, o principal obstáculo contra permeação de substâncias exógenas através da pele e que atinjam as camadas mais profundas a fim de promover satisfatória proteção (TRAN et al., 2008; WANG et al., 2010).

A absorção de um composto na pele é determinada pelas suas características físico-químicas, sendo a lipofilicidade e o peso molecular as mais importantes quando se trata do processo de permeação (ALLEVATO,

2007). Assim, a alta lipofilicidade do AC pode contribuir para sua permeação através do estrato córneo.

O AC também demonstrou eficiência em proteger a fosfatidilcolina da peroxidação provocada pela radiação UV, o que é relevante já que a fosfatidilcolina é um dos principais constituintes de bicamadas lipídicas das membranas celulares (SAIJA et al., 1999).

2.3.2 Atividade antimicrobiana

Está claro que os consumidores buscam, cada vez mais, cosméticos mais eficientes, apresentando realmente algum efeito biológico, principalmente na prevenção do envelhecimento precoce, e de doenças como cânceres causados pela ação dos radicais livres no material genético celular. Portanto, assim como medicamentos, estes produtos devem também oferecer segurança ao consumidor. Aliado a isto, a legislação está cada dia mais rigorosa, o que tem desafiado as indústrias (NAZER et al., 2005). Por essa razão, compostos antimicrobianos naturais estão sendo amplamente utilizados (WEN et al., 2003).

Além de sua notável atividade antioxidante, estudos *in vitro* demonstraram ação antimicrobiana da própolis frente aos diversos microrganismos patogênicos bucais. Vários componentes da própolis têm sido analisados em diferentes países, sendo o ácido cafeico, o éster fenetílico do ácido cafeico e os flavonoides, os principais responsáveis pelo poder antibiótico desta resina (HAVSTEEN, 1983; MARCUCCI, 1996; MENEZES, 2005).

Campos e colaboradores (2003) demonstraram que alguns fenilpropanoides, incluindo o ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico, são capazes de inibir o crescimento de bactérias, incluindo *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e algumas leveduras.

A atividade antimicrobiana dessas substâncias não depende apenas de sua estrutura, mas também das condições ambientais. O ácido cafeico tem uma menor capacidade de inibir *Listeria* quando comparado a outros derivados de ácido hidroxicinâmicos, devido à presença de um grau elevado de hidroxilação (WEN et al., 2003). Além disso, os fatores ambientais, incluindo pH

e a concentração de cloreto de sódio, são importantes, porque produzem algumas mudanças fisiológicas nos microrganismos que os tornam mais sensíveis aos fenilpropanóides (CANILLAC et al., 2004).

Almajano e colaboradores (2007) verificaram que a atividade antioxidante e antimicrobiana do ácido cafeico foram pronunciadas em emulsões cosméticas com pH ácido (3 e 5). O AC mostrou nestes valores de pH, efeitos antimicrobianos contra vários microrganismos estudados (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*).

Devido ao grande número de microrganismos existentes, a pesquisa por novos agentes antimicrobianos deve ser estimulada para auxiliar no tratamento de infecções e prevenir a resistência bacteriana (HOEFEL & LAUTERT, 2006).

Assim, uma pesquisa detalhada sobre sua atividade antimicrobiana é interessante para que o AC possa ser usado com segurança em produtos farmacêuticos e cosméticos, seja como substância ativa ou como conservante de formulações.

Conservantes, também conhecidos como preservantes, são substâncias com atividade bacteriostática e/ou fungistática. Seu objetivo é inibir o crescimento e a proliferação de microrganismos no produto, conservando-o livre de deteriorações, aumentando a vida útil do produto e mantendo o bom aspecto do produto final. A regulamentação do uso de substâncias de ação conservante permitidas é o primeiro aspecto a ser considerado na escolha de um conservante, seguido pelo conhecimento das suas propriedades físico-químicas para se prever possíveis incompatibilidades químicas com componentes da fórmula. Em geral, cremes e loções exigem atividade tanto bacteriostática quanto fungistática, utilizando-se, assim, uma mistura de conservantes de amplo espectro de atividade (SIQUEIRA, 2018).

O uso de conservantes em preparações cosméticas é regulamentado pela RDC 29, de 1º de junho de 2012 definindo a lista de substâncias com ação conservante e as concentrações permitidas para produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (BRASIL, 2012).

O conservante ideal deve apresentar atividade de amplo espectro, ou seja, deve apresentar a capacidade de eliminar fungos, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e deve ser efetivo a baixas concentrações,

reduzindo as chances de irritações ou outros problemas de toxicidade. A substância deve ser solúvel em água, devido ao fato dos microrganismos crescerem na fase aquosa e também deve ser estável em ampla faixa de temperatura e pH. A compatibilidade com todos os ingredientes da fórmula é fundamental para não perderem a atividade na sua presença (WILKINSON & MOORE, 1990; TAVARES & PEDRIALI, 2011).

Os parabenos, ésteres do ácido parahidroxibenzoico, são os conservantes antimicrobianos mais utilizados em cosméticos. Segundo as regulamentações do Brasil, o uso permitido de parabenos é de, no máximo, 0,4% de cada ou de 0,8% quando associados. Apresentam atividade contra fungos e bactérias Gram positivas. A limitação está na quantidade que pode ser dissolvida na água, funcionando apenas em fase aquosa (SONI et al., 2005; PRISTA et al., 2008).

O formaldeído e os liberadores de formaldeído fazem parte de uma outra classe de conservantes que inclui a DMDM hidantoína, imidazolidinil ureia e diazolidinil ureia. Os compostos fenólicos são outros tipos de conservantes que atuam sobre a membrana celular, apresentando atividade antimicrobiana. O fenoxietanol inclui-se nesta categoria e é amplamente usado na indústria de fragrâncias como solvente. É um composto solúvel em água, sendo um excelente solvente para os parabenos e os demais conservantes. Apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas, porém é um biocida fraco, sendo utilizado sempre em associação com outros conservantes. Outro exemplo é o álcool benzílico, utilizado como componente de fragrâncias e aromas e como preservante em produtos injetáveis, oftálmicos e orais. Eficaz contra bactérias Gram-positivas e em alguns casos contra Gram-negativas. Apresenta um efeito anestésico e deve-se incluir sempre um antioxidante na formulação, pelo fato de sofrer oxidação em luz UV. Por fim, o ácido fenético é um composto ativo contra bactérias e deve-se incluir um antioxidante na formulação por ser um produto sujeito à reação com agentes oxidantes. A concentração permitida é no máximo 0,5% (KABARA & ORTH, 1997; CORRÊA, 2012).

Os conservantes acídicos são ácidos que apresentam atividade em sua forma acídica e são pH dependentes. Para facilitar a incorporação nas formulações, estão disponíveis em forma de sais, dessa maneira, quando adicionado, o pH é baixado para liberar o ácido livre. Alguns exemplos desta

categoria são ácido dehidroacético, ácido benzoico, ácido sórbico, ácido salicílico, ácido fórmico e ácido propiônico. Há também, os compostos halogenados, como o bronopol, que apresenta baixa toxicidade e atividade contra bactérias, sendo muito utilizado em produtos cosméticos. Outros exemplos desta classe de conservantes são cloroacetamida, cloroxilenol, clorobutanol, clorfenesina, álcool diclorobenzílico butilcarbamato de iodopropinila e metildibromo glutaronitrilo (STEINBERG, 2006).

Atualmente os conservantes antimicrobianos disponíveis podem causar alguns efeitos adversos, incluindo irritação na pele, nos olhos e sensibilização de contato. De acordo com o *North American Contact Dermatitis Group*, os conservantes são o grupo de ingredientes mais comumente associados à irritação na pele pelo uso de cosméticos. Embora seja desejável eliminar os conservantes das formulações, a auto conservação desses produtos pode ser inalcançável para a maioria das formulações existentes tendo em vista suas atuais formas e embalagens.

Apesar de existir muitos conservantes no mercado, nenhum pode ser considerado um conservante ideal, ou seja, efetivo contra todas as bactérias e fungos, estável, solúvel e principalmente que não provoque alergias ou citotoxicidade. Os parabenos são atualmente os conservantes mais convenientes e de baixo custo, por isso são os mais amplamente utilizados em cosméticos. No entanto, existe um forte apelo pelos produtos “paraben free”, que inviabilizam a sua utilização. Assim, a busca por alternativas aos agentes conservantes já utilizados está longe de ser esgotada.

Infecções Cutâneas

A pele é o órgão mais acessível do corpo humano, sendo muito sujeito às infecções. Estas infecções apresentam grande diversidade de agentes etiológicos e podem ser classificadas em primárias ou secundárias, agudas ou crônicas e também, mono ou polimicrobianas (BRASIL, 2013).

As infecções primárias acometem cerca de 7% da população e não apresentam porta de entrada aparente, ou seja, afetam a pele normal e os microrganismos costumam entrar através de uma ruptura na pele. São causadas por um único agente patogênico, sendo os mais comuns *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. acnes* e estreptococos β -hemolíticos.

Por outro lado, as infecções secundárias são complicações de lesões, ocorrendo na pele que já está doente. Devido à doença subjacente, o quadro clínico deste tipo de infecção pode variar (BARON, 1996; PEREIRA et al., 2011).

De acordo com a duração da infecção, podem ser agudas durando apenas poucos dias ou crônicas, que duram meses ou anos. E por fim, são classificadas em mono ou polimicrobianas, ou seja, causadas por um único microrganismo ou por vários, respectivamente (BRASIL, 2013).

O advento da resistência a antimicrobianos emergiu como uma crise de proporção global no decorrer das últimas décadas. Microrganismos resistentes a um grande número de antimicrobianos clinicamente aprovados são cada vez mais comuns e estão se espalhando com facilidade entre os continentes. Este fenômeno representa uma ameaça à saúde pública, já que limita as opções para o tratamento das infecções bacterianas (SILVEIRA et al., 2006; WRIGHT, 2011). Ao lado disso, existem poucos novos agentes antimicrobianos surgindo no mercado (WRIGHT, 2011). Desta maneira, o desenvolvimento de novos fármacos, com a capacidade de contornar esses mecanismos de resistência, representa importante avanço na prática clínica.

A contaminação do produto cosmético pode resultar em infecções cutâneas e irritações, sendo então indispensável o uso de conservantes, reduzindo o risco de contaminação microbiana e garantindo que o produto permaneça adequado e seguro para a utilização pelos consumidores (PEREIRA et al., 2011; ABIHPEC, 2018).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi a avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana do AC a fim de utiliza-lo como um ativo multifuncional veiculado em micropartículas (MP) de quitosana de liberação controlada.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do ácido cafeico;
- Obter micropartículas de quitosana para liberação controlada do ácido cafeico pelo método de *Spray Drying*;
- Realizar a caracterização físico-química das micropartículas de quitosana;
- Incorporar as micropartículas de ácido cafeico em uma emulsão e uma preparação cosmética em filme para aplicação facial.
- Obter os perfis de liberação e permeação *in vitro* das micropartículas ácido cafeico a partir da emulsão e do filme.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Material

Ácido cafeico (Nanjing Zelang Medical Technology), trolox (Sigma Aldrich), ácido gálico (Sigma Aldrich), ácido ascórbico (Galena), radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) (Sigma Aldrich), radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) (Sigma-Aldrich), SOD determination Kit (Sigma-Aldrich), WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (Sigma Aldrich), solução taponante de pirofosfato de sódio (pH 8,3, 25 mmol/L), metassulfato de fenazina (PMS), azul de tetrazólio (NBT), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), solução taponante fosfato de sódio (120 mM) pH 7,0, crocina (Sigma Aldrich), dimetilsulfóxido (DMSO), AAPH (2,2'-azobis-(2-aminopropano), ácido hipocloroso (HOCl/OCl⁻), hipoclorito de sódio (NaOCl), hidróxido de sódio (NaOH) 10 mM, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), meio de cultura ágar TSA (Prolab), caldo TSB (Prolab), caldo reforçado para *Clostridium* (Prolab), revelador resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido) (Sigma Aldrich), quitosana peso molecular médio (Sigma Aldrich), ácido acético (Synth), Etanol (Neon), estearilamina (Sigma Aldrich), polissorbato 80, cetearyl alcohol, cetearth- 20, ethylhexyl stearate, glyceryl stearate, propylene glycol, disodium EDTA, methylparaben, propylparaben, sodium polyacrylate (Rapithix[®] A-100), sodium polyacrylate, hydrogenated polydecene, trideceth-6 (Rapithix[®] A-60), steareth 2, stearamidopropyl dimethylamine, PPG-5-ceteth-20, polysorbate 60, caprylic/capric triglyceride, phenoxyethanol/ ethylhexylglycerin, pullulan, hydroxyethylcellulose, C12-15 alquilbenzoate, hydroxypropyl methylcellulose, PEG-12 dimethicone, água destilada, água ultrapura, obtida por sistema Milli-Q[®] (Malsheim, França), etanol grau CLAE (Panreac) , solução tamponante de fosfato de sódio pH 7,4, solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5, metanol grau CLAE (J.T. Baker[®]); ácido acético (J.T. Baker[®], EUA) grau analítico. Placas estéreis de 96 poços para cultura celular (TPP), membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich). Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius[®]) para filtrar a fase móvel e membrana com poro de 0,45

μm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nagel[®], Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de AC padrão e amostra.

Equipamentos

Pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 μL , 100-1000 μL , 500-5000 μL (Eppendorf), centrífuga (Fanem-Baby), equipamento de permeação Microette (Hanson Research), ultra-som (Unique Ultrasonic Clear), estufa (Quimis), peagômetro digital (Gehaka PG 1800) e balança analítica (Bel Engineering). O sistema cromatográfico utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters[®], composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters[®], injetor manual Rheodyne Breeze[®] 7725i e detector de absorvância UV-VIS Waters[®] 2487; equipado com software Empower[®]. Foi utilizada coluna RP18 (Symmetry Shield, 4,6 x 250 mm, 5 μm , Waters). As soluções constituintes da fase móvel foram degaseificadas em ultrassom (Unique[®], Indaiatuba, Brasil). Espectrofotômetro Shimadzu modelo IR-Prestige 21 na espectroscopia de absorção na região do infravermelho, Espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - Vertex 70 da Bruker, Difração de Raios X (DRX), Siemens modelo D5000, Diffrac Plus XRD Commander, e o equipamento espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu[®], modelo UVmini-1240) para espectrofotometria na região do ultravioleta, Mini *Spray Dryer* (Buchi-191). Microscópio eletrônico de varredura de alta resolução S-4800 (Serial Number: HI-9269-0009). Mini *Spray Dryer* (Buchi-290). Espectrofotômetro (OceanOptics USB 4000) com agitação magnética e termostatização com peltier.

Métodos

4.1 Determinação do potencial antioxidante

A avaliação do potencial antioxidante do AC foi realizada através de vários métodos, dentre os que utilizaram radicais modelos: capacidade de captura sobre o DPPH[•] e capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}; e dentre os métodos que utilizaram radicais biológicos: Método enzimático de captura de ânion superóxido- Kit SOD Assay; capacidade de captura sobre o ânion radical superóxido; ensaio do clareamento (*Bleaching*) da crocina; captura do ácido hipocloroso e capacidade de captura sobre o H₂O₂.

Os experimentos foram realizados em triplicata e como padrões foram utilizados os reagentes trolox (análogo da vitamina E), ácido gálico e ácido ascórbico (Figura 7), compostos reconhecidamente com ação antioxidante (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

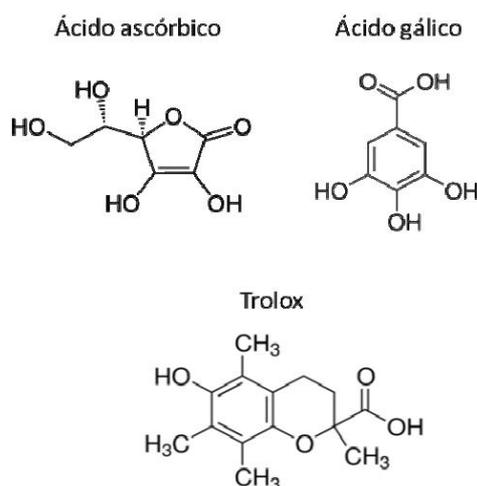


Figura 7. Estrutura química dos padrões utilizados nos ensaios de atividade antioxidante.

4.1.1 Capacidade de captura sobre o DPPH[•]

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]), segundo metodologia descrita por Blois (1958), Mensor et al. (2001) e Chiari et al. (2012).

Um mililitro da solução aquosa de AC, em diferentes concentrações (de 0 a 4,57 µg/mL), foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH[•]

(0,004%). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz e após 30 minutos foi determinada a absorvância das soluções a 515 nm.

Foram utilizadas soluções controle contendo apenas 1 mL de água e 2,5 mL da solução metanólica de DPPH[•] a 0,004%. A média das absorvâncias destas amostras foi usada como a absorvância máxima, servindo para o cálculo da porcentagem de captura do radical DPPH[•] (Equação 1) (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ captura do radical DPPH} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_{amostra}}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$ é a absorvância do DPPH[•] em 515 nm na ausência de amostra (controle).

$Abs_{amostra}$ é a absorvância do DPPH[•] em 515 nm na presença de amostra.

O ensaio do DPPH[•] para cada concentração foi realizado em triplicata.

A partir dos valores de concentrações utilizadas e os valores de porcentagem de captura foi possível obter uma curva analítica e calcular o valor de CE₅₀, concentração efetiva 50, ou seja, quantidade de ativo necessária para capturar 50% dos radicais DPPH[•] em solução. O mesmo procedimento foi realizado para o ácido ascórbico (nas concentrações de 0,0 a 7,0 µg/mL), para o ácido gálico (nas concentrações de 0,0 a 1,7 µg/mL) e para o trolox (nas concentrações de 0,0 a 9,15 µg/mL) como substâncias padrão. As concentrações testadas para cada substância foram diferentes devido à diferença entre o potencial antioxidante de cada uma delas.

4.1.2 Capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}

A atividade antioxidante do AC pelo método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) foi avaliada seguindo método proposto por Almeida et al. (2013).

O radical ABTS^{•+} é formado através de uma reação com persulfato de potássio. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de 7 mM de ABTS (192 mg diluídos em 50 mL de água) e outra solução estoque de 140 mM de persulfato de potássio (378,4 mg em 10 mL de água). Para a preparação do radical, misturou-se 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução estoque de persulfato de potássio. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente por 16 h em frasco âmbar. Decorrido este tempo, diluiu-se uma

alíquota desta mistura em etanol, a fim de obter absorvância de aproximadamente $0,7 \pm 0,05$. Em seguida, transferiu-se 3 mL dessa solução a 11 tubos de ensaio, aos quais foram acrescentados volumes crescentes de solução estoque de AC na concentração de 300 $\mu\text{g/mL}$ e volumes decrescentes de água, sendo que cada concentração foi realizada em triplicata. As quantidades das substâncias e as respectivas concentrações de AC no tubo estão representadas na Tabela 1. O mesmo experimento foi realizado substituindo o AC pelo trolox, ácido gálico e ácido ascórbico (AA).

Tabela 1. Composição dos reagentes para determinação da atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+}.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume solução estoque de AC (μL)	0	5	7	10	12	15	17	20	22	25	30
Volume água (μL)	30	25	23	20	18	15	13	10	8	5	0
Volume solução de ABTS ^{•+} (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Concentração final de AC ($\mu\text{g/mL}$)	0	0,49	0,69	0,99	1,18	1,48	1,68	1,98	2,17	2,47	2,97

Posteriormente, foram determinadas as absorvâncias a 734 nm de todas as soluções preparadas, visto que uma vez conhecida a absorvância, é possível calcular a porcentagem de captura do radical livre através da equação 2 (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ captura do radical ABTS} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_{amostra}}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$ é a absorvância do ABTS^{•+} em 734 nm na ausência de amostra (controle)

$Abs_{amostra}$ é a absorvância do ABTS^{•+} em 734 nm na presença de amostra

O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ácido ascórbico (concentrações de 0,0 a 3,5 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (concentrações de 0,0 a 1,35 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (concentrações de 0,0 a 9 $\mu\text{g/mL}$) como substâncias padrão.

4.1.3 Método enzimático de captura de ânion superóxido- Kit SOD Assay

A avaliação do potencial antioxidante pelo ensaio de captura dos ânions superóxido (*SOD-like activity*) foi realizado utilizando o SOD determination Kit

(Sigma-Aldrich). O ensaio foi realizado em placa de 96 poços conforme apresentado na Figura 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BRANCO 1			-----			BRANCO 3			-----		
B												
C												
D	AMOSTRA			BRANCO 2			AMOSTRA			BRANCO 2		
E												
F												
G												
H												

Figura 8. Esquema da placa utilizado no ensaio de atividade antioxidante pelo método de sequestro de ânions superóxido.

Inicialmente 20 μ L das soluções de amostras foram adicionadas nos poços correspondentes a AMOSTRA e BRANCO 2, sendo que em cada linha a concentração da amostra e do branco 2 eram as mesmas. Nos poços correspondentes ao BRANCO 1 e BRANCO 3 foram adicionados 20 μ L de água Mili-Q ao invés de amostra. Em seguida, em todos os poços da placa foram adicionados 200 μ L da solução de trabalho do WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt). A mistura foi agitada e, em seguida, adicionados 20 μ L de tampão de diluição nos poços correspondentes ao BRANCO 2 e BRANCO 3. Nos poços correspondentes ao BRANCO 1 e a AMOSTRA foram adicionados 20 μ L de solução de trabalho da enzima (xantina oxidase). A placa foi agitada e incubada a 37° C durante 20 minutos, em seguida os valores de absorbância foram obtidos em espectrofotômetro de placas a 450 nm. A porcentagem de captura foi calculada conforme a Equação 3.

$$\% \text{ captura} = \left\{ \frac{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}}) - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco2}})}{(A_{\text{branco1}} - A_{\text{branco3}})} \right\} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que, A_{branco1} , A_{branco2} , A_{branco3} e A_{amostra} são os valores de absorbância dos poços referentes ao BRANCO 1, BRANCO 2, BRANCO 3 AMOSTRA, respectivamente. A partir dos valores de porcentagem de captura e concentração de cada substância foram obtidas curvas analíticas para cada uma das amostras e o valor de CE_{50} foi calculado. As concentrações de AC

testadas variaram de 0,0 – 1,5 µg/mL. O ensaio também foi realizado para os padrões ácido ascórbico (0,0 – 40 µg/mL), ácido gálico (0,0 – 4,0 µg/mL) e trolox (0,0 – 100 µg/mL).

4.1.4 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido

O ensaio foi realizado em 150,0 µL de solução tamponante de pirofosfato de sódio (pH 8,3 – 25 mmol/L), diferentes volumes de amostra para obter concentrações variadas, 10,0 µL de metassulfato de fenazina (PMS) (372 µmol/L) e 25,0 µL de azul de tetrazólio (NBT) (600 µmol/L). A placa foi incubada por 2 minutos e, em seguida, foram adicionados 15,0 µL de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) (1560 µmol/L), seguidos de 2 minutos de incubação. Ao final, foi adicionada água destilada para completar o volume para 300,0 µL. As absorbâncias foram avaliadas, em espectrofotômetro de placas, em 560 nm, para determinação da quantidade de formazana gerada, uma vez que é proporcional à quantidade de ânion radical superóxido em solução, pois, é a partir da reação entre o ânion radical superóxido e o NBT, que a formazana é formada (HAZRA et al., 2008; ALVES et al., 2010).

A partir dos valores de absorbância obtidos foi calculada a porcentagem de captura do ânion superóxido. Uma curva analítica foi obtida e o valor de CE₅₀, quantidade de substância necessária para capturar 50% dos radicais em solução, foi determinado para cada substância avaliada.

Para o AC foram avaliadas concentrações de 0,0 a 60 µg/mL. O ensaio também foi realizado para os padrões, ácido ascórbico (0,0 – 60 µg/mL), ácido gálico (0,0 – 41 µg/mL) e trolox (0,0 – 950 µg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.1.5 Ensaio do Clareamento (*Bleaching*) da Crocina

O ensaio do clareamento da crocina foi realizado em tampão fosfato de sódio (120 mM) pH 7,0 sendo adicionados 24,4 µg/mL de crocina em dimetilsulfóxido (DMSO) e diferentes concentrações de AC (0,0 a 4,5 µg/mL) e padrões, ácido ascórbico (0,0 a 0,810 µg/mL), ácido gálico (0,0 a 4,17 µg/mL) e trolox (0,0 a 6,26 µg/mL) utilizando água destilada como solvente. Para o início da reação foi adicionada solução de AAPH (2,2'-azobis-(2-aminopropano) 12,5

mM preparada em solução tamponante de fosfato de sódio (120 mM) pH 7,0, sendo o volume final de reação de 2,0 mL. A reação foi monitorada em espectrofotômetro (OceanOptics USB 4000) em 443 nm, por 10 minutos, em temperatura de 40 ± 2 °C e agitação constante, sendo observada velocidade linear de clareamento da crocina após 1 minuto da adição do AAPH. Foi verificada a possível interferência das amostras realizando o ensaio na ausência de crocina (BORS et al., 1984).

4.1.6 Captura do ácido hipocloroso

Para a realização deste ensaio, o agente oxidante ácido hipocloroso (HOCl/OCl⁻) foi preparado a partir da diluição do hipoclorito de sódio (NaOCl) 12% em hidróxido de sódio (NaOH) 10 mM, a fim de determinar a concentração do OCl⁻, por espectrofotometria com o uso de seu coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 292 nm) (ZGLICZYŃSKI et al., 1971).

Em placas de 96 poços, foram adicionados 180,0 μL de solução tamponante de fosfato de sódio (50 mM) pH 7,4; 40,0 μL de amostra (para o teste) ou solvente (para o branco) e volume de HOCl para obter concentração de 30 μM no volume final de reação. O volume de HOCl foi determinado pelo cálculo do coeficiente de extinção molar. A placa foi incubada a temperatura ambiente, 25 ± 2 °C, em ausência de luz por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 60,0 μL de 3,3',5,5'- tetrametilbenzidina (TMB) (1,4 mM) e a placa foi incubada, novamente, por 5 minutos. A leitura foi realizada espectrofotometricamente, em 652 nm.

O ensaio foi realizado para o AC (de 0 a 1,68 $\mu\text{g/mL}$) e para os padrões ácido ascórbico (de 0,0 a 4,8 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (de 0,0 a 1,25 $\mu\text{g/mL}$) e trolox (de 0,0 a 8 $\mu\text{g/mL}$). O resultado foi expresso em porcentagem de captura de HOCl/OCl⁻ e o valor de CE_{50} foi calculado a partir da equação da reta. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.1.7 Capacidade de captura sobre o H₂O₂

Para a avaliação da capacidade de captura sobre o H₂O₂, o ácido 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB) foi preparado de acordo com Ching e colaboradores (1994). Após o preparo, a concentração da solução de TNB foi determinada, a partir do valor de absorção da solução em 412 nm, utilizando o coeficiente de

absortividade molar de $13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, neste comprimento de onda (CHING et al., 1994).

A solução estoque de H_2O_2 deve estar a 15 mM para que, ao adicionar no tubo, sua concentração seja de 0,3 mM. Desta forma, foi preparada a partir da diluição da solução a 30% e sua concentração foi aferida, espectrofotometricamente, em 230 nm ($\epsilon = 80 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (BRETEL, 1985).

O ensaio foi realizado em tampão fosfato (50 mM) pH 7,4 pela adição da amostra e 0,3 mM de H_2O_2 , com incubação a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado TNB (53 μM) e, novamente, houve incubação por 1 hora, a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 412 nm.

A partir dos valores de absorbância, foi calculada a porcentagem de captura do H_2O_2 através da inibição da oxidação do TNB com mesma equação utilizada para o cálculo da porcentagem de captura para o DPPH' (Equação 1, item 4.1.1).

O ensaio também foi realizado na presença de catalase como padrão da reação (de 0,0 a 0,8 U/mL), além do ácido ascórbico (até 78 $\mu\text{g/mL}$), ácido gálico (até 850 $\mu\text{g/mL}$), trolox (até 625 $\mu\text{g/mL}$) e o AC (até 1000 $\mu\text{g/mL}$). Os ensaios foram realizados em triplicata para cada uma das substâncias.

4.2. Determinação da atividade antimicrobiana

4.2.1. Preparo do inóculo

Foram utilizados meio de cultura ágar TSA, para a manutenção dos microrganismos e o caldo TSB para a execução dos ensaios. Os meios foram preparados conforme indicado pelos fabricantes em seus respectivos rótulos, sendo dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: $121 \text{ }^\circ\text{C}$, 1 atm) durante 15 minutos. Somente para *Propionibacterium acnes* foi utilizado caldo reforçado para *Clostridium* para a manutenção dos microrganismos e execução dos ensaios.

Foram utilizadas as cepas padrão: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 e *Propionibacterium acnes* ATCC 2592.

As culturas foram repicadas com alça de platina para caldo TSB e mantidas para seu desenvolvimento em estufa microbiológica a temperatura de

35°C ± 2°C, durante as 24 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% (aproximadamente 1,0 x 10⁸ UFC/mL). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:100 em TSB, obtendo-se uma suspensão de 1,0 x 10⁶ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

A cultura de *P. acnes* foi repicada com alça de platina para caldo reforçado para *Clostridium* e mantida para seu desenvolvimento em câmara de anaerobiose em estufa microbiológica à temperatura de 35°C ± 2°C, durante as 48 horas anteriores à realização do experimento. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% (aproximadamente 1,0 x 10⁸ UFC/mL). Posteriormente, foi realizada uma diluição 4:100 em Caldo Reforçado para *Clostridium*, obtendo-se uma suspensão de 4,0 x 10⁶ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios.

4.2.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

4.2.2.1. Realização do teste

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) para bactérias aeróbicas.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de água estéril. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções de AC e realizada a diluição seriada de 3000 a 1,46 µg/mL. Adicionalmente, foram distribuídos 100 µL das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas. Como controles positivos foram utilizados a cefazolina (100 µg/mL) para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. acnes* e aztreonam (100 µg/mL) para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano e o controle negativo (solventes).

O esquema do preparo das microplacas pode ser observado na Figura 9.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Controle do meio (água)	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controle cresc. bacteriano (negativo)	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controle solvente	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Antibiótico (controle positivo)	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 9. Esquema do preparo das microplacas.

As microplacas foram incubadas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata. Somente a microplaca de *P. acnes* foi incubada em câmara de anaerobiose em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

4.2.2.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de TSA. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após incubação as placas foram analisadas para a visualização do crescimento das bactérias.

4.2.2.3. Leitura com revelador

Foram realizadas leituras com 30 μL do revelador resazurina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que foi adicionado em cada orifício das microplacas nos testes com bactérias. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

4.3. Obtenção das micropartículas por *spray drying*

Para preparação de uma das micropartículas de quitosana, primeiramente foi preparada uma dispersão de quitosana peso molecular médio (Sigma Aldrich®) na concentração de 0,5% (m/v) em ácido acético 1% (v/v); esta solução foi diluída em etanol para obter concentração final de 0,1% de quitosana. Assim, a esta solução, acrescentou-se uma massa de ácido cafeico, equivalente a 30% do peso seco de quitosana utilizada para preparar a dispersão e 0,01% de estearilamina como agente estruturante (BARBASSA, 2014). A solução de 0,1% (m/v) de quitosana contendo ácido cafeico foi atomizada em equipamento *Mini Spray Dryer* Buchi-191 instalado no Laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara/SP. Os seguintes parâmetros foram programados no equipamento: temperatura de entrada de ar 85°C, fluxo da bomba de alimentação 30%, aspessor de 0,7 mm, fluxo de ar de atomização de 450NL/h, eficiência do aspirador de 90% e temperatura de saída de ar de 65°C (VENTURA et al., 2008; DESAI & PARK, 2005; SILVA-JUNIOR, 2005). Essas micropartículas obtidas a partir de uma dispersão hidroalcoólica foram denominadas MPI (Figura 10).

Para preparação do segundo tipo de micropartículas de quitosana, foi preparada uma solução de quitosana peso molecular médio (Sigma Aldrich®) na concentração de 0,5% (m/v) em ácido acético 1% (v/v). A esta solução, acrescentou-se uma massa de ácido cafeico, equivalente a 30% do peso seco de quitosana e 1% de polissorbato 80 para solubilização do AC na dispersão. A solução de 0,5% (m/v) de quitosana contendo ácido cafeico foi atomizada em equipamento *Mini Spray Dryer* BUCHI-290 localizado no Laboratório de Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España. Os seguintes parâmetros foram programados no equipamento: temperatura de entrada de ar 180°C, fluxo da bomba de alimentação 10%, aspessor de 0,7 mm, fluxo de ar de atomização de 450 NL/h, eficiência do aspirador de 90% e temperatura de saída de ar de 75°C. Essas micropartículas obtidas a partir de uma dispersão aquosa foram denominadas MPII (Figura 10).



Figura 10. Fluxograma representativo da obtenção da MPI e MP2.

A secagem desta solução de ativos + polímeros (1) para a formação das micropartículas ocorre quando a dispersão é bombeada (2) até o aspersor (3), formando microgotas que serão automaticamente transferidas para uma câmara de secagem (4), que apresenta uma temperatura superior àquela necessária para ebulir o solvente, fazendo-o, portanto, evaporar. As micropartículas são transferidas para o ciclone (6) e armazenadas no coletor (7), como ilustrado pela Figura 11.

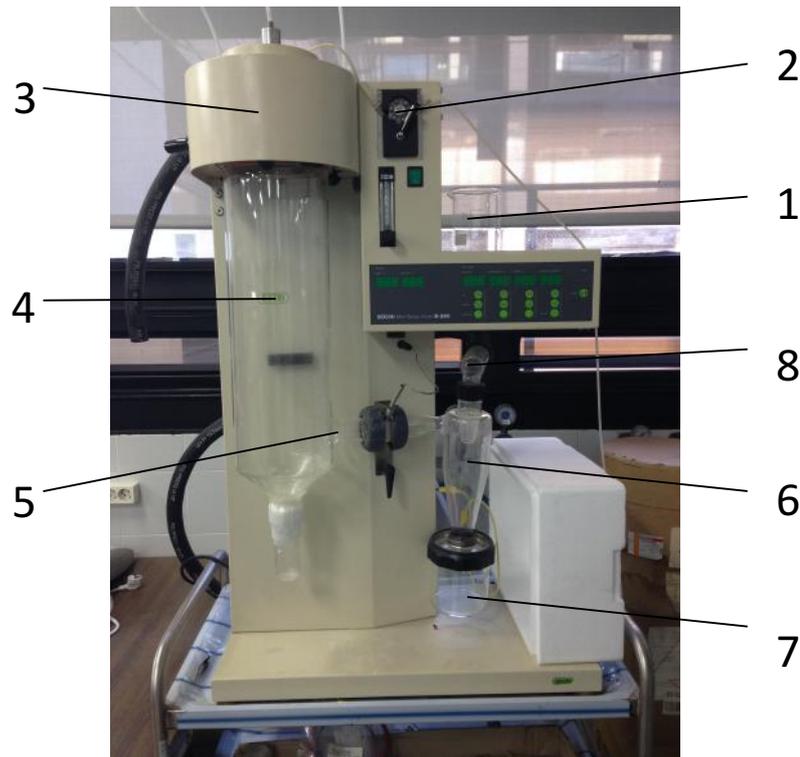


Figura 11. Mini *spray dryer* Buchi-191 e o esquema do processo de obtenção das micropartículas. Solução atomizada (1); bomba peristáltica (2); aspersor, formação das microgotas (3); câmara de secagem (4); saída de ar (5); ciclone (6); coletor (7) e aspirador (8).

O rendimento do processo foi calculado levando em conta a massa teórica das substâncias presentes na solução atomizada e a massa coletada após o processo de secagem.

4.4 Caracterização físico-química das micropartículas

As micropartículas obtidas foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia na região do infravermelho, difração de raios X, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial.

4.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das micropartículas foi analisada através de fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Alíquotas das micropartículas foram fixadas sobre fita dupla face de carbono (Figura 12) e recobertas com uma fina camada de ouro. As amostras foram

fotomicrografadas em aumentos variados e feixe de elétrons de 2.0 Kv utilizando microscópio eletrônico de varredura de alta resolução S-4800 (Serial Number: HI-9269-0009).



Figura 12. Preparação das micropartículas para Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução.

4.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

Foram obtidos os espectros de infravermelho do ácido cafeico, quitosana, estearilamina, mistura física I e II e micropartícula I e II. A mistura física foi preparada a partir de pesagem dos componentes de cada micropartícula na proporção 1:1:1 e homogeneização delicada com espátula. Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrômetro de absorção na região do infravermelho médio (Bruker), pertencente ao laboratório Multiusuário de Análises Químicas do Instituto de Química da UNESP de Araraquara. As análises foram realizadas na região espectral de 4000 a 400 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} .

4.4.3 Difração de raios-X

A análise por difração de raios X foi realizada em temperatura ambiente em difratômetro de raios X, sob radiação monocromática Cu-K α ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$). Para este ensaio, foram analisadas as amostras: ácido cafeico, quitosana, estearilamina, mistura física I, mistura física II e micropartícula I e II. As amostras foram analisadas com varredura de raios X de ângulo aberto 2θ entre 4° e 70° e velocidade do goniômetro de 0,05°/s.

Esse experimento foi realizado em equipamento multiusuários de Difração de Raios- X (DRX), marca Siemens modelo D5000, Diffrac Plus XRD Commander, instalado no Departamento de Físico-Química no Instituto de Química da UNESP de Araraquara.

4.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)/ Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

Para análise térmica das amostras foram utilizadas as técnicas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria/termogravimetria derivada (TG/DTG).

4.4.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A fim de verificar possíveis alterações na temperatura de transição vítrea da quitosana após o processo de obtenção das micropartículas, foram obtidas as curvas DSC do ativo puro, da quitosana, das micropartículas de quitosana contendo ácido cafeico e das respectivas misturas físicas ativo-polímero, na faixa de 25°C a 300°C, sob atmosfera de N₂ (50mL.min⁻¹), com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹, utilizando cadinhos de alumínio fechados contendo aproximadamente 5 mg de amostra. A célula de DSC foi calibrada antes dos experimentos utilizando padrão de índio. A análise de DSC foi realizada em um aparelho Mettler DSC 1 (Mettler Toledo, Gieben, Suíça) (CHADHA & BHANDARI, 2014).

4.4.4.2 Termogravimetria/ termogravimetria derivada (TG/DTG).

As curvas TG foram registradas no TA Instruments SDT 2960 (TG-DTA simultâneo) utilizando atmosfera de nitrogênio com vazão de 100 mL.min⁻¹, com taxa de aquecimento de 10° C.min⁻¹, a massa de amostra pesada foi de 5 mg. O equipamento foi calibrado com as mesmas condições de análise e utilizando o índio como padrão. As curvas foram registadas na faixa de temperatura de 25°C até 800°C.

4.4.5. Determinação do potencial zeta da dispersão de micropartículas

As micropartículas foram dispersas em água purificada e analisadas em triplicata. As medidas do potencial zeta das micropartículas foram determinadas usando analisador de partículas Malvern Instruments no Laboratório de Caracterização e análise de superfícies, Universidad de Valencia, España. Foram calculados os valores médios e os respectivos desvios padrões.

Além da carga superficial, essa técnica também foi utilizada para avaliar a distribuição de tamanho das micropartículas na dispersão.

4.4.6. Quantificação do AC nas micropartículas

Para quantificação do teor de AC nas micropartículas foi preparada uma dispersão de 1% da MPI e da MP11 em solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol (50:50), idêntica à utilizada nos estudos de liberação e permeação. Em seguida foi tomada uma alíquota de 100 μ L dessa dispersão, na qual foi adicionada 500 μ L de solução de ácido acético 0,1 M para solubilização da quitosana e 400 μ L de etanol para solubilização do AC contido nas micropartículas.

A concentração de AC nas soluções foi avaliada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando fase móvel composta por etanol: água purificada (40: 60, v/v), vazão 0,7 mL/min e pH da fase móvel de 2,5, coluna RP18 (Symmetry Shield, 4,6 x 250 mm, 5 μ m, Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm (SPAGNOL et al., 2015).

4.5. Desenvolvimento das formulações

4.5.1. Desenvolvimento do sistema emulsionado

Os constituintes das emulsões propostas para este estudo foram devidamente pesados em balança semi-analítica, em béqueres apropriados. As emulsões foram preparadas por mistura direta da fase aquosa aquecida a 70-80°C que foi vertida sobre a fase oleosa a 60-70°C, com agitação até completa homogeneização (CORREA, 1997; PRISTA, 2008).

As emulsões foram armazenadas em frasco opaco de dupla face, hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e do calor.

Inicialmente foi testada a formulação E1 apresentada na Tabela 2, proposta anteriormente por nosso grupo de pesquisa para veicular o ácido cafeico puro, quando ainda não disperso em uma matriz polimérica (SPAGNOL et al., 2017). Em seguida foi substituído o Sodium Polyacrylate (Rapithix[®] A-100) pelo Sodium Polyacrylate, Hydrogenated Polydecene, Trideceth-6 (Rapithix[®] A-60) mantendo a mesma porcentagem de 1,5% na formulação (E2).

Posteriormente o Sodium Polyacrylate foi removido da composição da formulação e diversas emulsões foram testadas, conforme apresentado na Tabela 3, variando a composição de Cetareth – 20 e Steareth 2.

Em seguida, foi testada uma emulsão catiônica e outras cinco formulações não-iônicas, variando o sistema tensoativo (Tabela 4).

A quarta etapa do desenvolvimento das emulsões consistiu de três emulsões, cujas composições estão apresentadas na Tabela 5.

Todas as formulações foram submetidas a centrifugação de 1800 rpm por 5 min para avaliação de separação ou não de fases.

Após todos os testes, a emulsão que mais se adequou para a proposta foi a E17 apresentada na Tabela 6 (SPAGNOL et al., 2018).

Tabela 2. Composição percentual e função dos componentes das emulsões inicialmente propostas.

Matéria-Prima	INCI name	Função	E1	E2
Álcool cetosteárilico	Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	4,0	4,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência	1,0	1,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	1,5	1,5
Álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo não-iônico	2,0	2,0
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante e solubilizante	3,0	3,0
EDTA dissódico	Disodium EDTA	Sequestrante	0,05	0,05
Metilparabeno	Methylparaben	Conservante antimicrobiano	0,18	0,18
Propilparabeno	Propylparaben	Conservante antimicrobiano	0,02	0,02
Rapithix A-100	Sodium Polyacrylate	Polímero hidrofílico espessante	1,5	-
Rapithix A-60	Sodium Polyacrylate, Hydrogenated Polydecene, Trideceth-6	Polímero hidrofílico espessante	-	1,5
Água q.s.p.	Water		100%	100%

Tabela 3. Composição percentual e função dos componentes das emulsões propostas na segunda etapa do desenvolvimento.

Matéria-Prima	INCI name	Função	E3	E4	E5	E6	E7
Álcool cetosteárilico	Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo não-iônico	1,0	-	0,5	0,75	0,25
Álcool Estearílico etoxilado 2 OE	Steareth 2	Tensoativo não-iônico	-	1,0	0,5	0,25	0,75
Glicerina	Glycerin	Umectante	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
EDTA dissódico	Disodium EDTA	Sequestrante	-	0,05	0,05	0,05	0,05
Metilparabeno	Methylparaben	Conservante antimicrobiano	-	0,18	0,18	0,18	0,18
Propilparabeno	Propylparaben	Conservante antimicrobiano	-	0,02	0,02	0,02	0,02
Água q.s.p.	Water		100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 4. Composição percentual das emulsões propostas e função dos componentes na terceira etapa do desenvolvimento.

Matéria-Prima	INCI name	Função	E8	E9	E10	E11	E12	E13
Álcool cetosteárilico	Cetearyl Alcohol	Consistência	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Consistência	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo	0,4	1,0	-	0,4	0,6	0,6
Estearamidopropil dimetilamina	Stearamidopropyl Dimethylamine	Tensoativo	2,5	-	-	-	-	-
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	PPG-5- Ceteth-20	Tensoativo	-	-	1,0	-	-	-
Álcool Estearílico etoxilado 2 OE	Steareth- 2	Tensoativo	-	-	-	0,6	0,4	-
Monolaurato de sorbitano etoxilado	Polysorbate 60	Tensoativo	-	-	-	-	-	0,4
Glicerina	Glycerin	Umectante	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
EDTA dissódico	Disodium EDTA	Sequestrante	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	Conservante	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ácido Láctico	Lactic Acid	Neutralizante	0,6	-	-	-	-	-
Água q.s.p.	Water		100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabela 5. Composição percentual das emulsões propostas e função dos componentes na quarta etapa do desenvolvimento.

Matéria-Prima	INCI name	Função	E14	E15	E16
Álcool cetosteárilico	Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	6,0	4,0	4,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência	3,0	3,0	3,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	3,0	3,0	-
Álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo	1,0	1,0	1,0
Estearamidopropil dimetilamina	Stearamidopropyl Dimethylamine	Tensoativo	2,5	-	-
Triglicérides do ácido cáprico/caprílico	Caprylic/Capric Triglyceride	Emoliente	-	-	3,0
Glicerina	Glycerin	Umectante	3,0	3,0	3,0
EDTA dissódico	Disodium EDTA	Sequestrante	0,1	0,1	0,1
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	Conservante antimicrobiano	0,5	0,5	0,5
Ácido Láctico	Lactic Acid	Neutralizante	0,6	-	-
Água q.s.p.	Water		100%	100%	100%

Tabela 6. Composição percentual e função dos componentes da emulsão escolhida para prosseguimento dos testes.

Matéria-Prima	INCI name	Função	E17
Álcool cetosteárico	Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	6,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência	3,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	3,0
Álcool cetosteárico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo	2,0
Glicerina	Glycerin	Umectante	3,0
EDTA dissódico	Disodium EDTA	Sequestrante	0,1
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	Conservante antimicrobiano	0,5
Água q.s.p.	Water		100%

4.5.2. Desenvolvimento de um sistema em filme

O primeiro Filme manipulado (F1), descrito na Tabela 7, foi patenteado pelo nosso grupo de pesquisa com a finalidade de incorporar o ácido cafeico na sua forma livre, não encapsulado (SPAGNOL et al., 2017b). Tendo em vista a incompatibilidade dessa formulação com os constituintes das micropartículas, novas formulações foram testadas, sendo a F6 a formulação escolhida para incorporação das micropartículas.

Tabela 7. Composição percentual e função dos componentes da formulação em filme proposta.

Matéria-prima	INCI name	Função	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Pullulan®	Pullulan	Agente filmógeno	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Rapithix A-100	Sodium Polyacrylate	Agente geleificante	1,0	-	-	-	-	-
Rapithix A-60	Sodium Polyacrylate, Hydrogenated Polydecene, Trideceth-6	Agente geleificante	-	1,0	-	-	-	-
Hidroxietilcelulose	Hydroxyethylcellulose	Agente geleificante	-	-	1,0	1,0	-	-
Benzoato de alquila C12-C15	C12-15 Alquilbenzoate	Emoliente	-	-	-	1,0	-	-
Álcool cetílico etoxilado e propoxilado	PPG-5- Ceteth-20	Tensoativo	-	-	-	-	1,0	-
Hidroxipropil Metilcelulose	Hydroxypropyl Methylcellulose	Agente geleificante						1,0
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante/solubilizante	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Dimeticona	PEG-12 Dimethicone	Emoliente e Umectante	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	Conservante antimicrobiano	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Água q.s.p.	Water		100%	100%	100%	100%	100%	100%

4.6. Avaliação do perfil de liberação *in vitro*

4.6.1 Estabilidade do AC na solução receptora

A estabilidade do AC foi avaliada em três tipos de soluções receptoras, solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 + etanol (50:50); solução tamponante de fosfato de sódio pH 7,4 + etanol (50:50); água + etanol (50:50) ao longo de 336 h a fim de escolher a solução receptora mais adequada para realização dos testes de liberação *in vitro*.

As soluções tamponantes foram preparadas partindo de uma solução de 11,87g de fosfato de sódio monobásico (Na_2HPO_4) em 1000mL de água miliQ (solução A) e de uma solução de 9,073g de fosfato de sódio dibásico (NaH_2PO_4) em 1000 mL de água miliQ (solução B). Para o preparo da solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5, tomou-se uma alíquota de 4 mL da solução A e 96 mL da solução B. Já para a solução tamponante de fosfato de sódio pH 7,4 a proporção foi de 80,3 mL da solução A e 19,7 mL da solução B. Em ambos, o ajuste do pH foi realizado, quando necessário, com ácido fosfórico ou hidróxido de sódio (MELERO, 2009).

Após o preparo das soluções tamponantes, elas foram acrescidas de etanol na proporção 50:50 e AC ($40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A concentração de AC nas soluções foi avaliada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando fase móvel composta por etanol: água purificada (40: 60, v/v), vazão 0,7 mL/min e pH da fase móvel de 2,5, coluna RP18 (Symmetry Shield, 4,6 x 250 mm, 5 μm , Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm (SPAGNOL et al., 2015).

4.6.2. Estudo de liberação

A avaliação da liberação do AC foi efetuada de acordo com metodologia descrita por Marquele et al. (2006) e OECD (2004). Os ensaios de liberação foram desenvolvidos utilizando células de Franz com área de difusão de 1,77 cm^2 e membrana de celulose (Sigma-Aldrich). Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España.

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 12 mL de solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol

(50:50). Amostras de 1 mL da dispersão, emulsão e filme contendo micropartículas a 0,5% de AC foram dispostas sobre a membrana. A solubilidade do ativo na solução receptora foi testada para garantir *sink conditions*.

Amostras de 200 µL foram coletadas após 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 26, 28, 30, 32, 48, 50, 52, 54, 56, 72, 74, 76, 78, 80, 96, 98, 100, 102 e 104 horas. O mesmo volume de solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol (50:50) foi substituído na fase receptora após amostragem.

A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a $32 \pm 1^\circ \text{C}$ por meio de um banho de aquecimento. A avaliação da quantidade de AC liberada da formulação foi realizada durante 104 h, aproximadamente cinco dias.

Os experimentos foram conduzidos em sextuplicata para cada tempo. A quantificação foi realizada em triplicata por CLAE pelo método descrito anteriormente no item 4.6.1.

A análise dos mecanismos de liberação dos ativos foi determinada através da aplicação gráfica de regressões não-lineares, baseadas em modelos matemáticos, e da análise estatística dos resultados, através dos coeficientes de correlação e determinação ajustados, utilizando-se software gráfico (SigmaPlot v12).

4.7. Avaliação da permeação *in vitro* do AC

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España. Os experimentos de permeação foram realizados em amostras de pele humana abdominal, obtidas a partir de correções cirúrgicas mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidad de Valencia, España sob Protocolo H1462978691586 (Anexo I).

O consentimento foi previamente obtido pelos pacientes. A sua identidade foi omitida para os investigadores para garantir seu anonimato. O excesso de gordura e tecidos conjuntivos foram removidos e as amostras foram armazenadas em congelador a -26°C por menos de três meses. Membranas epidérmicas foram preparadas pela técnica *heat-separation*. Após

a pele ser imersa em água a 60°C durante 90 s, a epiderme foi cuidadosamente separada da derme subjacente (MELERO et al., 2008).

Os estudos de permeação *in vitro* foram conduzidos usando células de vidro do tipo Franz com uma área disponível de difusão de 1,76 cm² e 12 mL de volume da célula receptora colocada em aquecimento / módulo de agitação. As peças de pele foram montadas sobre as células de difusão com o lado do estrato córneo em contato com o compartimento doador e o lado dérmico no compartimento receptor; elas foram equilibradas durante 1 h, e, em seguida, as bolhas de ar foram removidas para fora da célula de difusão. A fase receptora foi solução tampão fosfato (pH 5,5) com etanol (50:50). Posteriormente, amostras de 300 mg da emulsão ou filme foram dispostas sobre a membrana. A solubilidade do ativo na solução receptora foi testada para garantir *sink conditions*. Em seguida as células foram cobertas com parafilme para evitar a evaporação.

Também foram realizados três controles em solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol (50:50), sendo que o primeiro controle era apenas com ácido cafeico; o segundo utilizou solução de ácido cafeico e quitosana; e o terceiro, solução de ácido cafeico, quitosana e polysorbate 80. Todos os controles continham AC a 5 mg/mL.

As amostras foram retiradas em intervalos específicos de tempo do compartimento receptor seguida por substituição com solução receptora.

A concentração de ácido cafeico nas amostras foi determinada por CLAE pelo método descrito anteriormente no item 4.6.1. Os resultados de concentração de AC permeado *versus* tempo foram plotados e foram analisados os parâmetros: J: Fluxo do permeante através da epiderme; Kp: coeficiente de permeabilidade; TI: tempo de latência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do potencial antioxidante

Os ácidos fenólicos estão amplamente presentes no reino vegetal. Eles contêm um grupamento orgânico ácido carboxílico e um anel aromático. Os ácidos fenólicos podem ser classificados em derivados do ácido cinâmico (ex. ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido cafeico) e os derivados do ácido benzoico (ex. ácido gálico, ácido hidroxibenzoico e ácido salicílico) (LAFAY & IZQUIERDO, 2008).

Para avaliar a atividade antioxidante do ácido cafeico de forma mais detalhada do que a apresentada pela literatura científica, foram selecionados três padrões com atividade antioxidante amplamente conhecida: o ácido gálico, um composto fenólico derivado do ácido benzoico com potente ação antioxidante; o ácido ascórbico, que é uma vitamina hidrossolúvel muito empregada em produtos cosméticos antioxidantes; e o trolox, derivado hidrossolúvel da vitamina E, amplamente utilizado em testes como padrão antioxidante.

A avaliação da atividade antioxidante do AC foi realizada empregando diferentes radicais, sendo o DPPH[•], o ABTS^{•+} (radicais modelo) e outras espécies reativas radicalares e não radicalares de ocorrência em sistemas biológicos.

Recentemente, a indústria cosmética e os pesquisadores têm procurado utilizar experimentos *in vitro*, em substituição a modelos animais, para o desenvolvimento de testes de eficácia e segurança de matérias-primas cosméticas, bem como as formulações cosméticas. As questões éticas envolvidas para escolha dos testes ainda não estão muito bem definidas e portanto, cabe ao pesquisador o discernimento sobre a escolha dos testes *in vitro* mais adequados.

5.1.1 Capacidade de captura sobre o DPPH[•]

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•]) é um radical livre estável e disponível comercialmente. Quando em sua forma oxidada, este radical apresenta um elétron desemparelhado no átomo de nitrogênio que está

conjugado ao anel aromático. Desta forma, apresenta coloração violeta e é absorvido em 515 nm (BORGUINI, 2006; CHEN et al., 2016).

Ao entrar em contato com substâncias com capacidade antioxidante e receber um átomo de hidrogênio, o radical DPPH[•] é reduzido e a conjugação entre o átomo de nitrogênio e o anel aromático é diminuída. Desta forma, a capacidade de absorção em 515 nm também é reduzida, sendo observada, visualmente, pela mudança de coloração da solução, de violeta para amarelo claro (Figura 13) e verificada pela diminuição da absorbância em 515 nm, em espectrofotômetro (PRIOR et al., 2005; BORGUINI, 2006).

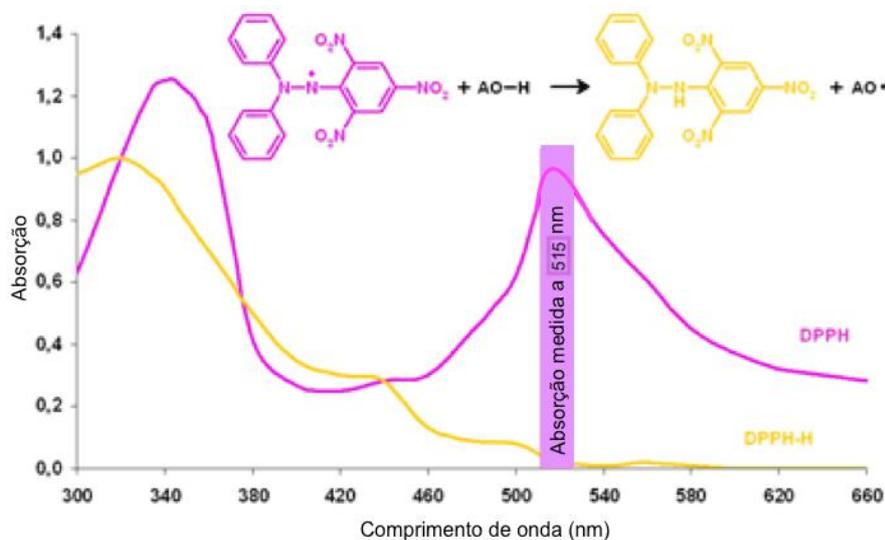


Figura 13. Esquema representativo da reação entre o radical DPPH[•] e antioxidantes.

(Fonte: adaptado de Oliveira, 2015)

Desta forma, é possível afirmar que a redução dos valores de absorbância das soluções avaliadas em 515 nm (comprimento de onda de máxima absorção da coloração violeta) está diretamente relacionada ao aumento da capacidade antioxidante das substâncias testadas, pois são capazes de reduzir o radical DPPH[•] ao doarem um hidrogênio ou elétron ao radical (PEREZ-GREGORIO et al., 2011).

Além disso, o radical DPPH[•] pode ser utilizado para avaliação do potencial antioxidante de substâncias hidrossolúveis e lipossolúveis, uma vantagem que faz deste radical a primeira escolha em testes de triagem (CHEN et al., 2016).

As Figuras 14 a 17 apresentam o perfil de captura do radical DPPH[•] pelos padrões trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e do ativo em estudo, o AC.

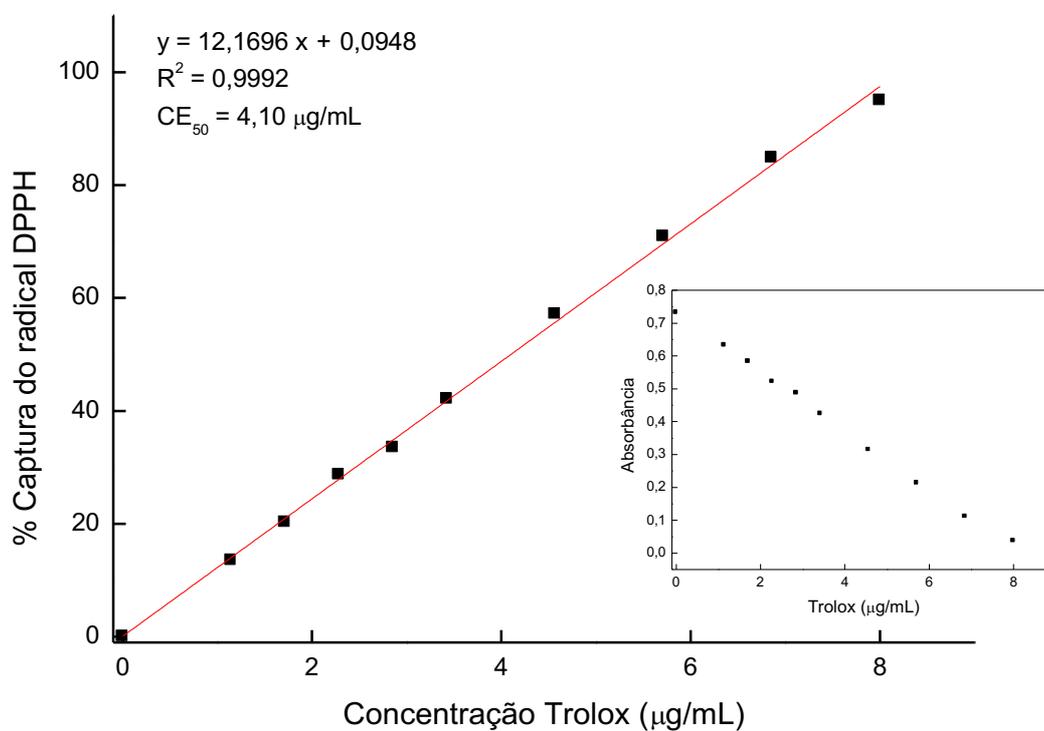


Figura 14. Perfil de captura do radical DPPH[•] pelo trolox.

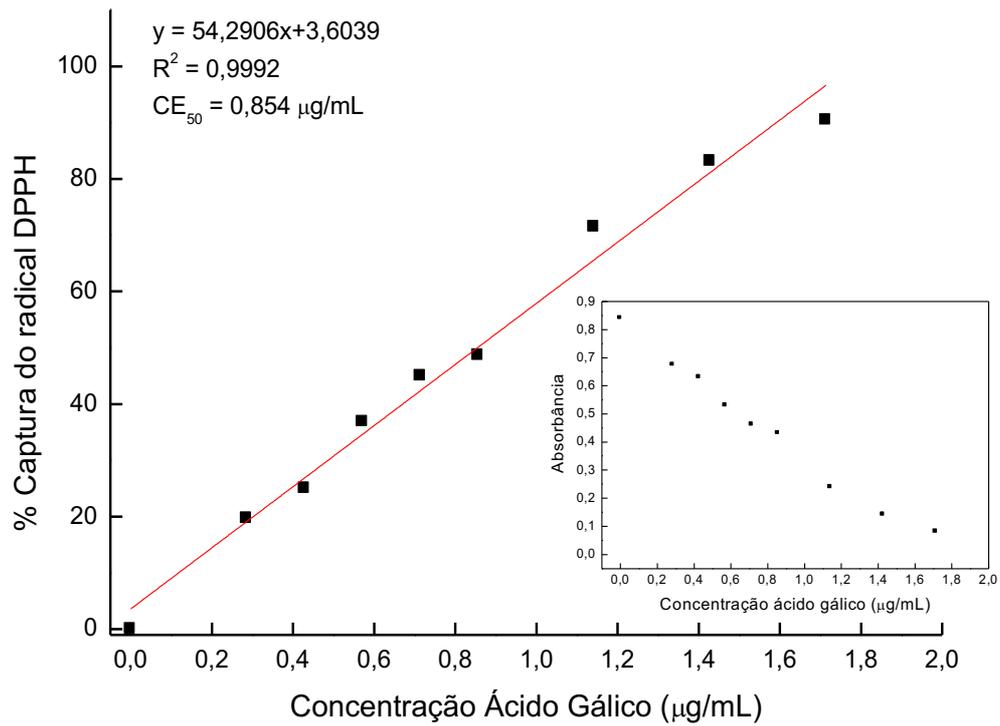


Figura 15. Perfil de captura do radical DPPH^{*} pelo ácido gálico.

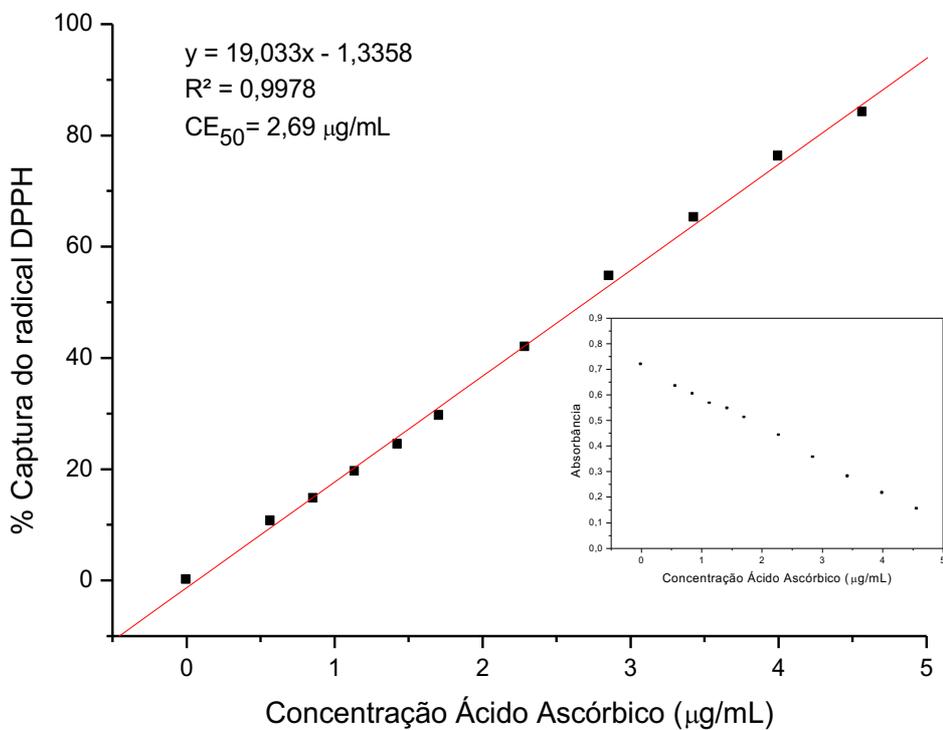


Figura 16. Perfil de captura do radical DPPH^{*} pelo ácido ascórbico.

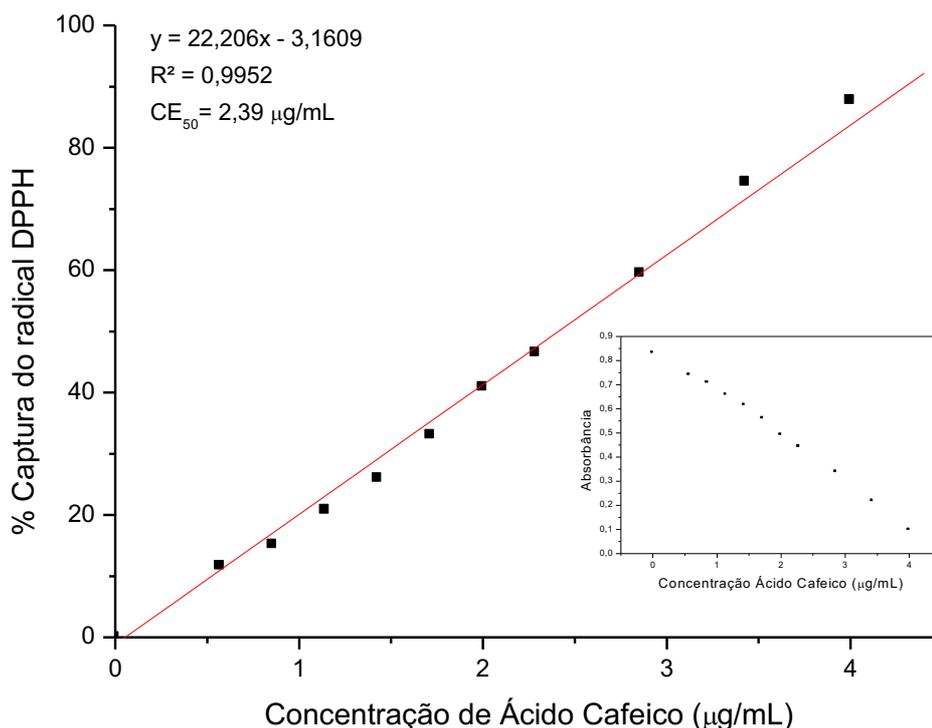


Figura 17. Perfil de captura do radical DPPH^{*} pelo ácido cafeico.

Nas Figuras de 14 a 17 pode-se observar que o AC e os demais analitos atingiram o CE_{50} para o DPPH^{*}, cujos valores apresentaram-se entre 0,5 a 5 $\mu\text{g/mL}$.

A partir das concentrações de amostras avaliadas, foi possível obter a faixa de linearidade, onde há proporcionalidade entre o aumento da concentração e porcentagem de captura do radical DPPH^{*}. Desta forma, foi realizada a regressão linear, para obtenção da equação da reta. Com estas equações, foi possível calcular a quantidade de amostra necessária para capturar (neutralizar) 50% dos radicais presentes em solução (CE_{50}). Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 8 e mostram que o ácido gálico foi o padrão com atividade antioxidante mais pronunciada. Logo em seguida veio o ácido cafeico, o ácido ascórbico e, por fim, o trolox.

Tabela 8. Valores de CE₅₀ para o AC e padrões pelo método de captura do radical DPPH[•].

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL) (média) DPPH [•]
Trolox	4,10 ^a
Ácido ascórbico	2,69 ^b
Ácido cafeico	2,39 ^c
Ácido gálico	0,85 ^d

a,b,c,d: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Wang e Yang (2012) encontraram que o AC, ácido ascórbico e BHT, todos na concentração de 20 µg/mL, neutralizaram 92,1%, 93,0% e 37,9% do radical DPPH[•], respectivamente.

Um estudo realizado por Maurya e Devasagayam (2010) revelou um aumento da absorção a 517 nm no ensaio do DPPH[•], indicando que a presença do grupo -CH=CH-COOH do AC pode ser responsável por formar complexos com DPPH[•] que absorvem nessa região e aumentam a sua concentração efetiva nos testes.

Tsai et al. (2012) avaliaram a atividade antioxidante de flores de *Echinacea purpurea* e encontraram que a capacidade de captura do DPPH[•] aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração dos extratos hidro alcoólicos. Comparando a capacidade de neutralização do DPPH[•] pelo extrato com os padrões, eles encontraram a ordem decrescente: ácido ascórbico > BHA > extrato da flor > α-tocoferol. A capacidade de captura do radical pelo extrato de *E. purpurea* pode ser atribuída à presença dos derivados de ácido cafeico, especialmente ácido cíclico com dois grupos hidroxila adjacentes ao anel aromático (PELLATI et al., 2004). A ordem de potência dos derivados de ácido contra os radicais DPPH[•] foi o seguinte: equinacósido > ácido cíclico > cinarina > ácido clorogênico > ácido cafeico > ácido caftárico.

Outro estudo comparou a atividade antioxidante do AC apenas com o ácido *p*-cumárico e foi encontrado que o AC apresenta uma capacidade inferior de captura de radicais DPPH[•] (MASEK et al., 2016).

O teste DPPH[•] é um método confiável para determinar a capacidade antioxidante de substâncias. A atividade de eliminação de radicais DPPH[•] é geralmente quantificada em termos de percentagem de neutralização do radical

livre pré-formado por antioxidantes e a CE_{50} (concentração necessária para obter um efeito antioxidante a 50%) é um parâmetro normalmente utilizado para expressar a capacidade antioxidante e para comparar a atividade de diferentes compostos. Como consequência, a determinação da CE_{50} torna-se bastante problemática dependendo dos modelos de regressão utilizados. Assim, um estudo realizado por Chen et al. (2013) empregou seis programas computacionais e quatro modelos de regressão diferentes para estimar o valor CE_{50} , utilizando vários antioxidantes naturais padrão. Neste estudo, a abordagem comparativa encontrada entre a potência antioxidante dos padrões foi: quercetina > ácido clorogênico > catequina > ácido cafeico > ácido ascórbico > acetilcisteína.

Nenhum dos trabalhos encontrados na literatura apresenta os mesmos padrões utilizados neste estudo para realização de uma abordagem comparativa. No entanto, em todos eles, a atividade antioxidante do AC é superior à do ácido ascórbico perante o DPPH^{*}, assim como foi encontrado nos resultados desta pesquisa.

Diante de tantos resultados discrepantes e a ausência de um protocolo específico para avaliação da atividade antioxidante de amostras, é que se faz necessária a utilização de diversos métodos analíticos empregando uma gama variada de padrões para efeito comparativo, de forma a oferecer dados cada vez mais fidedignos à literatura científica.

5.1.2 Capacidade de captura sobre o ABTS^{•+}

O ABTS^{•+} foi formado em solução aquosa *in vitro*, a partir do sal de ABTS (*2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt*), que reage com persulfato de potássio, dando origem ao radical. Este radical é um cromóforo e apresenta picos de absorção em 645 nm, 734 nm e 815 nm, sendo mais comumente utilizado para sua quantificação em 734 nm (PRIOR & CAO, 1999; RE et al., 1999).

Neste ensaio, o ABTS^{•+} na sua forma oxidada apresenta coloração verde e, após a adição de substâncias antioxidantes, se torna incolor na forma reduzida (Figura 18). Desta maneira, há maior decréscimo de absorbância em

734 nm e a coloração fica mais clara à medida que a concentração do antioxidante aumenta (Figura 19).

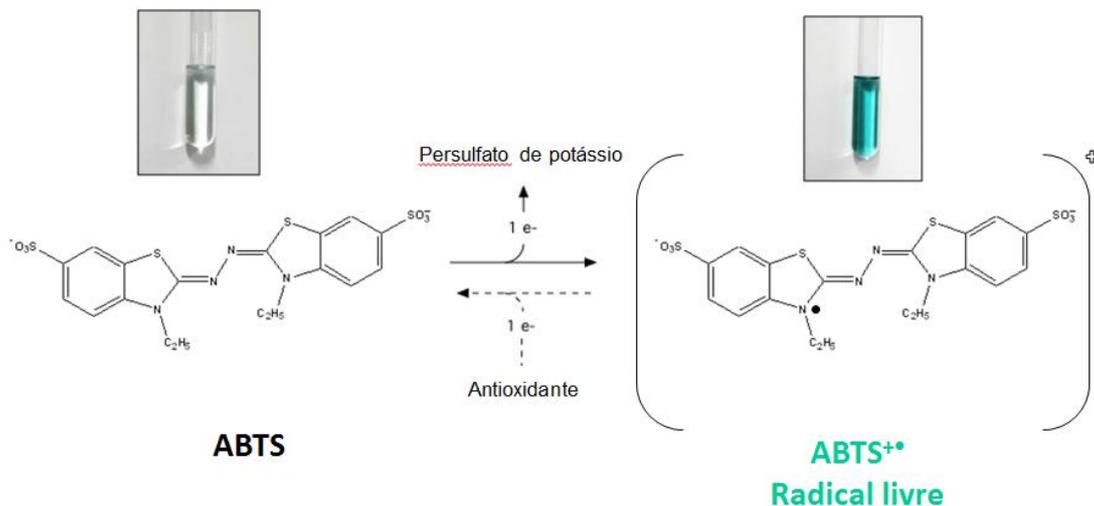


Figura 18. Esquema representativo da reação entre o radical ABTS^{•+} e antioxidantes.

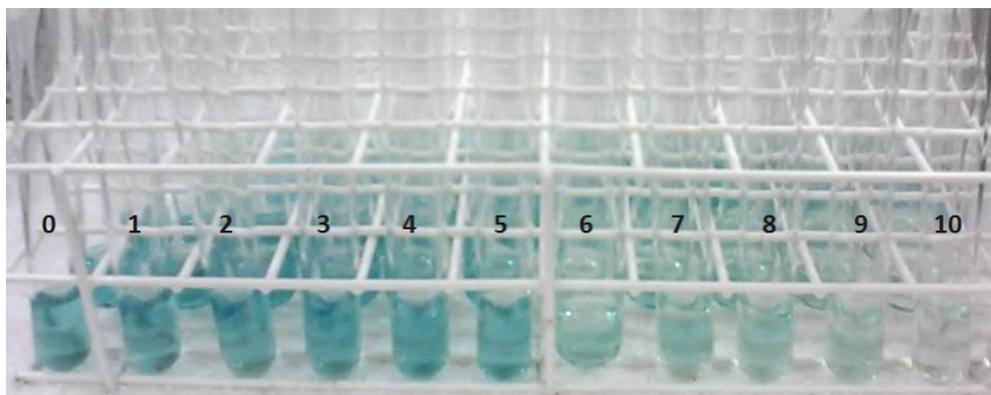


Figura 19. Tubos reacionais para obtenção da curva analítica da capacidade de captura sobre o ABTS^{•+} do AC em concentração de 0 a 2,97 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Com os resultados obtidos, foi possível construir um gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS^{•+} em função da concentração do antioxidante. As Figuras 20 a 23 apresentam o perfil de captura do radical ABTS^{•+} pelos padrões trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e do ativo em estudo, o AC.

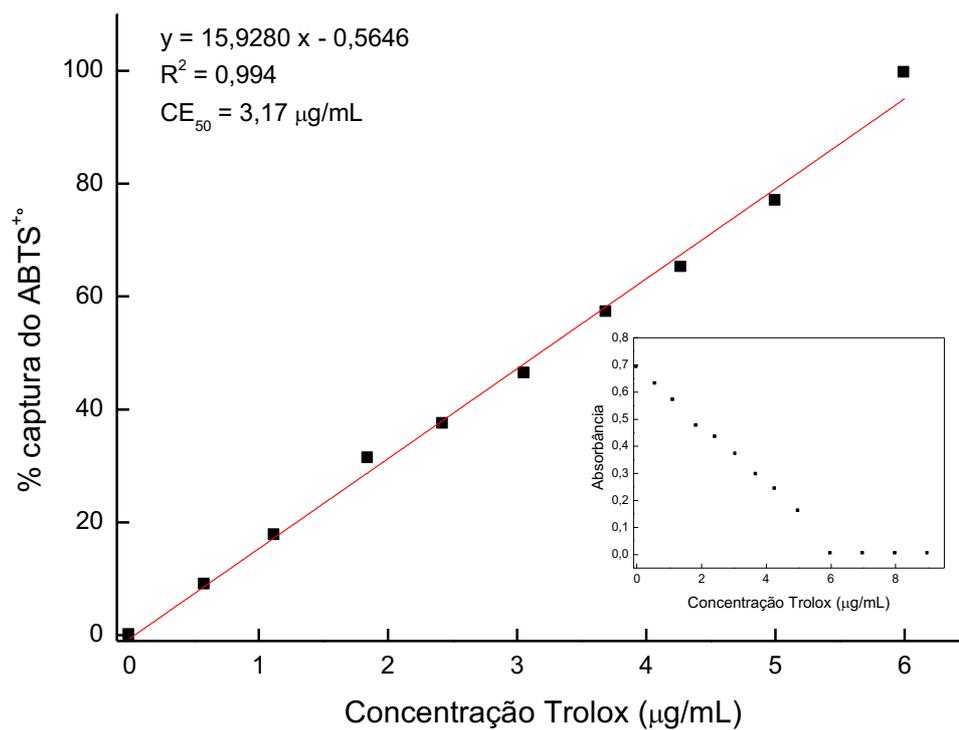


Figura 20. Perfil de captura do ABTS⁺⁺ pelo trolox.

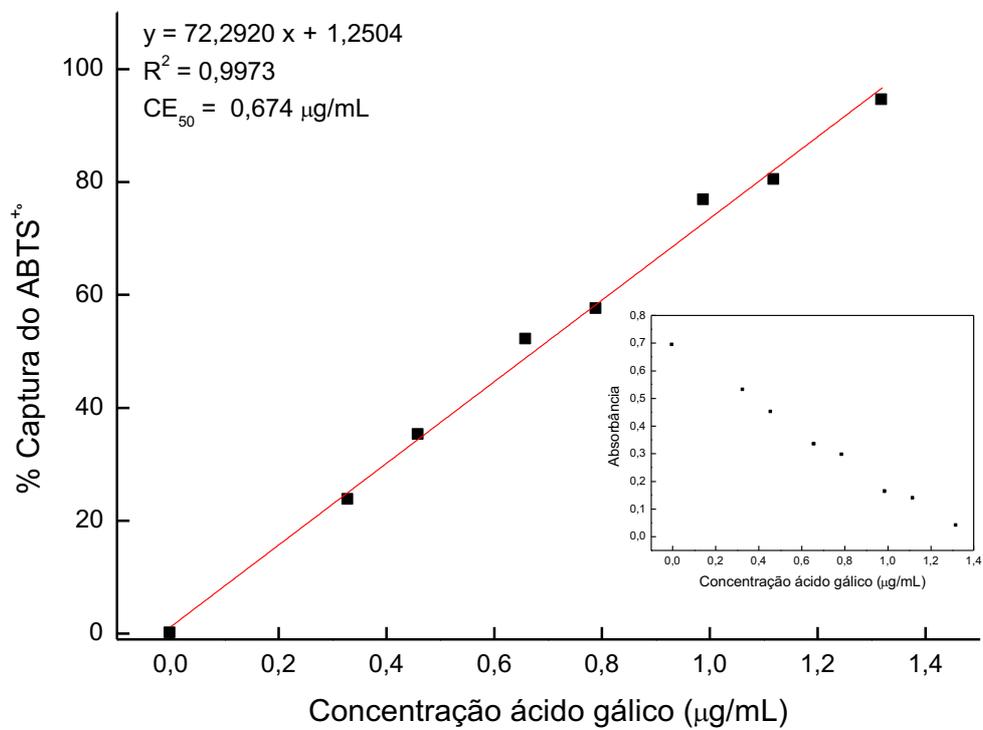


Figura 21. Perfil de captura do ABTS⁺⁺ pelo ácido gálico.

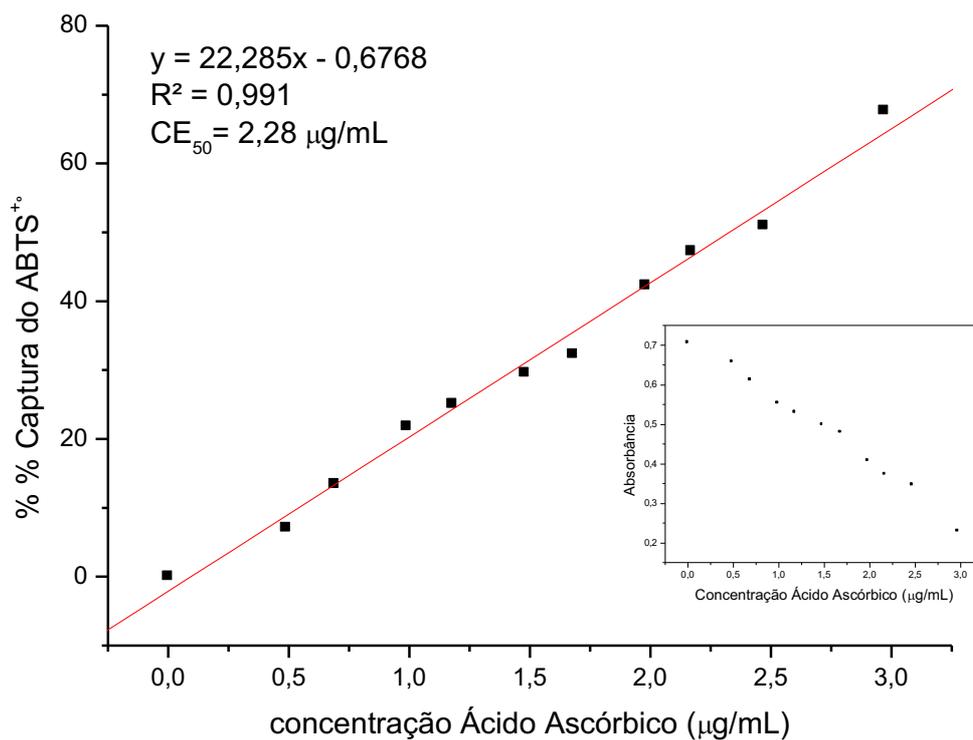


Figura 22. Perfil de captura do ABTS⁺ pelo ácido ascórbico.

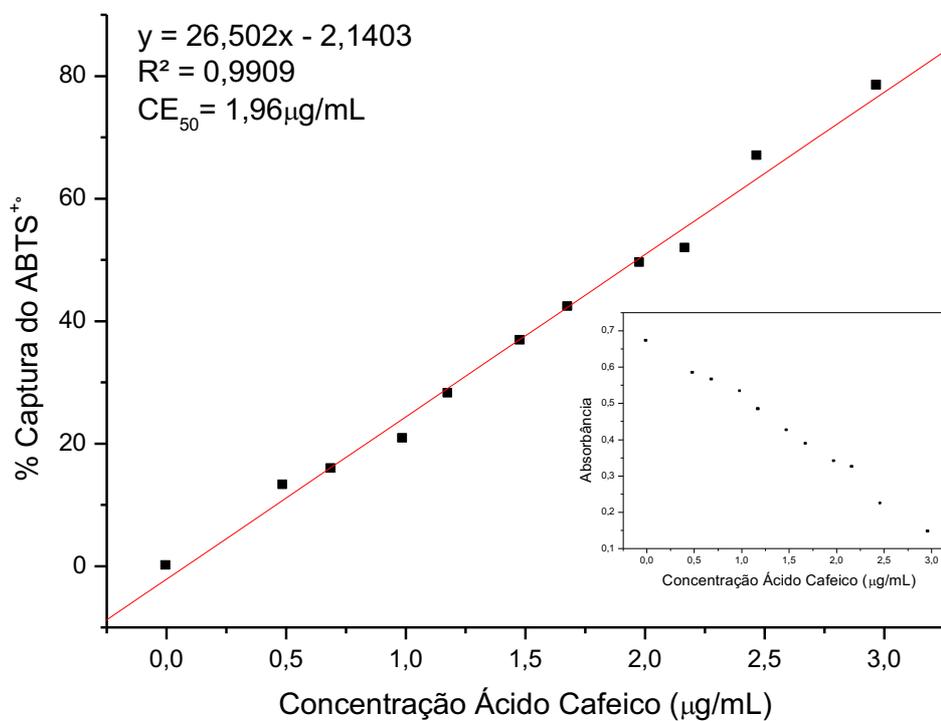


Figura 23. Perfil de captura do ABTS⁺ pelo ácido cafeico.

Os valores em CE_{50} apresentados nas Figuras 20 a 23 foram elencados na Tabela 9 e mostram que o ácido gálico foi o padrão com atividade antioxidante mais pronunciada, seguido do ácido cafeico, ácido ascórbico e por fim o trolox.

Tabela 9. Valores de CE_{50} para o AC e padrões pelo método de captura do radical $ABTS^{*+}$.

Amostra	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média) $ABTS^{*+}$
Trolox	3,17 ^a
Ácido ascórbico	2,28 ^b
Ácido cafeico	1,96 ^c
Ácido gálico	0,67 ^d

a,b,c,d: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes

Ambos os métodos (captura do $DPPH^{\bullet}$ e captura do $ABTS^{*+}$) são baseados em reações de óxido-redução, analisadas espectrofotometricamente, sendo a principal diferença entre eles o potencial redox que faz com que a coloração dos radicais seja diferente. Este fato também está ligado à diferença entre as estruturas químicas (Figura 24) (ALMEIDA et al., 2013).

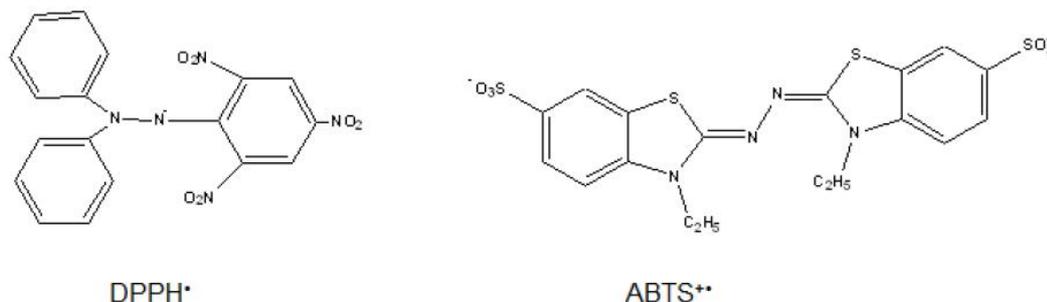


Figura 24. Estrutura química do $DPPH^{\bullet}$ e do $ABTS^{*+}$.

(Fonte: ALMEIDA et al., 2013)

Nem sempre os resultados verificados entre os métodos que utilizam diferentes radicais são os mesmos, o que deixa cada vez mais evidente que a estrutura química do radical e da substância antioxidante pode estar diretamente relacionada ao mecanismo de ação antioxidante, devido ao impedimento estérico que, tanto a estrutura do radical quanto a estrutura da substância antioxidante, podem proporcionar facilitando ou dificultando a

reação entre eles (PRIOR & CAO, 1999; ARNAO, 2000; OKONOGI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2013).

A carga de cada radical também pode estar relacionada com a diferença entre os valores de CE_{50} para cada um dos ensaios realizados, pois o DPPH \cdot é uma estrutura eletricamente neutra, enquanto o ABTS $^{++}$ apresenta carga positiva podendo facilitar a reação com substâncias que tenham afinidade elétrica pelo radical.

O elétron desemparelhado do ABTS $^{++}$ está nas extremidades da molécula em conjugação com o anel aromático, sendo possível observar esta conjugação em ambos os lados da molécula, enquanto, no DPPH \cdot , o elétron não pareado está no átomo de nitrogênio do grupo azo, no centro da molécula, sendo mais difícil para as moléculas com estruturas químicas maiores reagirem com o DPPH \cdot do que com o ABTS $^{++}$, devido ao impedimento estérico (OKONOGI et al., 2007; ALMEIDA et al., 2013) e, por isso, é esperado que os valores de CE_{50} obtidos pelo método de captura do DPPH \cdot sejam maiores do que os obtidos pelo método de captura do ABTS $^{++}$, conforme observado nos ensaios realizados (Tabelas 8 e 9).

5.1.3 Método enzimático de captura de ânion radical superóxido- *Kit SOD Assay*

O ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o primeiro radical livre, da sequência das espécies reativas de oxigênio, formado através de processos metabólicos, na membrana interna da mitocôndria, pela aquisição de um elétron e, é a partir dele, que podem ser geradas outras espécies reativas; por exemplo, por promover a redução de Fe^{3+} a Fe^{2+} , através da reação de Haber-Weiss, ocasionam a formação do radical hidroxila que é mais reativo em relação ao ânion radical superóxido (BARREIROS et al., 2006; VALDIVIA et al., 2009).

O aumento de espécies reativas de oxigênio pode promover aumento de eventos patogênicos à saúde humana e animal, pois podem ocasionar danos celulares e teciduais. Além disso, os danos causados pelo ânion radical superóxido podem estar associados ao aumento de doenças neurodegenerativas, cânceres e inflamações (VALDIVIA et al., 2009).

O organismo humano contém uma família de enzimas da qual a superóxido dismutase (SOD) faz parte. A SOD é responsável por catalisar a reação de conversão do ânion superóxido a H_2O_2 e O_2 , uma vez que a reação de decomposição, que ocorre naturalmente, é de segunda ordem e necessita da colisão entre duas moléculas do radical. Desta forma, sem a presença da SOD é preciso uma maior concentração do $\text{O}_2^{\cdot-}$ para ocorrer a conversão espontânea. A SOD atua mesmo em baixas concentrações, favorecendo a dismutação do radical ânion superóxido (TAINER et al., 1983; BARREIROS et al., 2006).

Este teste tem como princípio verificar se a substância avaliada é capaz de apresentar atividade antioxidante semelhante à enzima superóxido dismutase (SOD) que transforma o ânion radical superóxido em O_2 e H_2O_2 que por sua vez é transformado em O_2 e água pela enzima catalase (BARREIROS et al., 2006; FUKAI & USHIO-FUKAI, 2011; BORTOLINI, 2012; HALLIWELL, 2012), impedindo a ação do ânion radical superóxido, no organismo.

Neste ensaio, a xantina oxidase age sobre a xantina, que transforma o oxigênio molecular em $\text{O}_2^{\cdot-}$. O radical formado, em meio aquoso, reage com o sal de tetrazólio (corante WST-1) formando um cromóforo, a formazana, solúvel em água e de cor amarela (Figura 25). Na presença de AC ou dos padrões ácido ascórbico, ácido gálico e trolox é possível avaliar a capacidade de atuar como a SOD e assim capturar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Desta forma, não ocorre a formação da formazana, sendo observado um decréscimo na absorbância.

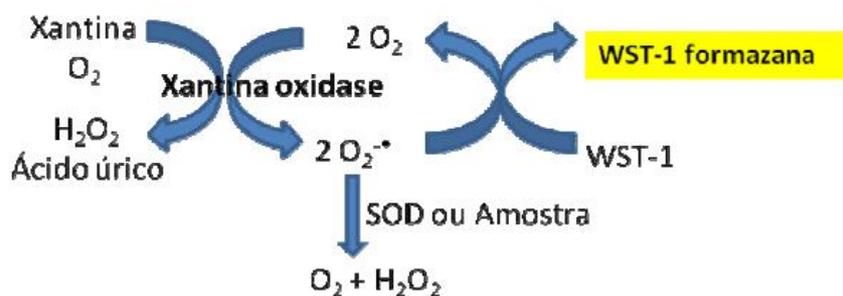


Figura 25. Representação esquemática da reação na qual o antioxidante atua como a SOD.

As Figuras 26 a 29 apresentam o perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelos padrões trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e do ativo em estudo, o AC.

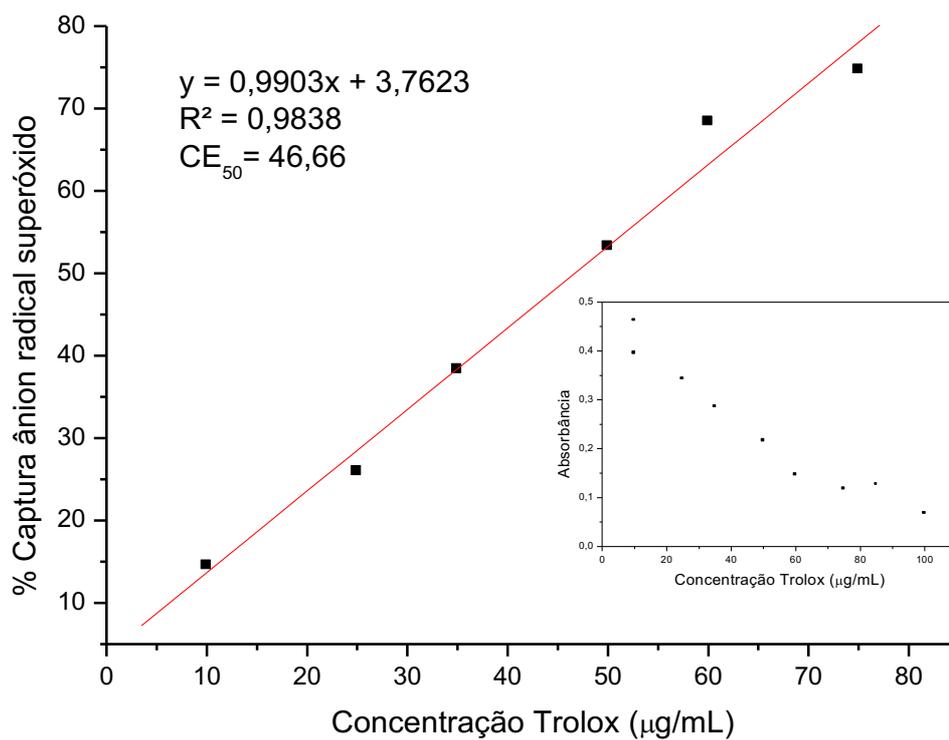


Figura 26. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo trolox (SOD-like activity).

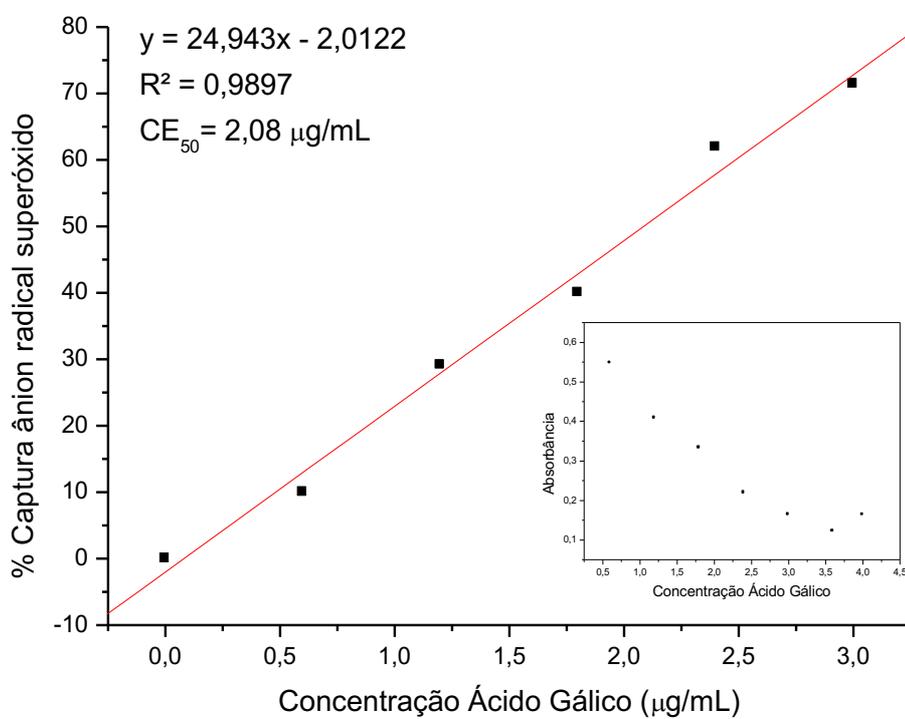


Figura 27. Perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ pelo ácido gálico (SOD-like activity).

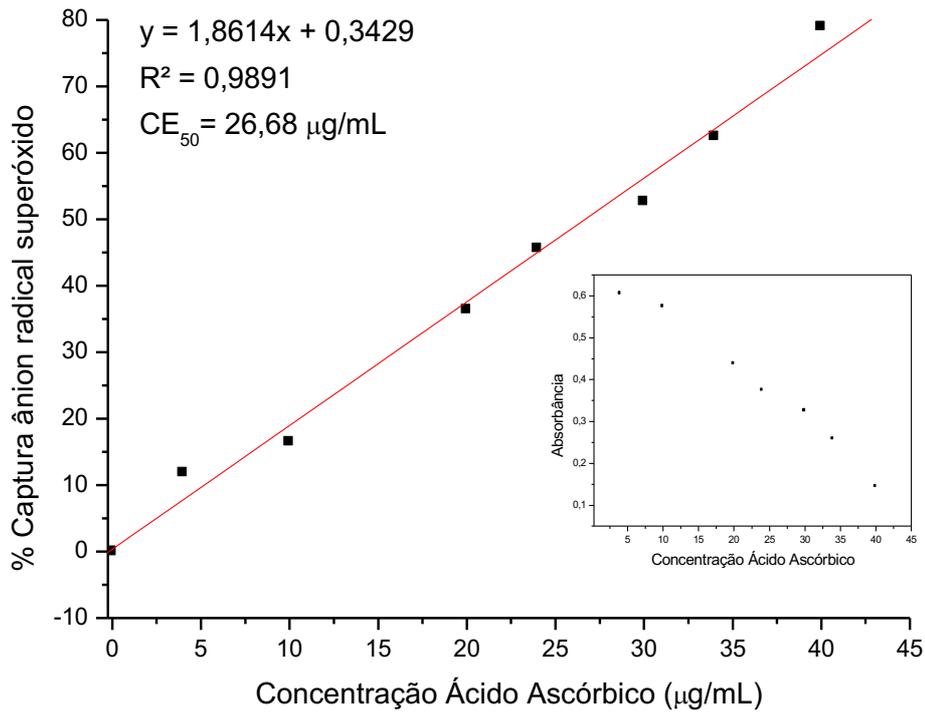


Figura 28. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido ascórbico (SOD-like activity).

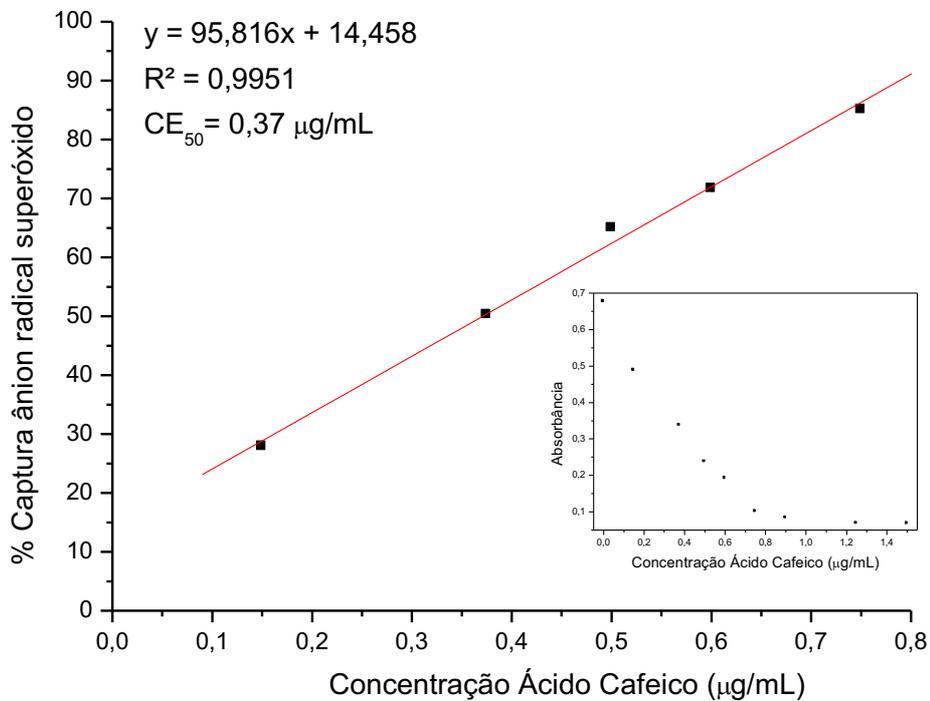


Figura 29. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido cafeico (SOD-like activity).

Pelos valores em CE_{50} do AC e dos padrões para a captura do ânion superóxido (Figuras 26 a 29 e Tabela 10), se observa a seguinte ordem crescente de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$): AC < ácido gálico < ácido ascórbico < trolox, o que representa uma ordem decrescente na eficiência para a captura do ânion superóxido. Assim, foi possível ressaltar que, frente ao radical ânion superóxido, o AC foi o composto que apresentou melhor atividade antioxidante em comparação com os padrões estudados.

Tabela 10. Valores de CE_{50} para o AC e padrões método de captura do $O_2^{\cdot-}$ (SOD-like activity).

Amostra	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média) SOD
Trolox	46,66 ^a
Ácido ascórbico	26,68 ^b
Ácido gálico	2,08 ^c
Ácido cafeico	0,37 ^d

Os resultados obtidos foram bastante interessantes, pois o AC foi capaz de atuar frente a radicais modelo e frente ao ânion radical superóxido, que é um radical endógeno. Além disso, analisando a capacidade de captura do ânion radical superóxido, o ácido cafeico apresentou a menor CE dentre todos os padrões, demonstrando atividade antioxidante 26 vezes maior que o ácido ascórbico que é considerado um potente antioxidante, sendo utilizado inclusive por via oral e tópica como tal.

5.1.4 Capacidade de captura sobre o Ânion Radical Superóxido

Além do sequestro de $O_2^{\cdot-}$ que avalia a atividade como a SOD, existe outra metodologia que pode ser empregada com a finalidade de verificar o sequestro de ânion radical superóxido. Neste caso, é verificada a capacidade da substância em sequestrar o $O_2^{\cdot-}$, gerado em solução, pela reação entre metassulfato de fenazina (PMS) e nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH). Nesta reação, o $O_2^{\cdot-}$ formado reage com o azul de nitrotetrazólio (NBT) que é, então, reduzido, gerando formazana, cuja intensidade da densidade óptica é proporcional à concentração de radical formado. Quando

uma substância antioxidante capaz de sequestrar o $O_2^{\cdot-}$ está presente na mistura reacional, a quantidade de formazana formada é menor ou até mesmo inexistente, pois o $O_2^{\cdot-}$ é sequestrado pela substância, não estando disponível para reação. Desta forma, quanto maior o potencial antioxidante da substância avaliada, mais baixa é a intensidade de cor produzida (KAKKAR et al., 1984).

A Figura 30 representa a formação do ânion radical superóxido e sua reação com o NBT na ausência e presença de antioxidante.

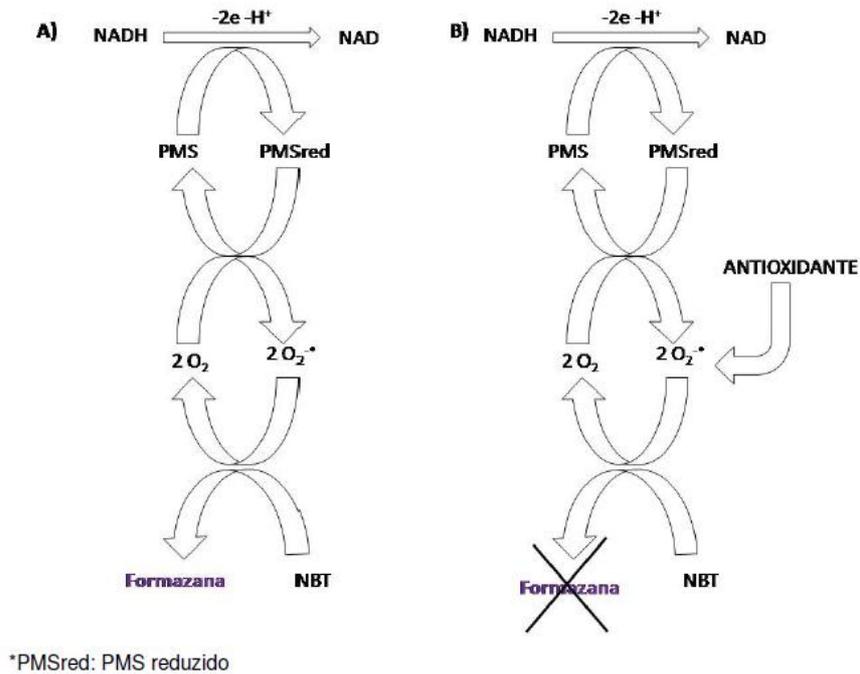


Figura 30. Representação esquemática da formação do $O_2^{\cdot-}$ *in vitro* e a reação com NBT na ausência (A) e presença de antioxidantes (B).

Neste ensaio, o AC foi testado em concentrações crescentes. Para este teste também foi utilizado o trolox, ácido gálico e ácido ascórbico como padrões. O perfil de captura do $O_2^{\cdot-}$ para as referidas substâncias está apresentado nas Figura 31 a Figura 34.

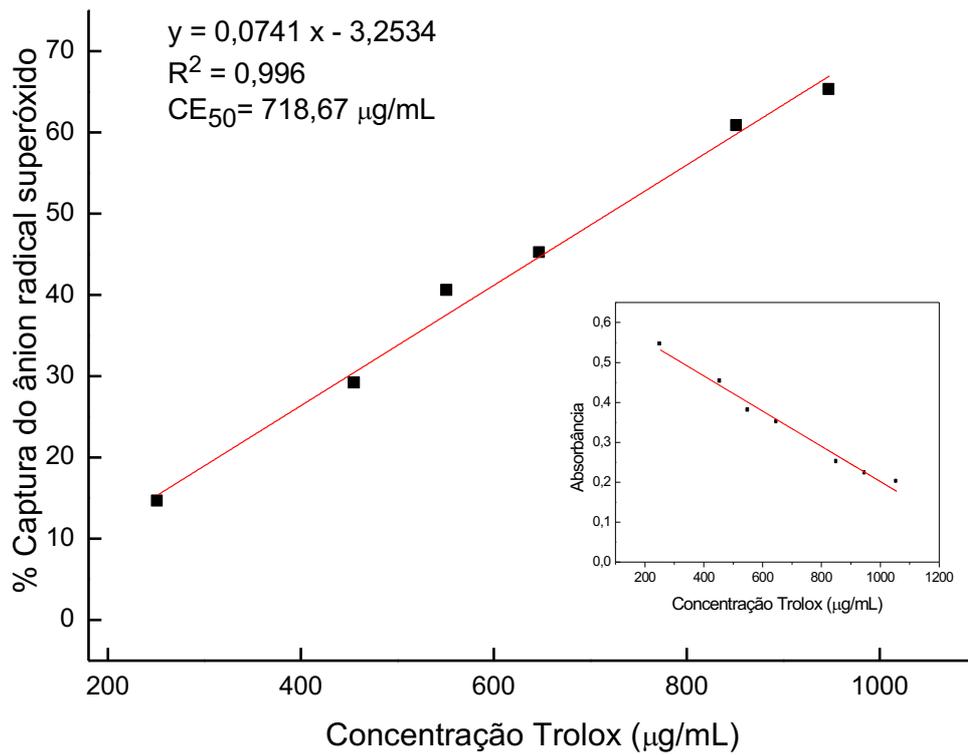


Figura 31. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo trolox.

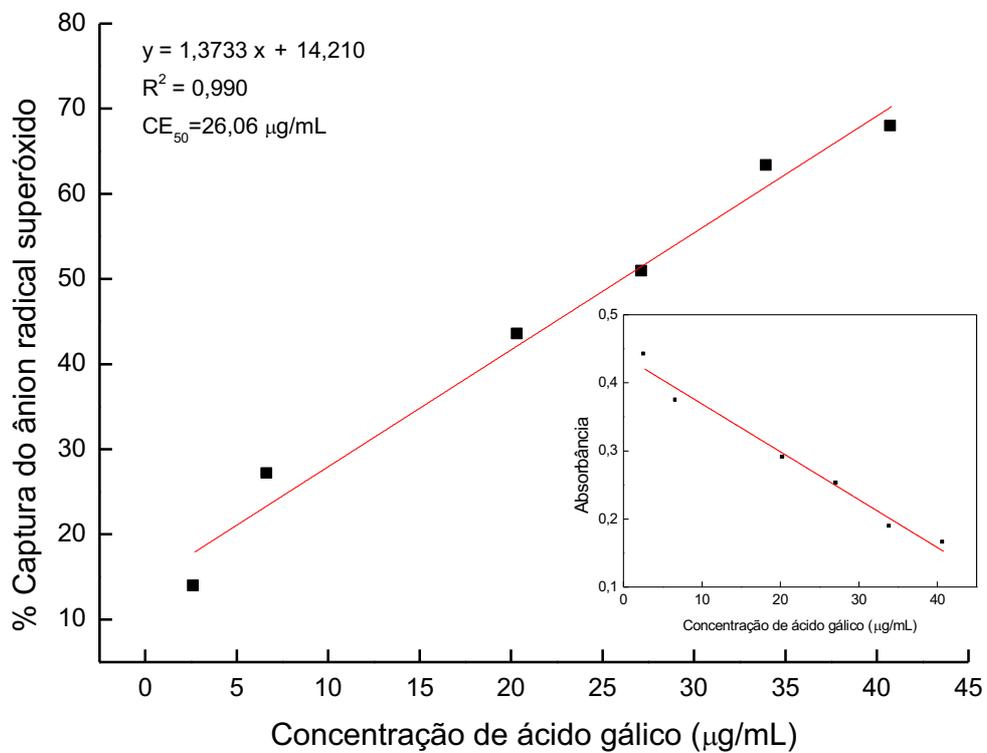


Figura 32. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido gálico.

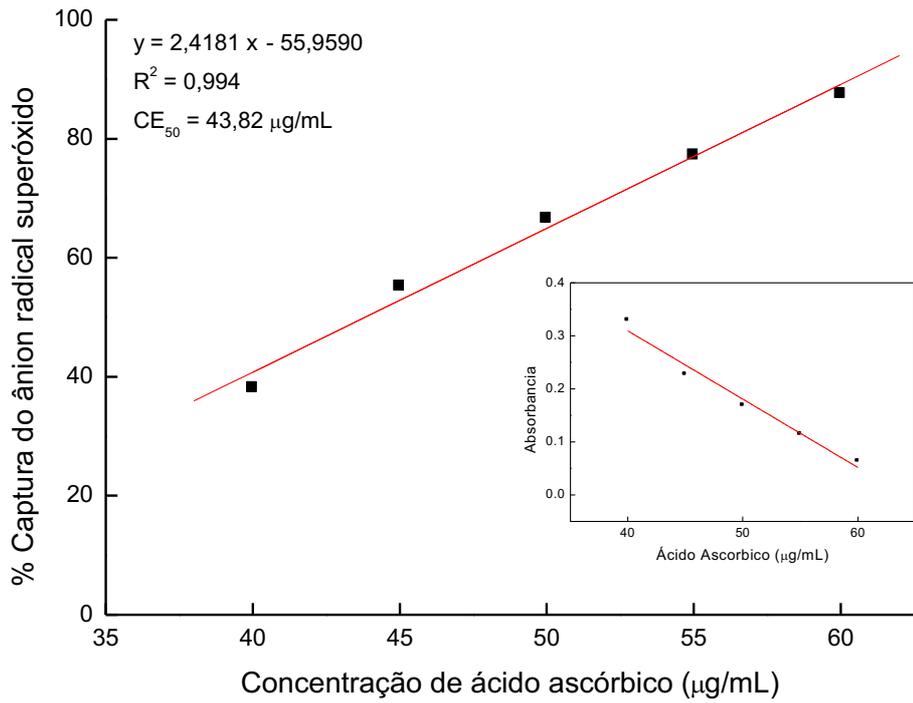


Figura 33. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido ascórbico.

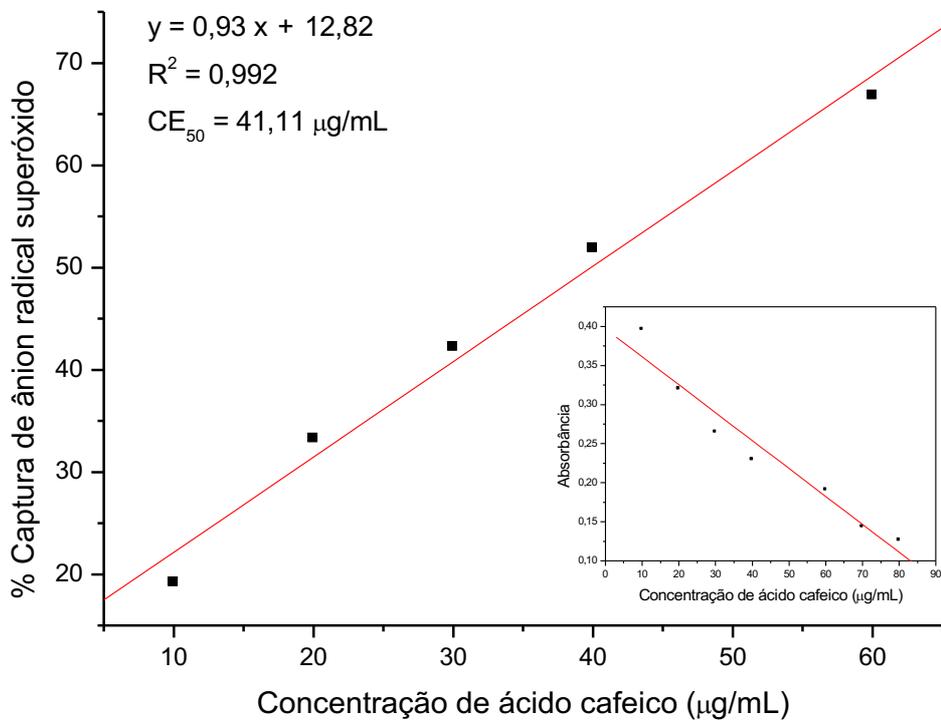


Figura 34. Perfil de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$ pelo ácido cafeico.

A partir dos resultados obtidos nas Figuras Figura 31 a Figura 34 foi possível realizar a regressão linear e, com a equação que descreve o comportamento dos pontos experimentais, calcular os valores de CE_{50} (Tabela 11). As maiores capacidades antioxidante foram: ácido gálico > AC > ácido ascórbico > trolox.

Tabela 11. Valores de CE_{50} para o AC e padrões método de captura do $O_2^{\cdot-}$.

Amostra	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média) Superóxido
Trolox	718,67 ^a
Ácido ascórbico	43,82 ^b
Ácido cafeico	41,11 ^b
Ácido gálico	26,06 ^c

Analisando os dados apresentados na Tabela 11 foi possível verificar que a quantidade de AC necessária para capturar 50% dos radicais foi aproximadamente duas vezes maior que a de ácido gálico, no entanto, o potencial antioxidante do AC e ácido ascórbico podem ser considerados iguais, estatisticamente.

Em comparação ao trolox, a atividade antioxidante do AC pode ser considerada aproximadamente 17 vezes maior. Uma possível explicação para a atividade reduzida do trolox em relação às demais substâncias, é que todos os compostos apresentam mais de uma hidroxila, enquanto o trolox apresenta somente uma (Figura 7), sendo esse grupamento responsável por conferir atividade antioxidante. Além disso, o grupamento hidroxila do trolox está cercado por duas metoxilas no anel aromático da molécula, conferindo impedimento estérico.

Kumaran e Prince (2010) não compararam a capacidade de captura do AC com outros compostos, no entanto observaram que ela é diretamente proporcional à concentração de AC no meio reacional.

Nimse e Pal (2015) realizaram uma revisão bibliográfica sobre diversos radicais livres, antioxidantes naturais e seus mecanismos de ação antioxidante. Eles relacionaram o sistema PMS/NADH-NBT como adequado para avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos e descrevem que podem ser

usados como controles positivos: ácido gálico, BHA, trolox, ácido ascórbico, α -tocoferol e curcumina.

5.1.5 Ensaio do Clareamento (*Bleaching*) da Crocina

As biomembranas, compostas de bicamadas de fosfolipídios, são os principais alvos de ataque dos radicais, sofrem lipoperoxidação (LPO), que uma vez ocorrendo de maneira descontrolada causa perda de sua estrutura e funcionalidade. Essa LPO, por sua vez, é responsável pela etiologia de muitas doenças e por isso, tem-se estimulado estudos que abordem a eficácia e mecanismos de ação dos antioxidantes de ocorrência biológica (LÚCIO et al., 2009), o que torna importante estudar o AC frente ao radical peroxila (ROO^\bullet).

Durante o processo de oxidação de lipídeos, é gerado o ROO^\bullet , sendo este radical também encontrado normalmente em alimentos e amostras biológicas. Em função da importância da lipoperoxidação, vários sistemas-modelo simulam esta reação e são utilizados para avaliar a capacidade antioxidante frente a este tipo de atividade oxidativa.

Este ensaio foi inicialmente proposto por BORS et al. (1984) e mostra-se adequado para avaliar a atividade antioxidante frente ao processo de lipoperoxidação. A capacidade de inibição de antioxidantes é medida através da proteção do clareamento (*bleaching*) da solução de crocina (Figura 35), frente a um composto gerador de radicais livres. A crocina é um carotenoide e pigmento natural derivado da planta *Crocus sativus* L. Este método foi aplicado por Tubaro et al. (1998) para análise da capacidade antioxidante de plasma sanguíneo humano, considerando-o adequado para amostras biológicas constituídas de misturas complexas.

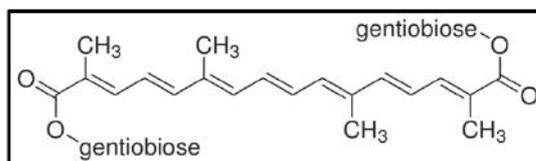


Figura 35. Representação da estrutura da crocina

Considerando os fatos expostos, o ensaio do clareamento da solução crocina é importante para substâncias com possível ação antioxidante, principalmente para uso cosmético, uma vez que são produtos de uso tópico, portanto aplicados diretamente sobre a pele, tendo contato quase que

exclusivamente com as células epiteliais como queratinócitos, melanócitos, dentre outras (Figura 36).

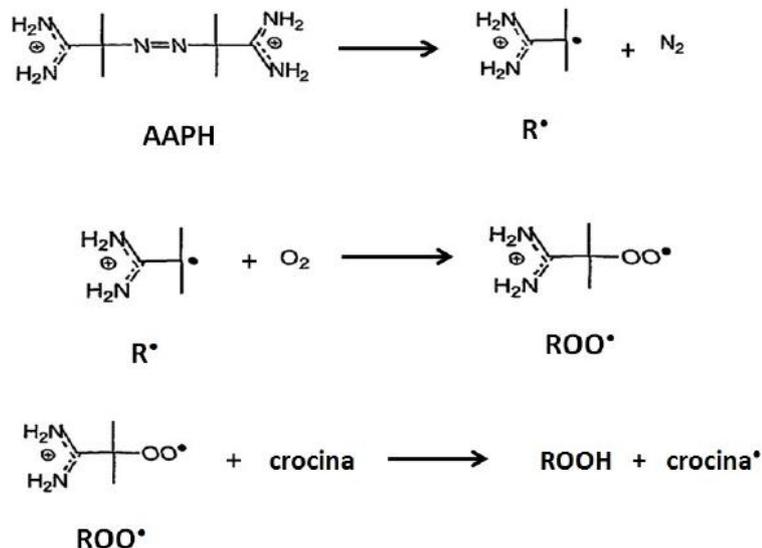


Figura 36. Reações envolvidas no clareamento da crocina com a termólise do AAPH (adaptado de ASSIS et al., 2015); A, representa um antioxidante (amostra).

Na presença de uma molécula antioxidante, essa redução da absorbância se torna menor e por isso registra-se um novo valor na variação da absorbância em função do tempo, ou seja, na velocidade de clareamento (*bleaching*). Assim, os antioxidantes competem com a crocina pelos radicais ROO^\cdot ; portanto, a inibição de sua oxidação depende da capacidade das amostras na captura das espécies radicalares (Figura 37).

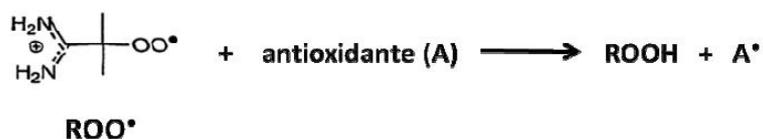


Figura 37. Esquema representativo da reação do radical peroxila com a substância antioxidante.

Mediante a competição cinética, o *bleaching* da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante. O antioxidante compete com a crocina pelo radical peroxila e uma nova velocidade de *bleaching* é gerada.

A velocidade de *bleaching* da crocina (v_0) diminui na presença de um antioxidante e um novo valor (v) é avaliado através da seguinte relação do

valor de K_a/K_c , calculado a partir da inclinação de regressão linear do gráfico v_0/v versus $[A]/[C]$, indica a capacidade relativa de um antioxidante interagir com o radical peroxila.

Neste ensaio, foi avaliada a velocidade de clareamento da solução de crocina sem adição de antioxidantes e, posteriormente, com adição de padrões antioxidantes, ácido ascórbico, ácido gálico e trolox e, da amostra, AC, em diferentes concentrações.

A capacidade de inibir o clareamento da crocina pelas amostras testadas está apresentada nas Figuras 38 a 41. Os gráficos representam a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (v_0) e presença (v) de amostra ($\mu\text{mol/L}$), em função do tempo, onde [crocina] representa a concentração de crocina utilizada, que foi constante ($24,4 \mu\text{g/mL}$). As concentrações de ácido ascórbico, ácido gálico, trolox e AC foram variadas de acordo com a descrição no gráfico *inset* das Figuras 38 a 41.

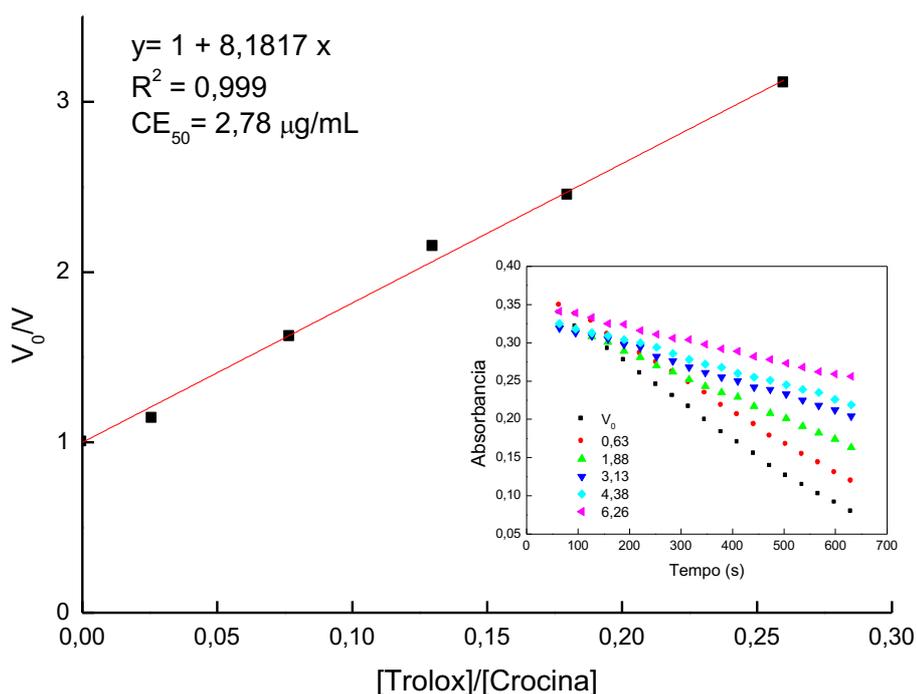


Figura 38. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com Trolox. v_0 , velocidade na ausência de Trolox; v , velocidade na presença de Trolox.

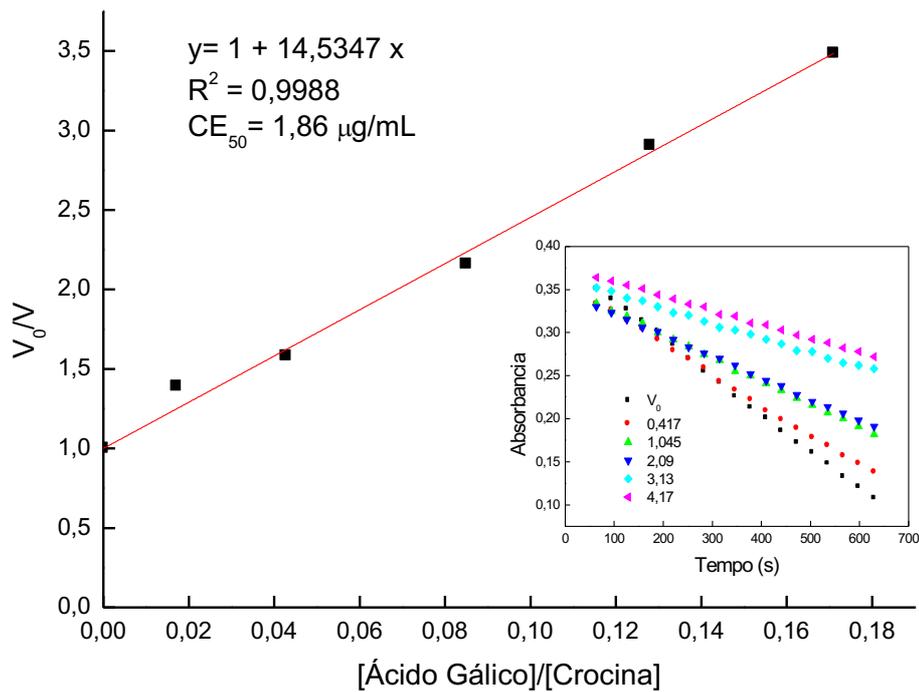


Figura 39. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ácido gálico. v_0 , velocidade na ausência de ácido gálico; v , velocidade na presença de ácido gálico.

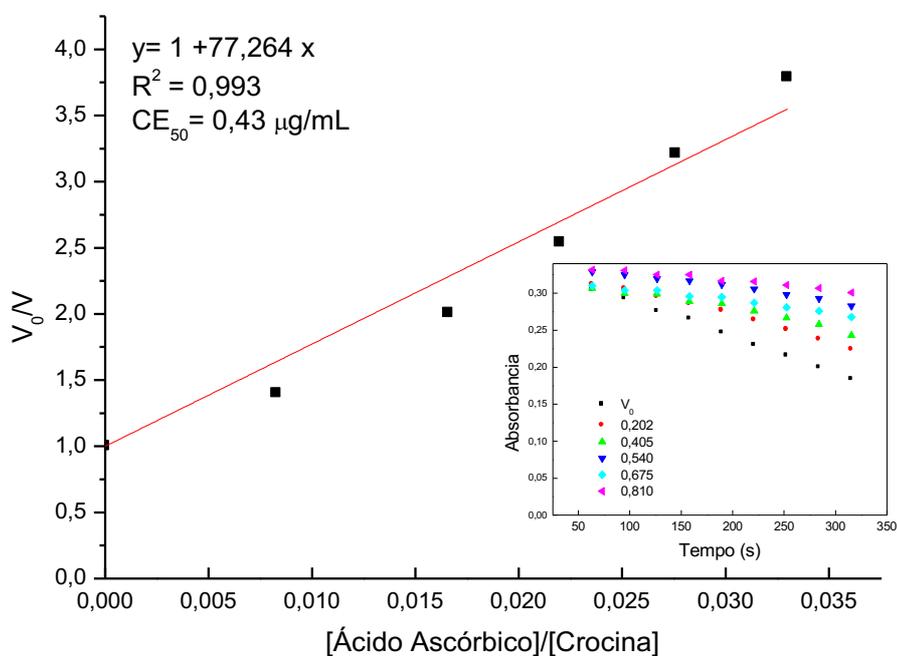


Figura 40. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com ácido ascórbico. v_0 , velocidade na ausência de ácido ascórbico; v , velocidade na presença de ácido ascórbico.

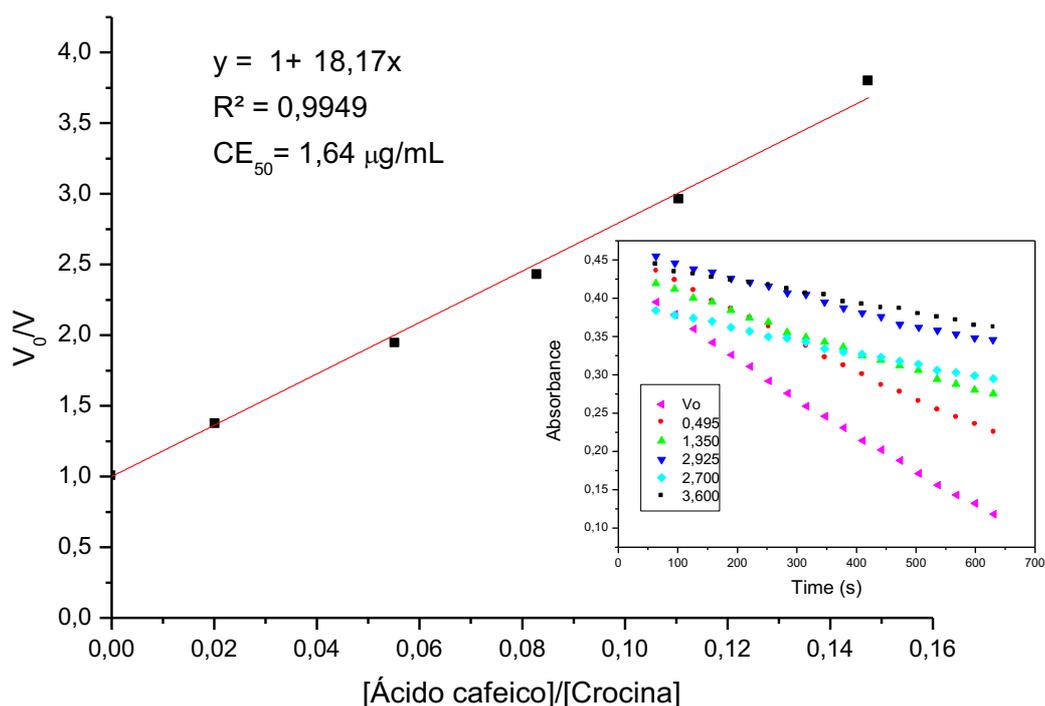


Figura 41. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com AC. v_0 , velocidade em ausência de AC; v , velocidade na presença de AC.

A partir dos gráficos de V_0/V versus $[\text{Antioxidante}]/[\text{Crocina}]$ (Figuras 38 a 41) foi possível realizar a regressão linear e, de acordo com o coeficiente angular observado, determinar a eficiência antioxidante das substâncias analisadas, sendo que, quanto maior o coeficiente angular, maior a atividade antioxidante da substância (Tabela 12) (ASSIS et al., 2015).

Ao compararmos os resultados, os valores de inclinação do AC com os demais padrões, considerando a ordem de eficiência, as maiores capacidades antioxidantes foram: ácido ascórbico > AC > ácido gálico > trolox.

Tabela 12. Equação da reta e valores de CE_{50} para o AC e os padrões pelo método de clareamento da crocina.

Amostra	Equação da reta	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (média) crocina
Trolox	$y = 1 + 8,18 x$	2,78 ^a
Ácido gálico	$y = 1 + 14,53 x$	1,86 ^b
Ácido cafeico	$y = 1 + 18,17 x$	1,64 ^b
Ácido ascórbico	$y = 1 + 77,26 x$	0,43 ^c

Analisando a Tabela 12 é possível observar que o trolox apresenta menor inclinação em relação aos padrões indicando que apresenta menor atividade antioxidante dentre os padrões. O AC teve comportamento estatisticamente igual ao ácido gálico.

Pelos valores de CE_{50} obtidos foi verificado que o ácido ascórbico apresenta maior potencial antioxidante neste ensaio, sendo, portanto, o que apresenta maior interação com o radical ROO^{\bullet} , possuindo atividade aproximadamente quatro vezes mais potente do que o AC e o ácido gálico, enquanto que em relação ao trolox apresenta atividade antioxidante aproximadamente seis vezes maior. Através da inclinação da reta também é possível classificar a ação antioxidante do AC em relação aos padrões através do cálculo da Equação 4 e, quanto mais próximos de 1,00, maior é o grau de equivalência (Tabela 13) (ASSIS et al., 2015).

$$\text{Número de equivalentes} = \alpha_{AC} \times 1 / \alpha_{\text{referência}} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que:

α_{AC} : coeficiente angular da curva analítica do AC.

$\alpha_{\text{referência}}$: coeficiente angular da curva analítica da substância referência utilizada.

Tabela 13. Comparação entre as capacidades de captura do radical ROO^{\bullet} do AC em equivalentes aos padrões.

Padrões ou Amostra	Equivalentes ao ácido ascórbico*	Equivalentes ao ácido gálico*	Equivalentes ao trolox*
Ácido ascórbico	1,00		
Ácido gálico		1,00	
Trolox			1,00
AC	0,24	1,27	2,26

*A equivalência foi obtida pelo quociente entre o coeficiente angular (Tabela 12) (ka/kc) (AC/padrão).

A partir dos resultados, foi verificado que o AC, apesar de apresentar um valor menor de CE_{50} que o ácido ascórbico, é capaz de interagir com o radical peroxila, indisponibilizando-o para atacar a estrutura da crocina. Desta forma, é

possível afirmar que o AC tem a capacidade de evitar ou diminuir a lipoperoxidação das membranas celulares, sendo importante o seu uso, para minimizar os efeitos ocasionados devido a este processo. Portanto, pode ser sugerido como um ativo cosmético protetor frente ao ataque à membrana celular.

5.1.6 Captura do ácido hipocloroso

O ácido hipocloroso (HOCl) não apresenta uma via de degradação catalítica diferentemente do radical ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio, que são degradados por via catalítica através da SOD e da catalase, respectivamente. Desta forma, a presença do HOCl no organismo pode ser prejudicial, uma vez que, além de ação bactericida, pode atacar, também, o tecido de mamíferos (EATON, 1991; LAPENNA & CUCCURULLO, 1996).

Apesar de ser uma espécie reativa não radicalar, é um potente oxidante. Apresenta forte atividade antimicrobiana e, devido à sua reatividade elevada e à sua propensão a permear membranas, pode oxidar uma grande variedade de biomoléculas, ocasionando danos celulares (CHING et al., 1994; WHITEMAN et al., 2005; BARREIROS et al., 2006).

Neste ensaio, foi utilizado o 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que é oxidado pelo HOCl gerando um cromóforo azul, com máximo de absorção em 652 nm. Na presença de substâncias antioxidantes, capazes de interagir com o HOCl, o cromóforo não é formado. Este método é bastante sensível para determinar a capacidade de captura do HOCl/OCl⁻ pela amostra (Figura 42) (CHING et al., 1994; ASSIS et al., 2015).

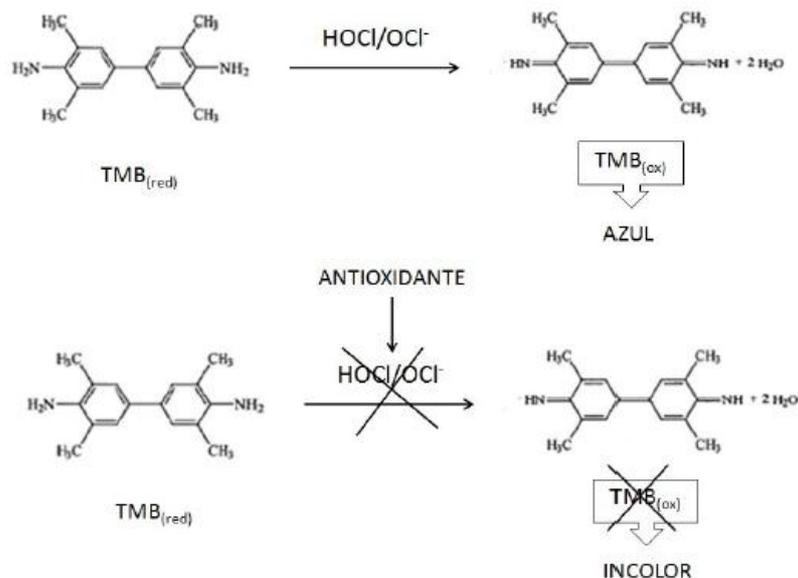


Figura 42. Representação esquemática da reação de oxidação do TMB e da captura de HOCl/OCl^- por um antioxidante.

Para determinar a atividade antioxidante do AC, neste ensaio também se utilizou como padrões o trolox, o ácido gálico e o ácido ascórbico. O perfil de captura do HOCl/OCl^- pelas referidas substâncias está apresentado nas Figuras 43 a 46.

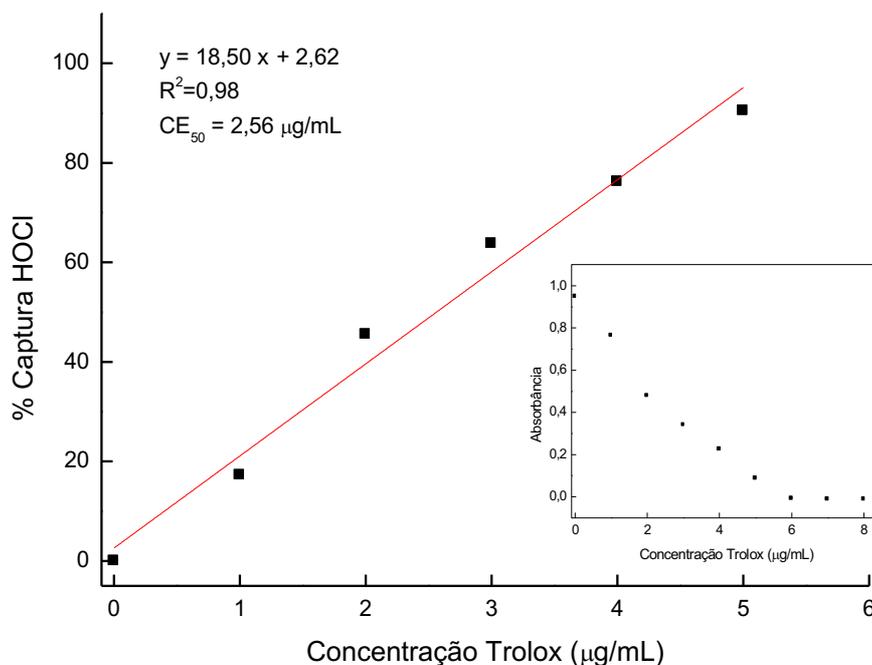


Figura 43. Perfil de captura do HOCl/OCl^- pelo trolox.

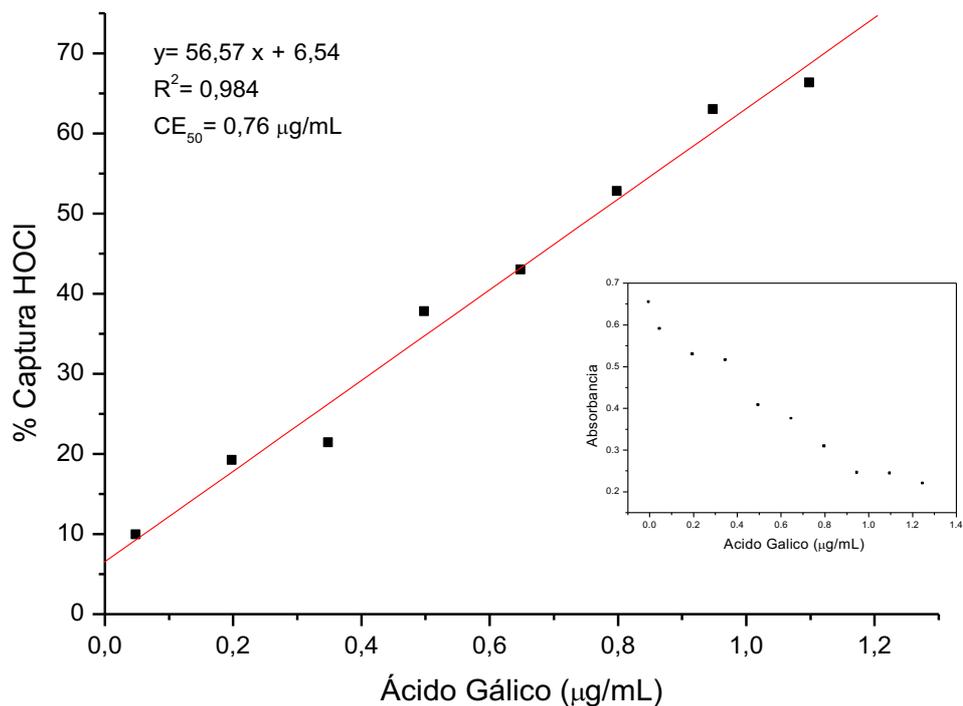


Figura 44. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ pelo ácido gálico.

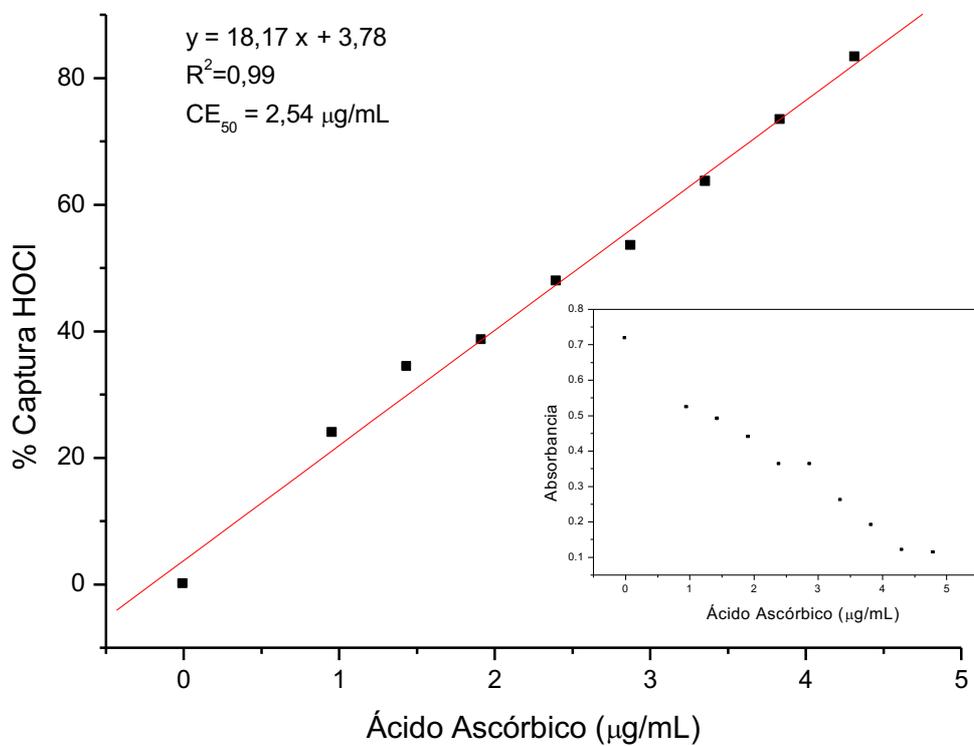


Figura 45. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ ácido ascórbico.

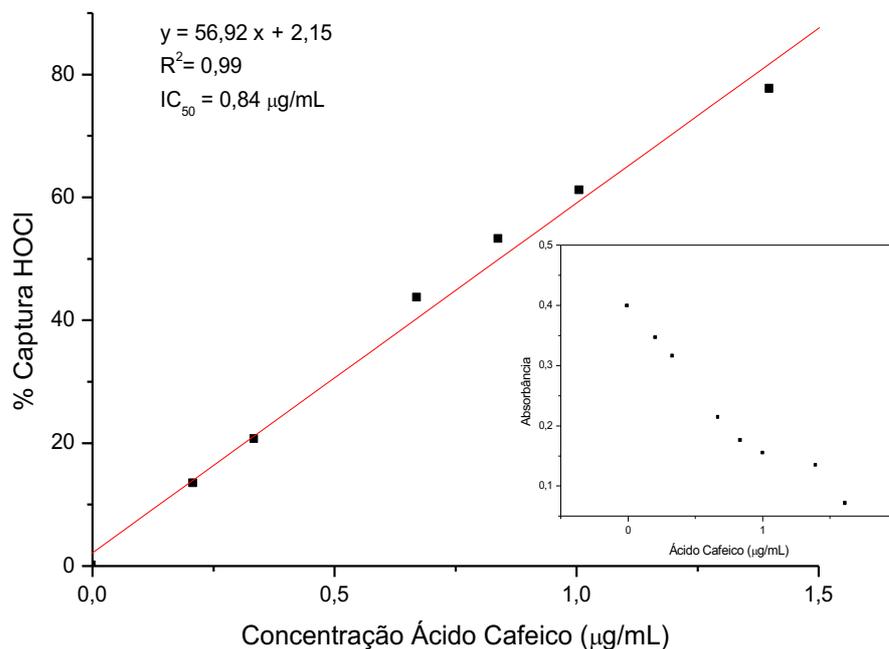


Figura 46. Perfil de captura do HOCl/OCl⁻ pelo AC.

A partir das concentrações avaliadas para construção dos gráficos apresentados nas Figuras 43 a 46 foi possível a realização da regressão linear e, com as equações das retas obtidas, calcular os valores de CE₅₀ para os padrões e AC (Tabela 14). Enumerados em ordem para o CE₅₀, foram mais efetivos como antioxidantes: ácido gálico > AC > ácido ascórbico > trolox.

Tabela 14. Valores de CE₅₀ para o AC e padrões pelo método de captura do HOCl/OCl⁻.

Amostra	CE ₅₀ (µg/mL) (média) HOCl/OCl ⁻
Trolox	2,56 ^a
Ácido ascórbico	2,54 ^a
Ácido cafeico	0,84 ^b
Ácido gálico	0,76 ^c

a, b, c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

O valor de CE₅₀ obtido para o AC foi aproximadamente três vezes menor que o necessário de ácido ascórbico e trolox para obtenção da mesma atividade. Este fato é bastante interessante, visto que a quantidade de AC

necessária é uma das menores quando comparada aos demais radicais livres utilizados neste estudo. Além disso, o HOCl/OCl⁻ não apresenta uma via catalítica de degradação sendo extremamente importante a ação de antioxidantes exógenos para sua eliminação.

Analisando a Tabela 14 é possível observar que as concentrações de AC e de ácido gálico necessárias para inibir 50% dos radicais são bem próximas. Além disso, o HOCl/OCl⁻ é gerado em resposta a processos inflamatórios e são liberados pelos fagossomos como sistema de defesa contra microrganismos. É de extrema importância que este radical seja sequestrado, pois, se estiver em excesso, pode extravasar para os tecidos, causando danos teciduais e, também, pode reagir dando origem a outros radicais como hidroxila e oxigênio singlete (BARREIROS et al., 2006; DE PINHO et al., 2010).

Por estes motivos, a capacidade do AC em sequestrar os radicais HOCl/OCl⁻ é extremamente importante, visto que, além de atuar como um potente antioxidante prevenindo o envelhecimento cutâneo, atua como sequestrante de HOCl/OCl⁻, minimizando os danos teciduais, ocasionados por processos inflamatórios e ataques de microrganismos.

5.1.7 Capacidade de captura sobre o H₂O₂

O peróxido de hidrogênio, apesar de não apresentar elétrons livres, o que caracteriza um radical livre, é precursor de um elevado número de espécies reativas de oxigênio, além de ser capaz de transpor membranas e assim gerar os radicais no interior das células (BARREIROS et al., 2006). Por esse motivo, é importante a avaliação da captura de H₂O₂ por substâncias antioxidantes.

Neste ensaio, a capacidade de captura do H₂O₂ foi avaliada utilizando o ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) que, na presença de H₂O₂, é oxidado a ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzoico (DTNB), ocasionando a diminuição da absorbância em 412 nm. Com a adição de substâncias com capacidade antioxidante que capturem o H₂O₂, não haverá sua disponibilidade para provocar a oxidação do TNB e, portanto, não será observado o decréscimo de absorção (Figura 47) (CHING et al., 1994).

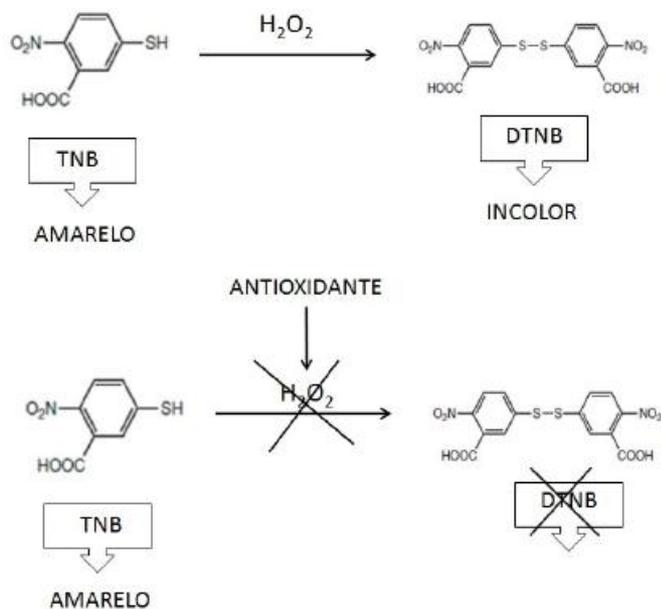


Figura 47. Representação esquemática da reação entre H_2O_2 e TNB e da captura do H_2O_2 por substâncias antioxidantes.

A atividade sobre a captura de H_2O_2 foi avaliada utilizando a catalase, o ácido ascórbico, o ácido gálico e trolox como padrões, uma vez que a catalase é a enzima presente na via catalítica de degradação de peróxido endógeno, além do AC.

Nesses ensaios a maioria das amostras não atingiram a CE_{50} nas concentrações utilizadas, e somente o ácido ascórbico e a catalase conseguiram atingi-la. O perfil de captura do H_2O_2 pelas referidas substâncias está apresentado nas Figuras 48 e 49.

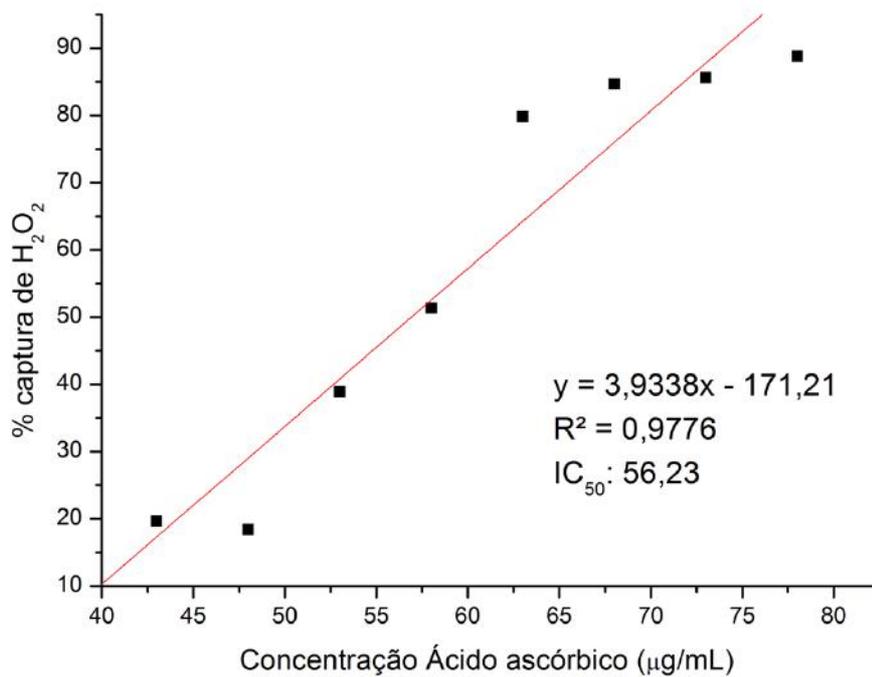


Figura 48. Perfil de Captura (CE_{50} $\mu\text{mol/L}$) do H_2O_2 pelo ácido ascórbico.

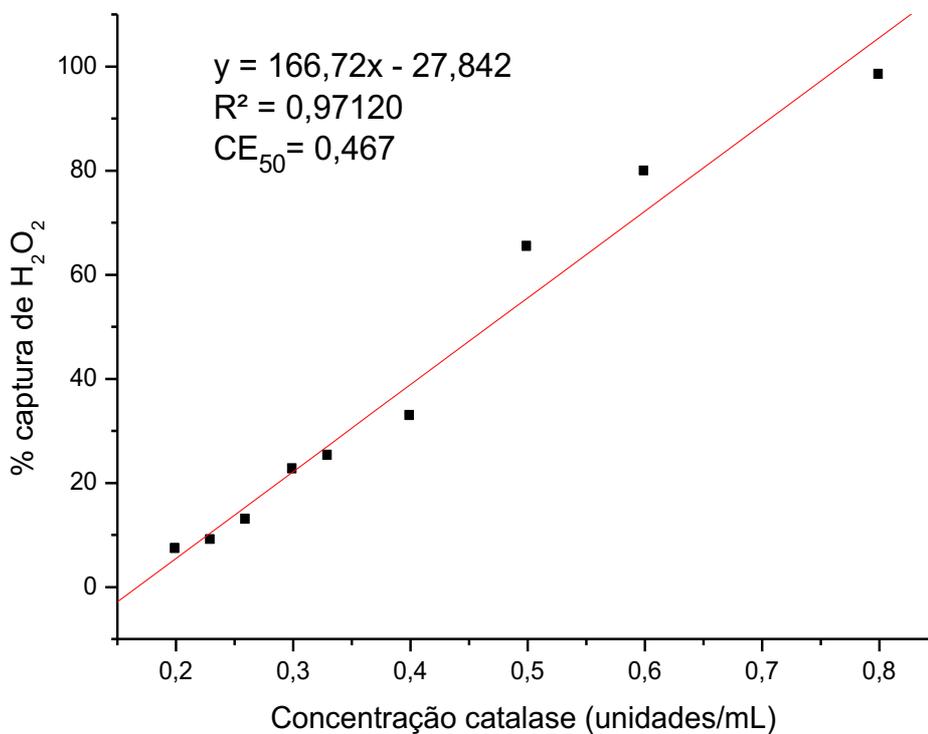


Figura 49. Perfil de Captura do H_2O_2 (CE_{50} $\mu\text{mol/L}$) pela catalase.

A partir dos gráficos apresentados nas Figuras 48 e 49, foi calculado o valor de CE_{50} (Tabela 15) para a catalase e ácido ascórbico, utilizando a porção linear da curva para o cálculo. A ordem crescente da CE_{50} foi catalase < ácido ascórbico, o que representa uma ordem decrescente na eficiência da captura do H_2O_2 . Como pode ser observado nas Figuras 48 e 49, a quantidade necessária para atingir a inibição de 50 % dos analitos foi muito superior para o ácido ascórbico em relação à CE_{50} da catalase.

Tabela 15. Valores de CE_{50} para os padrões pelo método de captura de H_2O_2 .

Amostra	CE_{50} (média) H_2O_2
Ácido ascórbico	56,23 $\mu\text{g/mL}$
Catalase	0,46 U/mL

Para o ácido gálico, trolox e AC, as concentrações máximas testadas foram de 850 $\mu\text{g/mL}$, 625 $\mu\text{g/mL}$ e 2600 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Até estas concentrações, não foi verificada atividade de captura do H_2O_2 , sendo estes valores muito superiores aos CE_{50} obtidos para outros ensaios, podendo inferir que estas substâncias e o AC não podem ser considerados antioxidantes contra o peróxido de hidrogênio.

5.1.8. Análise comparativa entre os testes

A Tabela 16 mostra os valores de concentração de trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e ácido cafeico necessários para 50% de captura dos radicais (CE_{50} , $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 16. Atividades de eliminação de EROs pelo trolox, ácido gálico, ácido ascórbico e ácido cafeico expressos como concentração necessária para 50% de captura (CE_{50} , $\mu\text{g/mL}$).

	DPPH*	ABTS**	SOD	$O_2^{\cdot-}$	CROCINA	HOCl/OCl ⁻	H_2O_2 **
Trolox	4,10	3,17	46,66	718,67	2,78	2,56	*
Ácido gálico	0,85	0,67	2,08	26,06	1,86	0,76	*
Ácido ascórbico	2,69	2,28	26,68	43,82	0,43	2,54	56,23
Ácido cafeico	2,39	1,96	0,37	41,11	1,64	0,84	*
Catalase	-	-	-	-	-	-	0,46

Valores em $\mu\text{g/mL}$ de CE_{50} ; * Nenhum efeito na concentração utilizada; **O método foi validado pela reação de H_2O_2 com catalase.

Como pode ser observado, os valores de atividade antioxidante do ácido cafeico são muito próximos dos padrões em todos os testes. Além disso, o AC apresentou atividade antioxidante maior que o ácido ascórbico e trolox, e tem a vantagem de ser mais estável que o ácido ascórbico e ser extraído de fontes naturais quando comparado ao trolox, que é um antioxidante sintético solúvel em água derivado da vitamina E. Finalmente, o AC mostrou atividade antioxidante pronunciada em relação aos demais padrões no método enzimático de captura de ânions superóxido.

Os grupos hidroxilo destas moléculas conferem atividade antioxidante (GRAF, 1992). O ácido cafeico tem apenas dois grupos hidroxilo ligados ao anel aromático, indicando que a presença de um terceiro grupo hidroxilo no ácido gálico aumenta a atividade antioxidante devido à estabilização por uma ressonância adicional (GRAF, 1992; BRAND-WILLAMS, 1995; CUVELIER, 1996). Isso pode ser usado para explicar o fato de que a eficácia de antioxidantes como o ácido gálico é maior que a do ácido cafeico.

Estudos anteriores realizados por outros grupos de pesquisa foram condizentes com os resultados encontrados neste trabalho e demonstraram que a atividade antioxidante do ácido cafeico é superior a outras substâncias testadas. Saleem e colaboradores (2004) relataram elevada atividade inibitória do ácido cafeico contra os radicais DPPH[•] e superóxido quando comparados à vitamina C, vitamina E e quercetina.

Roby e colaboradores (2013) realizaram a avaliação da atividade antioxidante, fenóis totais e fenólicos nos extratos de tomilho (*Thymus vulgaris* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.) e neste estudo o extrato metanólico mostrou a presença de: ácido rosmarínico, rosmarenato de metilo, ácido cafeico, ácido cinâmico, ácido clorogênico e ácido quínico como ácidos fenólicos, além de ácido ferúlico, apigenina, luteolina e quercetina. Os resultados demonstraram que o extrato metanólico do tomilho possuía a melhor atividade antioxidante, que era melhor do que as de outras plantas, α -tocoferol e BHA.

Dois derivados de quitosana solúveis em água foram sintetizados por inserção de ácido cafeico (AC) e ácido ferúlico (AF) sobre a quitosana através de um método mediado por radicais livres. Foram determinadas a caracterização estrutural, atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* dos derivados

de quitosana. Quando estes dois ácidos fenólicos foram introduzidos nas cadeias de quitosana, os seus grupos hidroxilo não foram destruídos. Portanto, a atividade antioxidante dos derivados de quitosana foi aumentada devido à inserção dos grupos de hidroxila do AC e AF (LIU, 2014).

Muitos estudos mostraram que o AC possui propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas, antibacterianas e anticarcinogênicas, que podem estar ligadas à sua atividade antioxidante. Genaro-Mattos e colaboradores (2015) investigaram o mecanismo antioxidante químico do AC e provaram que ele atuou tanto como quelante de metal quanto como doador de hidrogênio, impedindo a ação deletéria promovida pelos radicais livres.

5.2. Determinação da atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana do AC foi realizada tendo em vista que existe um grande número de microrganismos existentes e a pesquisa por novos agentes antimicrobianos visa auxiliar no tratamento de infecções e prevenir a resistência bacteriana (HOEFEL & LAUTERT, 2006).

Assim, uma pesquisa detalhada sobre sua atividade antimicrobiana é interessante para que o AC possa ser usado com segurança em produtos farmacêuticos e cosméticos, seja como substância ativa ou como conservante de formulações.

A menor concentração de AC que inibe o crescimento de microrganismos, também chamada de concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) e a atividade do AC foi testada frente às bactérias *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *P. acnes*.

Para determinação da CIM, a rezasurina foi o composto escolhido como revelador já que se trata de um corante óxido-redutor que em sua forma oxidada, apresenta-se como um composto de cor azul. Ao ser reduzido é convertido em resorufina um composto cor-de-rosa (Figura 50).

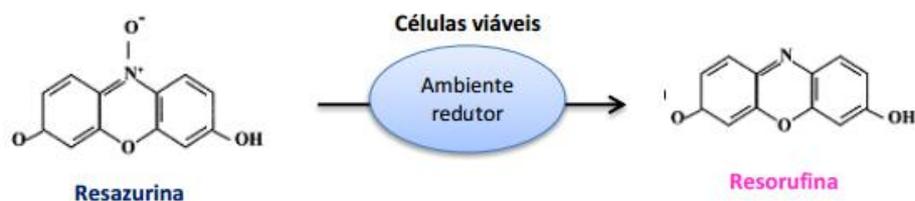


Figura 50. Reação de redução da resazurina.

A resazurina (7-hidróxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000).

A resazurina, ao ser incorporada pelas células vivas, atua como um aceptor de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial, ao nível do complexo IV. Como resultado, este composto pode ser reduzido intracelularmente, na presença de enzimas mitocondriais, as chamadas desidrogenases, que são as responsáveis por criar um ambiente redutor e, portanto, mediar a conversão da cor azul para rosa. Assim sendo, a determinação da redução do composto permite avaliar a variação na atividade metabólica das células, bem como a variação da proliferação celular.

A escolha da resazurina para realização da leitura, em detrimento a outros reveladores se deve ao fato de que a redutase feita com este composto fornece ao analista, resultados em prazo menor de tempo, se tratando de uma vantagem quando se compara por exemplo ao revelador azul de metileno que leva cerca de 7 horas, para obtenção dos mesmos resultados. A resazurina também apresenta maior sensibilidade a microrganismos pouco redutores, o que viabiliza o seu uso com uma maior gama de microrganismos, além de oferecer maior facilidade na verificação do resultado, pois a mudança de coloração da resazurina é bem evidente e ainda pelo fato da leitura com o uso deste revelador ser de fácil execução.

As concentrações testadas de AC variaram de 3000 a 1,46 µg/mL, sendo as concentrações em cada poço apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17. Concentração AC nos poços.

Nº poço	Concentração de AC ($\mu\text{g/mL}$)
1	3000,00
2	1500,00
3	750,00
4	375,00
5	187,50
6	93,75
7	46,87
8	23,44
9	11,71
10	5,85
11	2,92
12	1,46

O *screening* realizado traz como resultados as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) de AC necessárias para provocar inibição do crescimento ou morte celular, respectivamente (Figura 51).

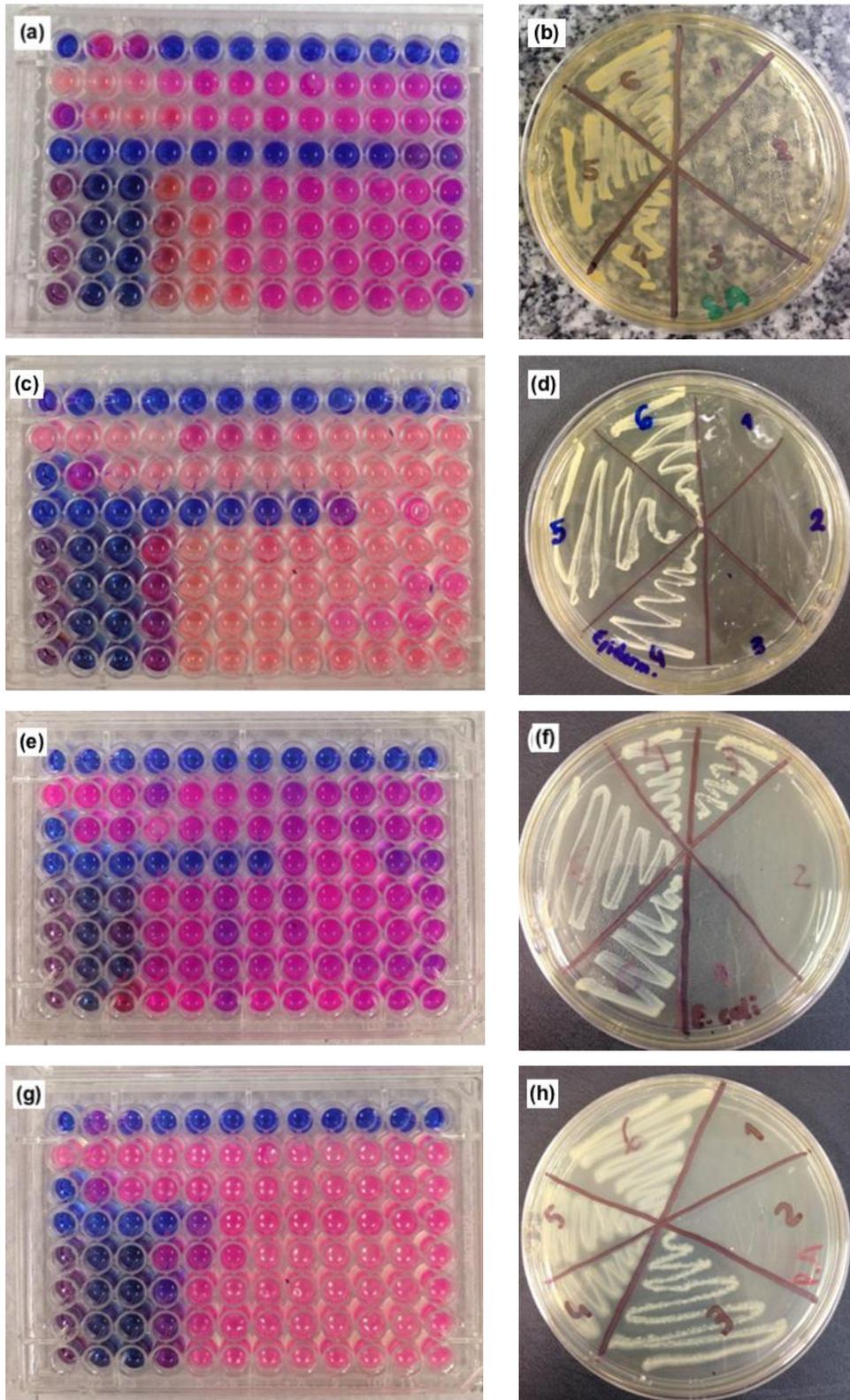


Figura 51. Teste da Concentração Inibitória Mínima e teste da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo em placas de ágar do AC frente ao *S. aureus* (a, b); *S. epidermidis* (c, d); *E. coli* (e, f); *P. aeruginosa* (g, h).

Para *S. aureus* houve crescimento microbiano a partir do quarto poço, indicando que a CIM do AC frente a este microrganismo é 750 µg/mL (Figura 51a), o mesmo valor foi constatado para a CBM (Figura 51b), já que após o subcultivo, essa foi a menor concentração que não apresentou crescimento.

Já para *S. epidermidis* houve crescimento microbiano a partir do quarto poço, indicando que a CIM do AC frente a esse microrganismo é de 375 µg/mL (Figura 51c). No subcultivo, não houve crescimento microbiano até o terceiro poço indicando que a CBM é de 750 µg/mL (Figura 51d).

Para *E. coli* houve crescimento microbiano a partir do terceiro poço, indicando que a CIM do AC frente a esse microrganismo é de 750 µg/mL (Figura 51e). Como não houve crescimento microbiano até o segundo poço após o subcultivo, isso indica que a CBM é de 1500 µg/mL (Figura 51f).

Para *P. aeruginosa*, o crescimento microbiano apresentou-se inibido até o quarto poço indicando que a CIM do AC frente a esse microrganismo é de 375 µg/mL (Figura 51g). Já a menor concentração que não apresentou crescimento após o subcultivo foi a do segundo poço, isso significa que a CBM é igual a 1500 µg/mL para a *P. aeruginosa* (Figura 51h).

Por fim, para *P. acnes* foi encontrado inibição do crescimento microbiano até o quarto poço, indicando que a CIM apresenta o valor de 375 µg/mL (Figura 52). Já a CBM não pode ser definida neste caso, uma vez que não é possível realizar o replaqueamento, pois este microrganismo não apresenta crescimento representativo em meio sólido.



Figura 52. Teste da Concentração Inibitória Mínima do AC frente à *P. acnes*.

Os controles dos fármacos utilizados foram o aztreonam e a cefazolina, conforme descrito no preparo do antimicrobiano e estes agentes foram capazes

de inibir o crescimento dos diferentes microrganismos em concentrações menores que 25 µg/mL.

Em todos os experimentos os controles positivos, do meio, do crescimento microbiano e dos solventes com e sem o inóculo foram adequados.

A Tabela 18 apresenta os resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do AC frente todas as bactérias estudadas.

Tabela 18. Atividade antimicrobiana do ácido cafeico frente às bactérias estudadas.

	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. aureus</i>	750	750
<i>S. epidermidis</i>	375	750
<i>E. coli</i>	750	1500
<i>P. aeruginosa</i>	375	1500
<i>P. acnes</i>	375	-

Estudos realizados por Canillac et al. (2004) e Vieira et al. (2010) relataram que as bactérias Gram positivas apresentam sensibilidade mais elevada do que as bactérias Gram negativas para vários polifenóis. Esta maior resistência pode ser explicada baseando-se na diferente composição da membrana de parede celular de cada microrganismo, já que de acordo com Tortora et al. (2017), a parede celular das bactérias Gram negativas atua como uma barreira para uma série de substâncias, incluindo antibióticos, o que segue em acordo com os resultados obtidos, uma vez que *S. aureus* e *S. epidermidis* são Gram positivas e apresentaram-se mais sensíveis do que *E. coli* e *P. aeruginosa*, que são Gram negativas e foram mais resistentes, já que precisaram de uma concentração maior de AC para morrerem.

As bactérias Gram negativas são rodeadas por uma parede celular de peptidoglicano fina, que por sua vez é cercada por uma membrana exterior contendo lipopolissacarídeo. As bactérias Gram positivas não possuem uma membrana externa, mas são rodeadas por camadas de peptidoglicano mais

espessas e através dessas camadas de peptidoglicano estão polímeros aniônicos longos, chamados ácidos teicóicos (Tortora et al., 2017).

Além disso, a parede células das Gram negativas apresentam um mecanismo de exclusão de moléculas tóxicas, os canais porina e bombas de efluxo, que podem impedir a entrada de produtos químicos nocivos e antibióticos. Como exemplo, *E. coli* e outras bactérias entéricas tem um envelope celular que é particularmente eficaz na exclusão de detergentes tais como sais biliares e também apresentam uma camada de estabilização adicional em torno delas, já que a malha de peptidoglicano que envolve as células Gram negativas é relativamente fina (Vieira et al., 2010).

Sendo assim, as distinções entre as estruturas de parede das duas classes de microrganismos, são capazes de justificar as diferentes concentrações inibitórias e bactericidas de AC encontradas frente às culturas testadas.

O AC demonstra-se promissor para uso considerando os valores encontrados pelas técnicas de diluição em microplaca e replaqueamento e assim pode-se reforçar cientificamente sua indicação popular, principalmente em ação sinérgica com outros antibióticos, de modo a atender à crescente demanda por agentes antimicrobianos que substituam ou reduzam as concentrações de antimicrobianos clássicos e desta forma da abertura à futuros estudos, inclusive contra fungos, para um uso mais seguro e eficaz.

5.3 Obtenção das micropartículas por *spray drying*

Existem vários métodos de microencapsulação, neste trabalho as micropartículas foram obtidas por secagem por atomização (*spray drying*). A produção de micropartículas por *spray drying* dispensa lavagens para isolar as micropartículas ou eliminar resíduos de solventes, além de permitir a utilização de uma variedade de polímeros e fármacos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (SILVA et al., 2003).

A obtenção de micropartículas esféricas de quitosana pelo método *spray drying* é um desafio (VEHRING et al., 2007; SELOMULVA et al., 2011). Algumas alterações podem ser formadas nas micropartículas devido à rápida evaporação da água em temperaturas elevadas ou ao cisalhamento das

gotículas gerado durante o processo de secagem por *spray drying* (ALPAR et al., 2005; VENTURA et al., 2008; REYNAUD et al., 2011). Por isso, são necessários os estudos de caracterização para verificar a morfologia, tamanho e superfície das micropartículas, a fim de confirmar se as condições utilizadas no método são propícias para produção de micropartículas com estrutura adequada para liberação controlada de ativos.

O formato das micropartículas produzidas pode ser influenciado por diversos fatores, tanto os parâmetros de secagem (temperatura, pressão, taxa de alimentação, tipo de atomizador, potencia do aspirador), quanto às formulações das suspensões (efeito de adição de ligante, tipo de dispersante, proporção dos componentes, etc) (DUFFIE & MARSHALL, 1953; DUFFIE & MARSHALL, 1958; BERTRAND et al., 2003; KIM & JUNG, 2007).

As micropartículas obtidas foram retiradas do coletor do *spray dryer*, armazenadas em frascos de vidro e guardadas em dessecador para realização da caracterização físico-química e outros estudos propostos (Figura 53).



Figura 53. Obtenção de micropartículas por *spray drying*.

Conforme descrito no item 4.3, foram produzidos dois tipos de micropartículas. As MPI foram produzidas a partir de uma dispersão hidroalcoólica no Mini *Spray Dryer* Buchi-191 e as MPII foram obtidas a partir de uma dispersão aquosa atomizada no Mini *Spray Dryer* Buchi-290.

A diferença entre o Mini *Spray Dryer* Buchi-191 e o Mini *Spray Dryer* Buchi-290 é que o primeiro é combinado com o Inert Loop B-295, sistema que trabalha em condições inertes e permite atomizar solventes orgânicos sem

risco de explosão. Por esse motivo é que foi utilizado etanol para solubilização da quitosana na MPI. Já a MP11, atomizada no *Mini Spray Dryer* BUCHI-290, foi acrescida de Polisorbate 80 para solubilização do AC.

Para o cálculo do rendimento do processo foram inseridos 500 mL de solução no *Mini Spray Dryer* BUCHI-191, contendo 0,5 g de quitosana, 0,15 g de AC, 0,05 g de estearilamina, totalizando uma massa teórica de 0,7 g em peso seco. A massa de micropartículas recuperadas no ciclone e no coletor do *spray dryer* após a passagem de toda solução foi de 0,45 g, o que corresponde a um rendimento de produção das MPI de 65% e perda de 35%.

Passando 100 mL de solução no *Mini Spray Dryer* Buchi-290, contendo 0,5 g de quitosana, 1 g de Polisorbate 80 e 0,15g de AC, esperava-se uma massa teórica de 1,65 g e a massa experimental coletada foi de 1,14g, o que corresponde a um rendimento de 69,33% e perda de 30,67%.

5.4. Caracterização das micropartículas

5.4.1 Microscopia eletrônica de varredura

A Figura 54 apresenta as fotomicrografias das MPI, obtidas a partir de uma dispersão hidroalcoólica e a Figura 55 apresenta as MP11, obtidas a partir de uma dispersão aquosa. Ambas exibiram microestruturas de 1 a 5 μm de diâmetro.

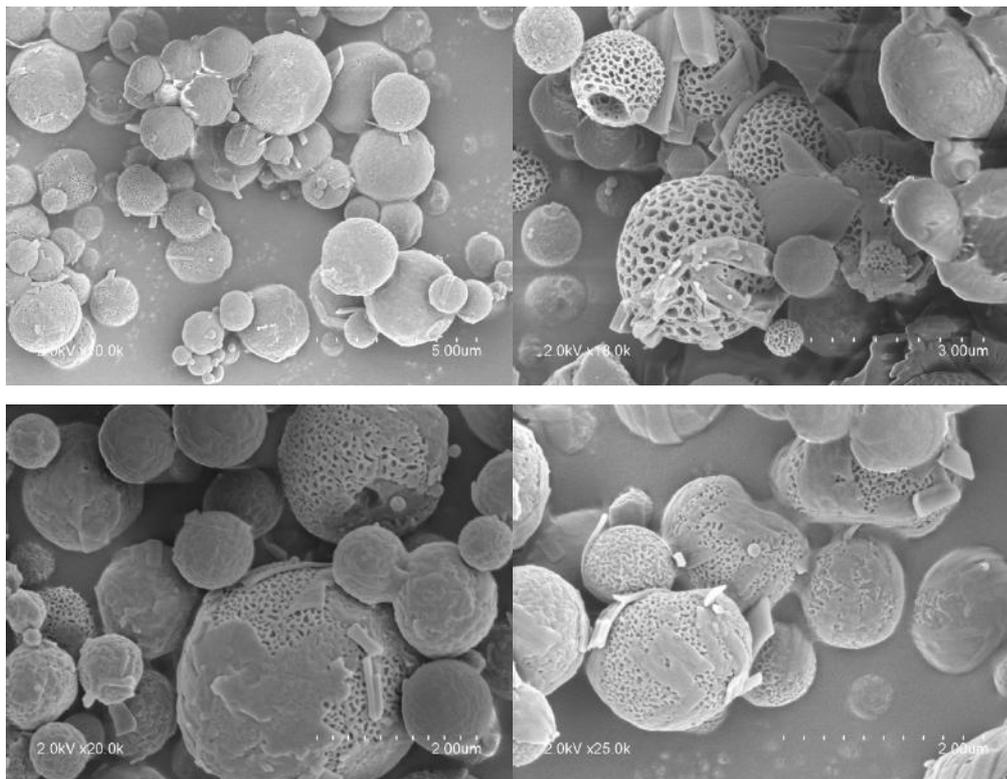


Figura 54. Fotomicrografias das MPI (aumentos: 10.000x, 18.000x, 20.000x e 25.000x).

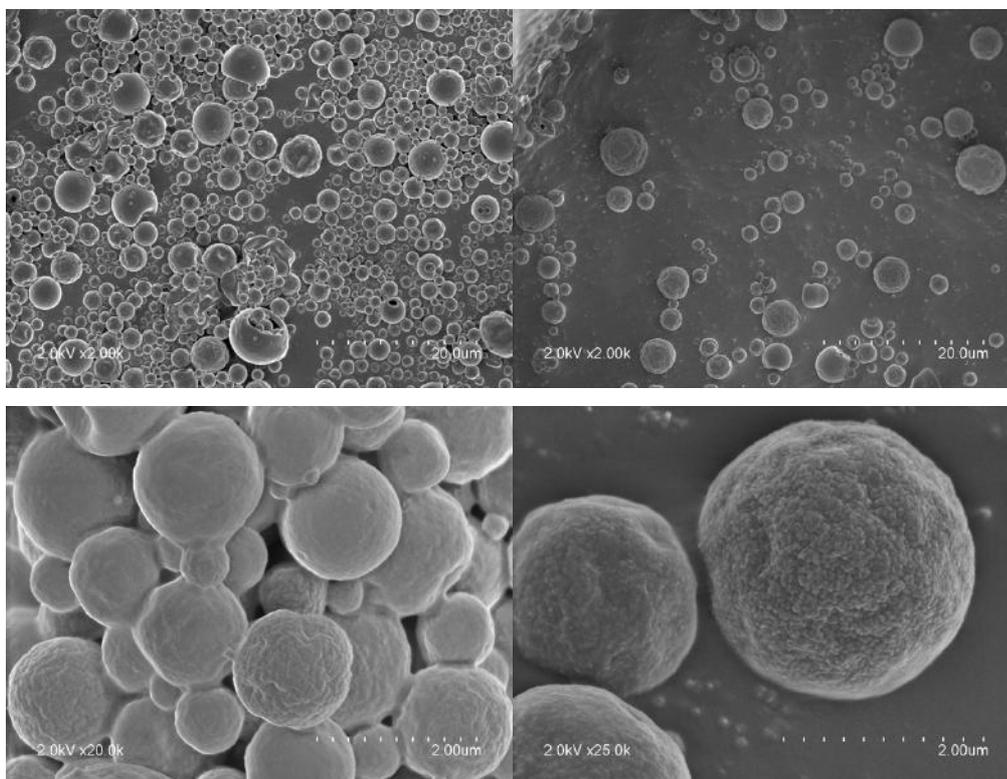


Figura 55. Fotomicrografias das MPII (aumentos: 2.000x, 2.000x, 20.000x e 25.000x).

As MP oriundas de solução aquosa apresentaram-se esféricas e com superfície lisa, ideal para liberação controlada, já as oriundas de solução hidroalcoólica apresentaram-se porosas e com material residual não internalizado.

As MPI apresentaram deformações bem evidentes. Tais características podem ser devido à rápida evaporação da solução hidroalcoólica em temperaturas elevadas ou ao cisalhamento das gotículas durante o processo de secagem por *spray drying*.

Barbassa (2014) realizou uma análise exploratória do efeito da composição da solução no formato das micropartículas produzidas e concluiu que a adição da estearilamina (substância cristalina não plástica) como substância estruturante, promoveu interação com a quitosana e no processo de secagem das gotículas elas não se deformaram, garantindo formação de estruturas esféricas. Por esse motivo a estearilamina foi escolhida para integrar a composição da MPI.

No entanto, a adição de agentes plastificantes, como o polissorbato 80 adicionado nas MP II, reduz a tensão superficial da superfície de contato e possivelmente se intercala entre as moléculas de quitosana na matriz, modificando sua estrutura e induzindo a esferonização, formando micropartículas com menor grau de deformações (ALPAR et al., 2005; VENTURA et al., 2008; REYNAUD et al., 2011).

5.4.2 Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho foi realizada a fim de se estudar a ocorrência de possíveis interações fármaco-polímero e possíveis alterações químicas dos componentes das micropartículas, após o processo de produção (FU et al., 2002; SILVA-JUNIOR, 2005).

A Figura 56 apresenta o espectro de absorção do AC na região do infravermelho.

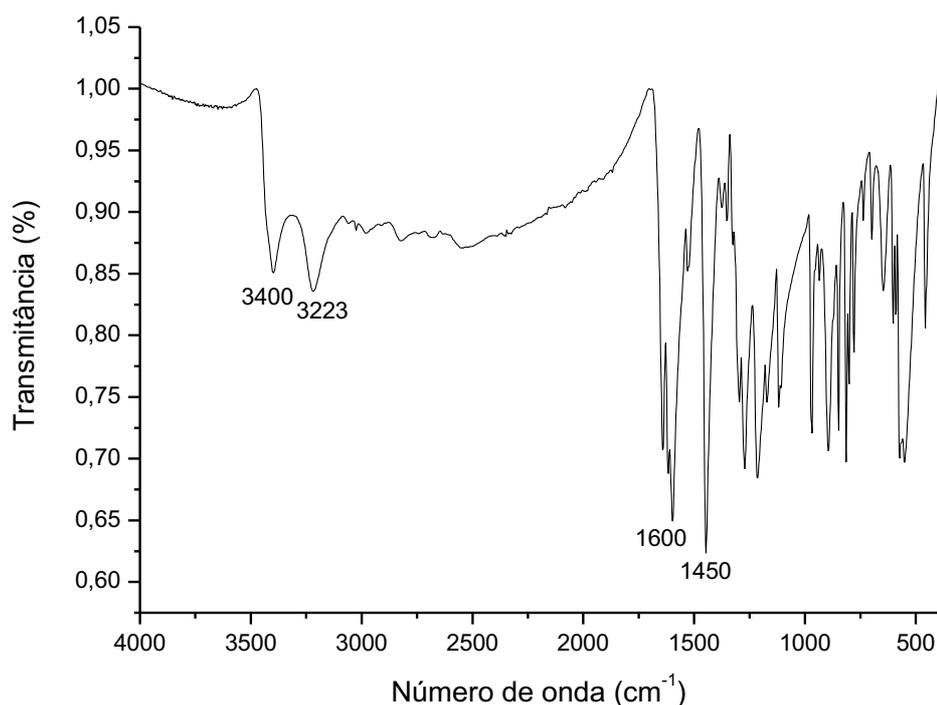


Figura 56. Espectro de absorção na região infravermelho de ácido cafeico.

As bandas intensas na região de 3400 a 3200 cm^{-1} apresentadas na Figura 56 indicam estiramento axial do grupo $-\text{OH}$ do AC. Não existem bandas em torno de 2900 cm^{-1} , já que o AC não apresenta estiramento $\text{C}-\text{H}$ (sp^3), que aparece em quase todos os espectros de compostos orgânicos. A existência de uma banda de 3200- 3010 indica o estiramento da ligação $\text{C}-\text{H}$ de alenos ($\text{C}-\text{H}$ sp^2). A região de estiramento do grupo carbonila é de 1850-1650 cm^{-1} , no entanto, esta banda pode ser significativamente deslocada para números de onda mais baixos, o que pode indicar um efeito de ressonância forte na estrutura do grupo carbonila. As bandas encontradas de 1600-1450 cm^{-1} indicam a deformação axial de grupamento $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático (Figura 6).

Khavesh et al. (2015) avaliaram as bandas do AC e valores bem próximos aos encontrados nesse trabalho foram observadas. As bandas obtidas a 1617, 1756, 3388 e 3069 cm^{-1} foram do $\text{C}=\text{O}$, ácido carboxílico, OH e $\text{C}-\text{H}$, respectivamente.

Garrido et al. (2018) avaliaram as bandas encontradas do fenetil éster do ácido cafeico e fenetil amina do ácido cafeico por espectroscopia na região do infravermelho. O espectro do fenetil éster do ácido cafeico mostrou bandas

características em 3480 e 3327 cm^{-1} (estiramento O-H), 1685 cm^{-1} (estiramento C=O), 1601 cm^{-1} (estiramento C=C) e 1182 cm^{-1} (estiramento C-O). Por sua vez, o fenetil amina do ácido cafeico apresentou bandas em 3487 e 3345 cm^{-1} (estiramento O-H), 3180 cm^{-1} (estiramento N-H), 1646 cm^{-1} (estiramento C=O), 1603 cm^{-1} (estiramento C=C) e 1190 cm^{-1} (estiramento C-O).

O espectro da região do infravermelho da quitosana (Figura 57) apresenta as bandas características dos grupamentos presentes em sua molécula.

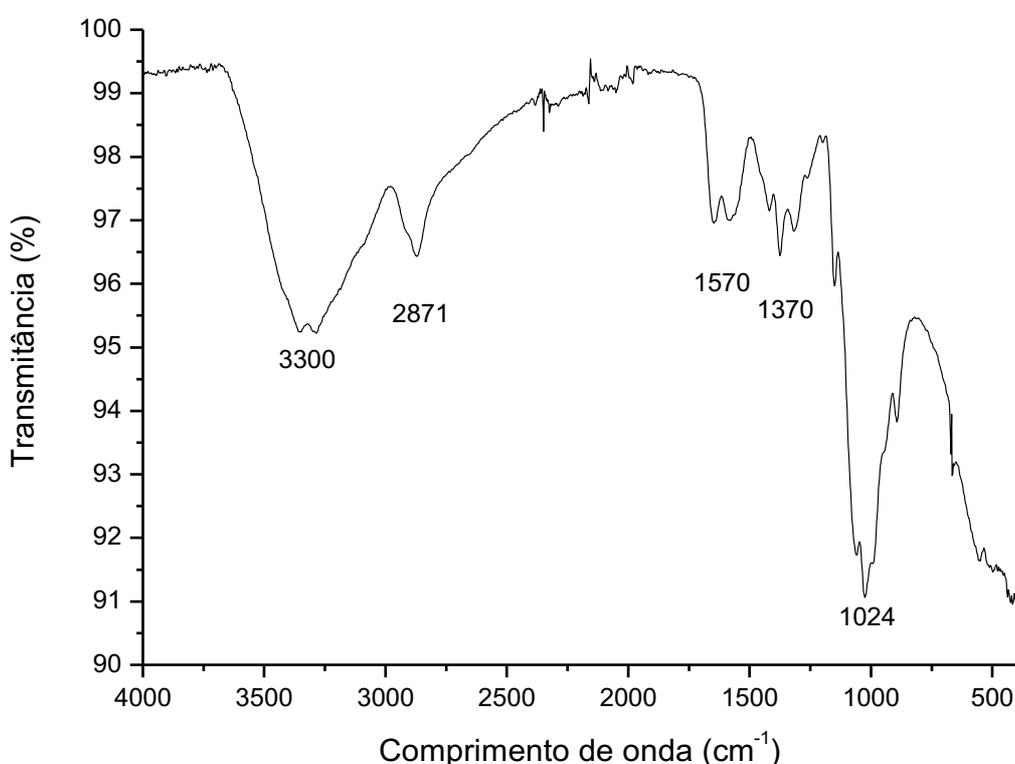


Figura 57. Espectro de absorção na região infravermelho de quitosana.

No espectro na região infravermelho da quitosana (Figura 57), a banda larga na região entre 3360 e 3288 cm^{-1} é provocada pelo estiramento O-H. Esta banda se sobrepõe à banda referente ao estiramento da ligação N-H. Em 2871 cm^{-1} aparece o estiramento das ligações C-H da molécula. Em 1570 cm^{-1} encontra-se a banda referente ao estiramento axial da ligação C=O de uma função amida. Próximo às regiões de 1370 cm^{-1} encontram-se as deformações

angulares simétricas de C-H. As bandas características dos polissacarídeos são encontradas entre 894 e 1024 cm^{-1} (Figura 4).

Dimzon e Knepper (2015) avaliaram os espectros de absorção na região do infravermelho da quitosana e verificaram que a região espectral entre 1500 e 1800 cm^{-1} é uma rica fonte de dados. Por exemplo, as bandas de absorção amida I e amida II a $1630\text{--}1660\text{ cm}^{-1}$ e 1560 cm^{-1} , respectivamente, são bandas características amplamente utilizadas. Na mesma região, no entanto, é a banda em 1597 cm^{-1} devido a amins primárias e em 1640 cm^{-1} , devido ao grupo OH de polissacarídeos. Como as bandas são amplas e se sobrepõem umas às outras, encontrar a banda característica mais adequada ou a combinação de bandas características tem sido uma tarefa difícil. A presença de água também pode causar um aumento na banda de absorção na faixa de 3450 cm^{-1} .

A Figura 58 apresenta o espectro de absorção da estearilamina na região do infravermelho.

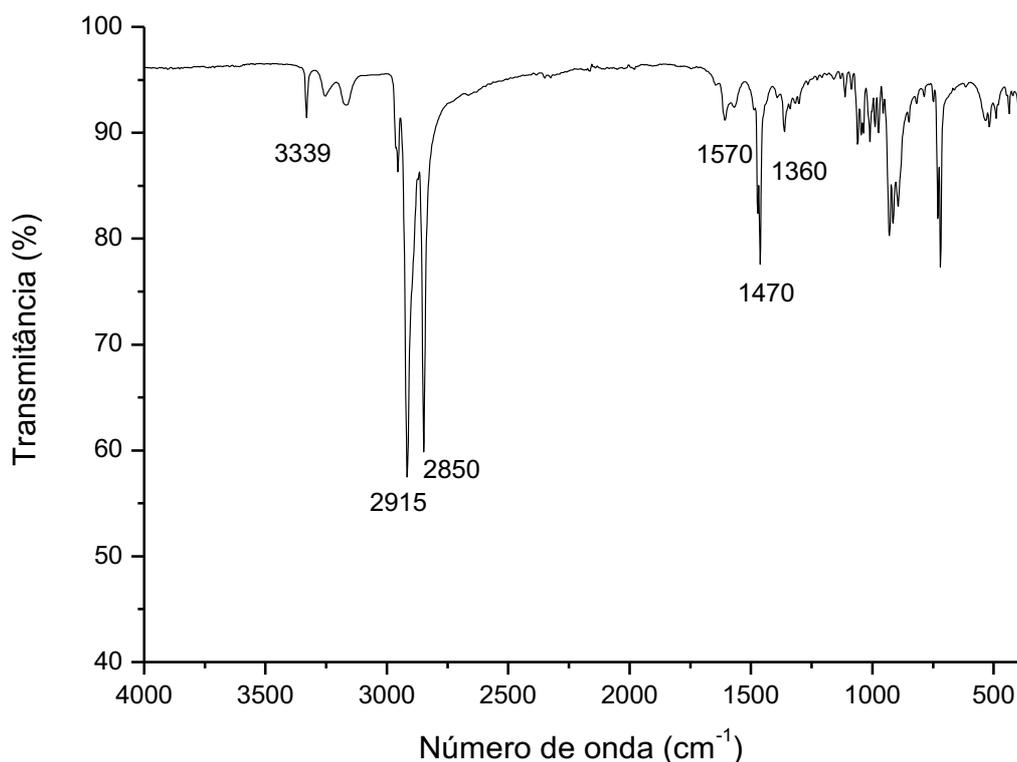


Figura 58. Espectro de absorção na região infravermelho de estearilamina.

Como pode ser observado, a banda na região de 3339 cm^{-1} representa o estiramento assimétrico do NH_2 da estearilamina. As bandas entre 2915 e 2850

cm^{-1} são características do estiramento simétrico e assimétrico de CH_2 , respectivamente. O duplete na região de 1570 cm^{-1} representa a deformação N-H. As bandas entre 1470 e 1360 cm^{-1} representam a deformação de CH_2 e CH_3 (Figura 59).

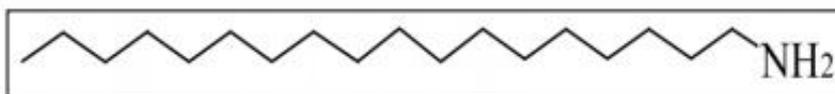


Figura 59. Estrutura molecular da estearilamina

Neelgund et al. (2015) encontraram que as vibrações de estiramento de CH_2 simétricas e assimétricas da estearilamina estão em 2848 cm^{-1} e 2917 cm^{-1} , respectivamente e que a presença de uma banda proeminente a 3332 cm^{-1} no espectro corresponde ao modo de vibração de estiramento do N-H.

O espectro de infravermelho da estearilamina em números de onda na faixa de 2600 a 3100 cm^{-1} realizado por Yu et al. (2016) mostrou um pico proeminente a 2850 cm^{-1} e outro em 2915 características do estiramento assimétrico e simétrico de CH_2 , respectivamente.

A Figura 60 apresenta o espectro de absorção do Polysorbate 80 na região do infravermelho.

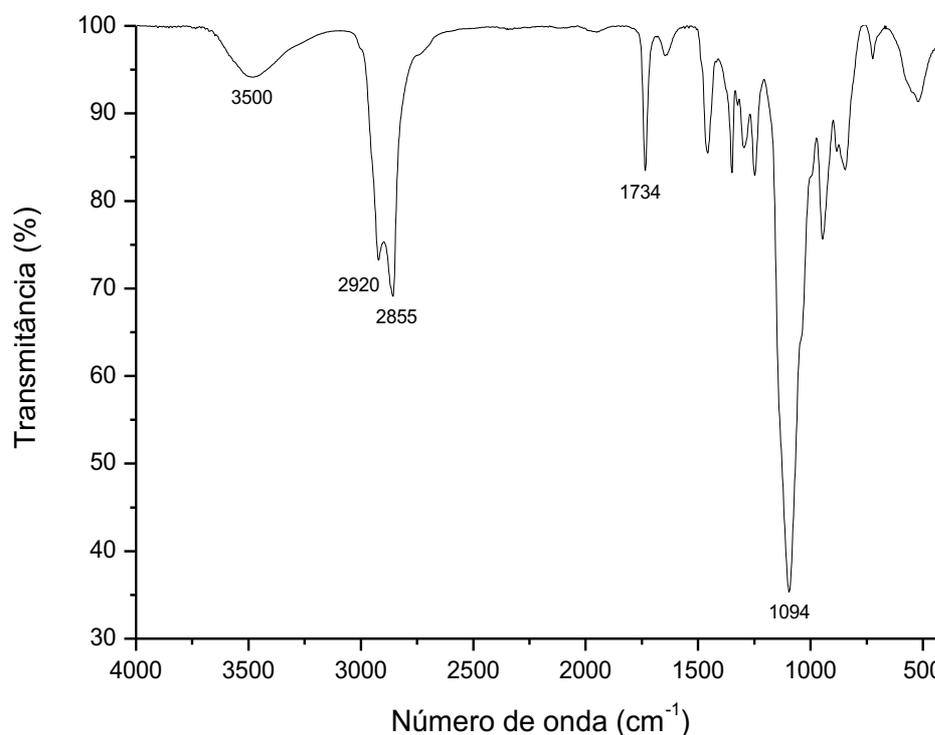


Figura 60. Espectro de absorção na região infravermelho do Polysorbate 80.

Na Figura 60, a banda em 3500 cm^{-1} é referente aos grupamentos OH da molécula de Polysorbate 80. A banda de absorção referente ao estiramento C-O-C (característica de etoxilados) é observada nitidamente em 1094 cm^{-1} . A banda em 2920 cm^{-1} é referente ao estiramento axial da ligação C-H de carbonos CH_3 e CH_2 (carbonos primários e secundários, respectivamente) e 2855 cm^{-1} são referentes à CH de carbonos terciários (Figura 61).

Joshi e colaboradores (2016) identificaram três bandas características do Polysorbate 80, na faixa de $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$, $1770\text{-}1720\text{ cm}^{-1}$ e $1200\text{-}1050\text{ cm}^{-1}$ representando $-\text{CH}_2$ (cadeia acila do ácido graxo), $-\text{C}=\text{O}$ do grupamento éster e $-\text{C}-\text{O}$ da porção etoxi, respectivamente. As bandas características do Polysorbate 80 também foram caracterizadas por Miloudi et al. (2017) e demonstraram concordância com os resultados encontrados no presente trabalho.

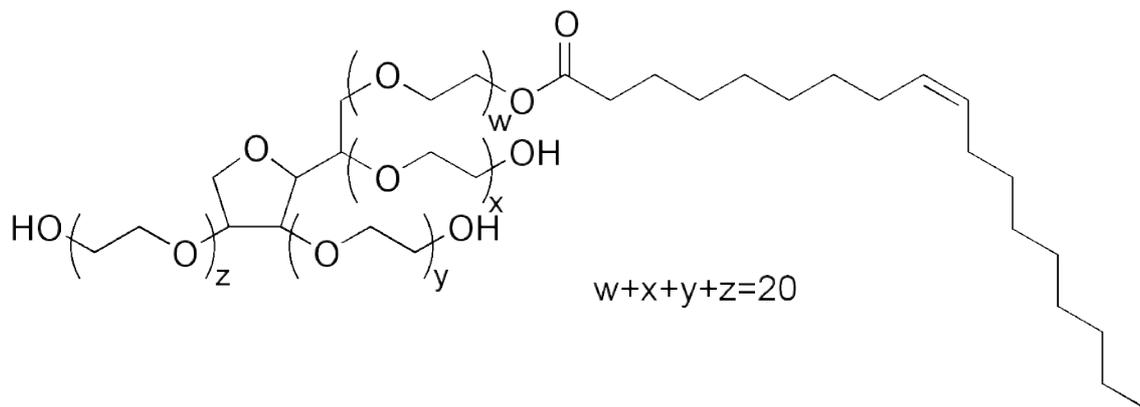


Figura 61. Estrutura molecular do Polysorbate 80.

Nos espectros de infravermelho obtidos da mistura física contendo os componentes das MPI e também das próprias MPI, apresentados nas Figuras 62 e 63 respectivamente, é possível observar que as bandas dos componentes individuais das MPI estão presentes.

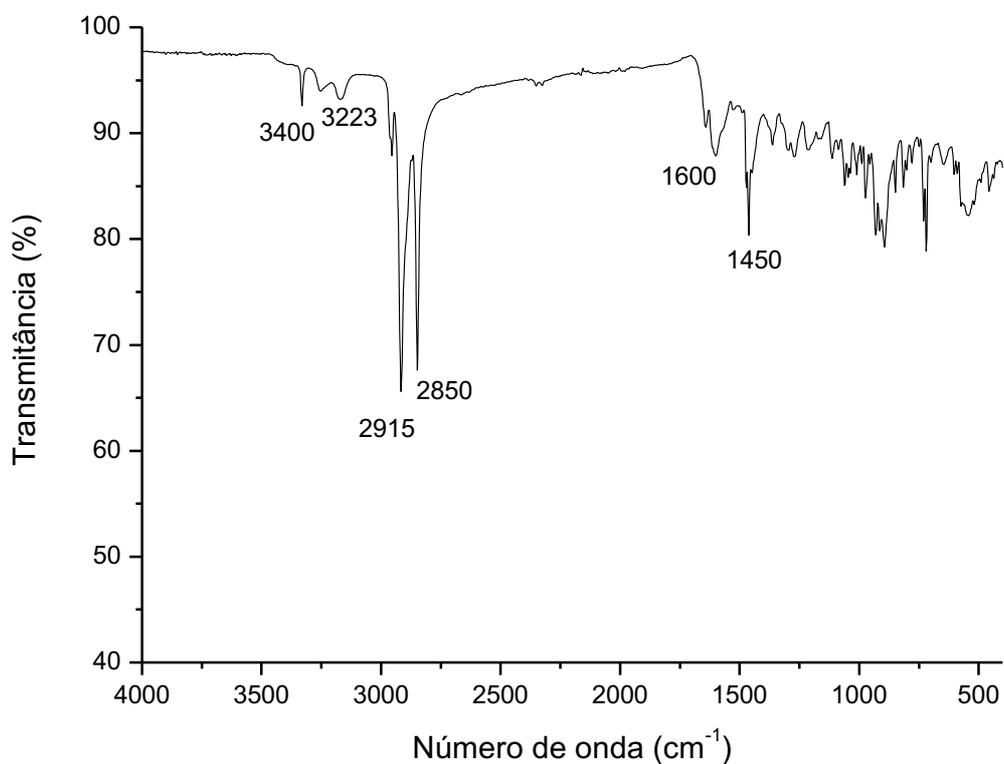


Figura 62. Espectro de infravermelho da mistura física I.

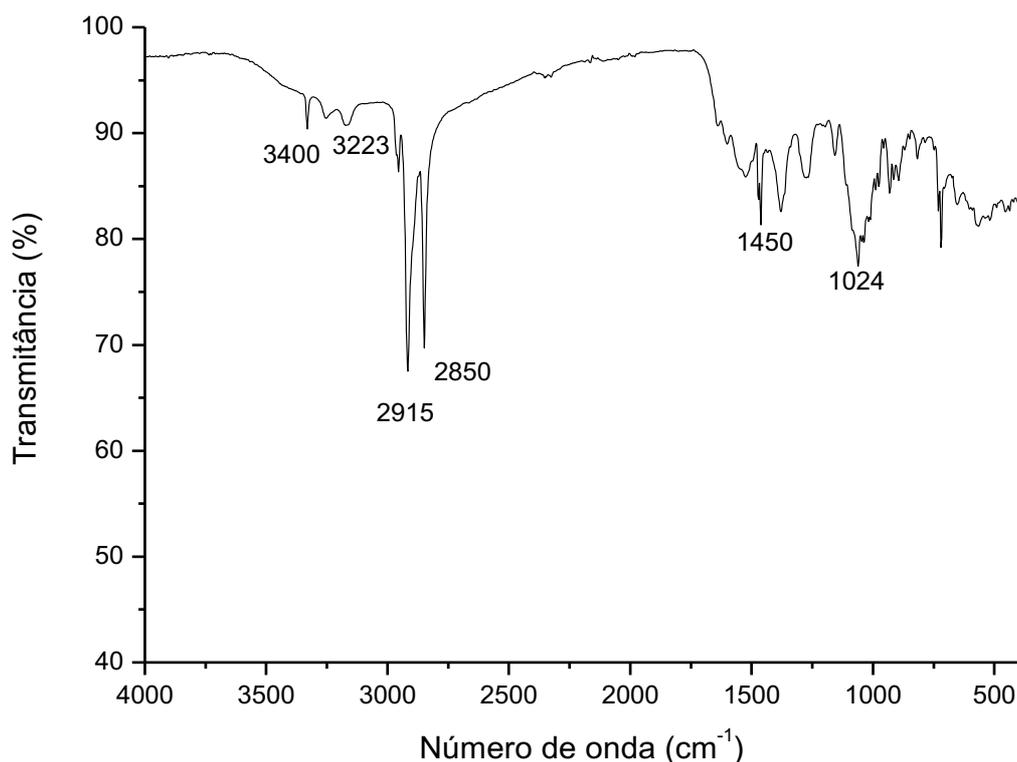


Figura 63. Espectro de infravermelho da MPI.

As bandas características do ácido cafeico presentes nas Figuras 62 e 63 são: a banda na região de 3400 e 3223 cm^{-1} , característica do estiramento axial do grupo $-\text{OH}$. A banda aguda na região de 1537-1837 cm^{-1} é relativa ao estiramento do grupo carbonila. Seus valores aparecem deslocados dos valores esperados (1850-1650 cm^{-1}), o que sugere um forte efeito de ressonância na estrutura deste grupamento. As bandas encontradas na região de 1278-1378 cm^{-1} são provocadas pela deformação axial da ligação $\text{C}=\text{C}$ do anel aromático. As bandas entre 2915 e 2850 cm^{-1} são características do estiramento simétrico e assimétrico de C-H , respectivamente, presentes tanto na quitosana quanto na estearilamina. As bandas características dos polissacarídeos são encontradas entre 894 e 1024 cm^{-1} .

Além disso, é possível notar que as bandas estão menos intensas do que no espectro de infravermelho do ácido cafeico puro. Ainda, as bandas características dos grupamentos químicos presentes na quitosana parecem ter sido suprimidas pelas bandas das demais substâncias.

Nos espectros de infravermelho da mistura física II contendo ácido cafeico e quitosana são observadas prevalentemente as bandas do AC (Figura 64).

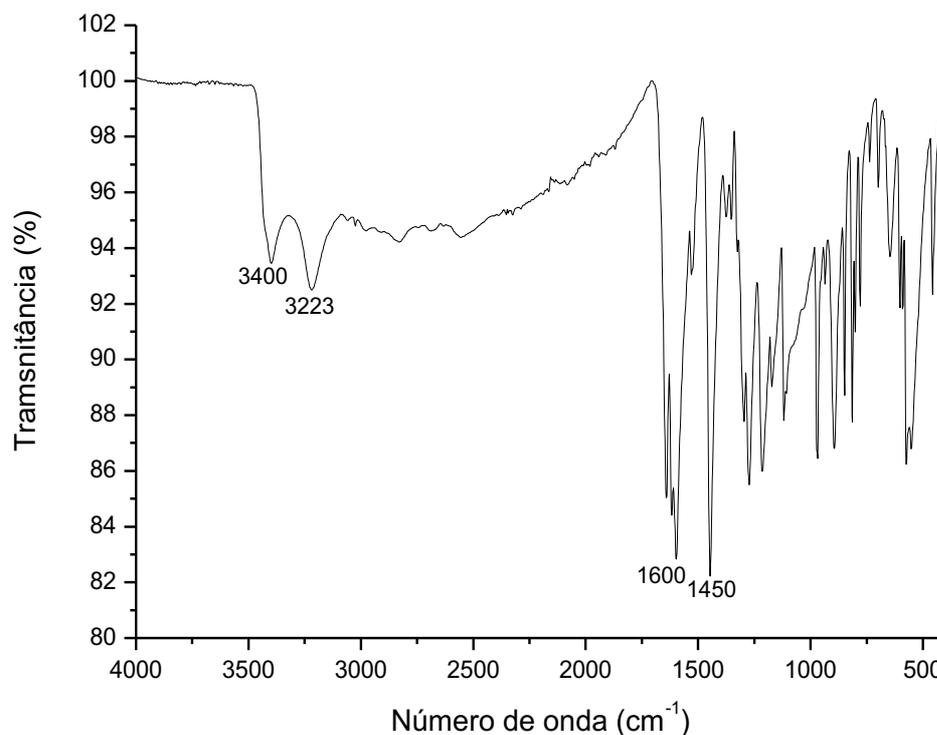


Figura 64. Espectro de infravermelho da mistura física II (quitosana + AC).

O Polysorbate 80 não foi adicionado na mistura física II por ser uma substância no estado líquido e as demais substâncias analisadas, quitosana e ácido cafeico serem sólidos finamente divididos o que comprometeria a uniformidade e homogeneidade da amostra final a ser analisada.

Bandas em 3400 cm^{-1} e 3223 cm^{-1} representam o estiramento axial dos grupos -OH presentes no ácido cafeico. O estiramento do grupo carbonila do AC está em 1600 cm^{-1} . A banda encontrada em 1450 cm^{-1} indica a deformação axial de grupamento C=C do anel aromático (Figura 6).

Além disso, é possível notar que as bandas estão menos intensas do que no espectro de infravermelho do ácido cafeico puro. Ainda, as bandas características dos grupamentos químicos presentes na quitosana parecem ter sido suprimidas pelas bandas do AC.

O espectro da região do infravermelho da MP II (Figura 65) apresenta as bandas características dos grupamentos presentes na quitosana e no Polysorbate 80.

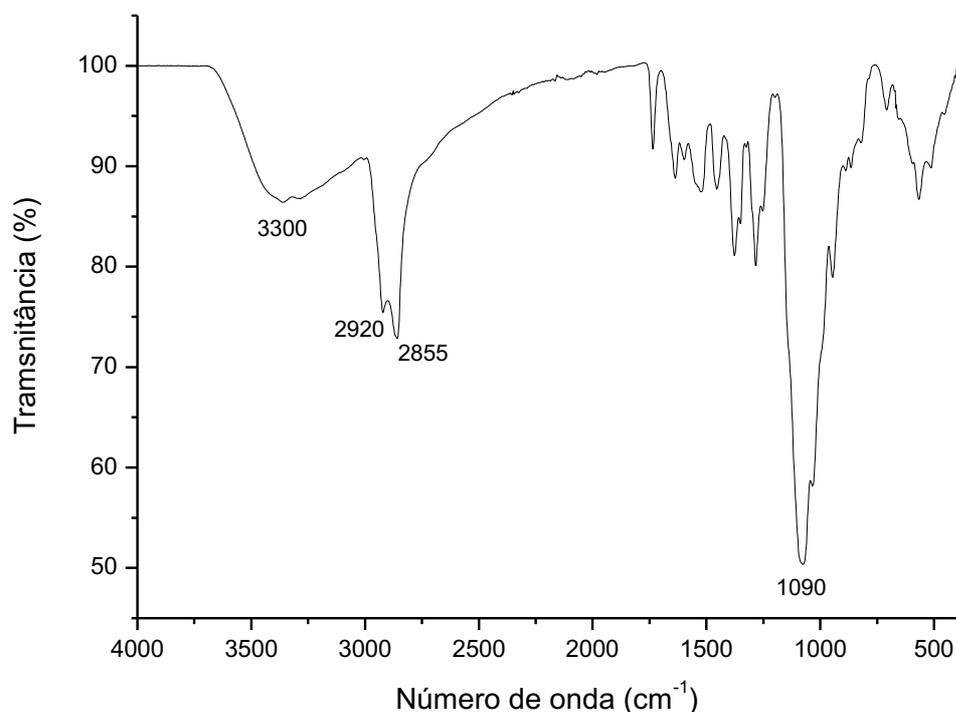


Figura 65. Espectro de infravermelho da MP II

A banda larga na região entre 3300 é provocada pelo estiramento O-H da quitosana. Próximo às regiões de 1370 cm^{-1} encontram-se as deformações angulares simétricas de C-H da quitosana e as bandas características dos polissacarídeos são encontradas entre 894 e 1024 cm^{-1} . A presença do Polysorbate 80 pode ser detectada pela banda de absorção referente ao estiramento C-O-C (característica de etoxilados) que é observada nitidamente em 1090 cm^{-1} . A banda em 2920 cm^{-1} é referente ao estiramento axial da ligação C-H de carbonos CH_3 e CH_2 (carbonos primários e secundários respectivamente) e 2855 cm^{-1} são referentes à CH de carbonos terciários presentes no Polysorbate 80.

A Tabela 19 apresenta as bandas características da quitosana, do ácido cafeico, da estearilamina, da mistura física I e II e das micropartículas estruturadas I e II, obtidas por espectroscopia na região do infravermelho.

Tabela 19. Bandas características da quitosana, do ácido cafeico, da estearilamina, da mistura física I e II e das micropartículas estruturadas I e II, obtidas por espectroscopia na região do infravermelho.

AC (cm ⁻¹)	Quitosana (cm ⁻¹)	Estearilamina (cm ⁻¹)	Polysorbate 80 (cm ⁻¹)	Mistura física I (cm ⁻¹)	MPI (cm ⁻¹)	Mistura física II (cm ⁻¹)	MPII (cm ⁻¹)
3400				3400	3400	3400	
	3300						3300
3223				3223	3223	3223	
			2920				2920
		2915		2915	2915		
			2855				2855
		2850		2850	2850		
1600				1600		1600	
1450				1450	1450	1450	
			1094				1090
	1024				1024		

As bandas em 3400, 3223 e 1450 cm⁻¹ do ácido cafeico estão presentes na mistura física I, mistura física II e MPI. Essas bandas não foram encontradas na MPII. A banda de 1600 está presente apenas nas misturas físicas I e II, não foram visualizadas nas micropartículas estruturadas. O AC encontra-se estabilizado nos sistemas, já que não existem indícios de interação entre os componentes na mistura física. Na MPII as bandas não foram encontradas tendo em vista que se encontra internalizado nas mesmas.

As bandas da quitosana 3300 e 1024 foram visualizadas apenas nas micropartículas, pois foram encobertas pelos ativos nas misturas físicas.

As principais bandas características da estearilamina 2915 e 2850 foram encontradas na mistura física I e na MPI.

As bandas do Polysorbate 80 foram visualizadas na MPII, indicando a sua contribuição para estruturação e esferonização das micropartículas.

Assim, a espectroscopia na região do infravermelho cumpriu o seu papel de estudar a ocorrência de possíveis interações fármaco-polímero e possíveis alterações químicas dos componentes das micropartículas.

5.4.3 Difração de raios-X

A difração de raios-X é uma técnica com origem no século XIX, que utiliza a equação de Bragg para determinar estruturas cristalinas em substâncias químicas. Difração de raios X é um fenômeno no qual os átomos de um cristal, em virtude de seu espaçamento uniforme (Figura 66), causam um padrão de interferência das ondas presentes em um feixe incidente de raios X.

É uma técnica usada para determinar a estrutura atômica e molecular de um cristal, na qual os átomos cristalinos fazem com que um feixe de raios X incidentes difrate em muitas direções específicas. Medindo os ângulos e as intensidades dos feixes difratados, um cristalógrafo pode produzir uma imagem tridimensional da densidade de elétrons dentro do cristal. A partir desta densidade de elétrons, as posições médias dos átomos no cristal podem ser determinadas, bem como suas ligações químicas, sua desordem e várias outras informações (PANI et al., 1987).

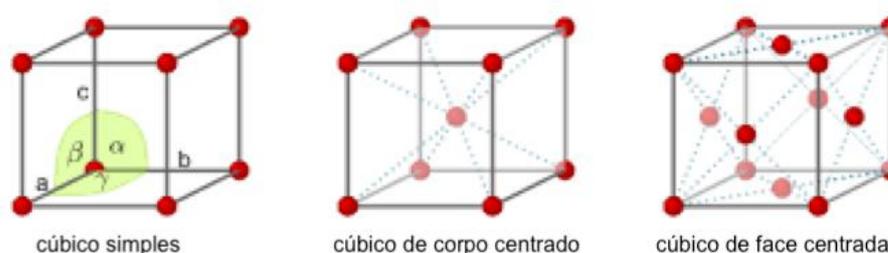


Figura 66. Exemplos de arranjo atômico cristalino.

(Fonte: GROSS & MARX, 2018)

As análises de difração de raios-X foram realizadas para as substâncias químicas (AC, quitosana e estearilamina) isoladas, nas misturas físicas dessas substâncias e nas micropartículas.

Os difratogramas da quitosana, da estearilamina e do ácido cafeico estão apresentados nas Figuras 67, 68 e 69, respectivamente.

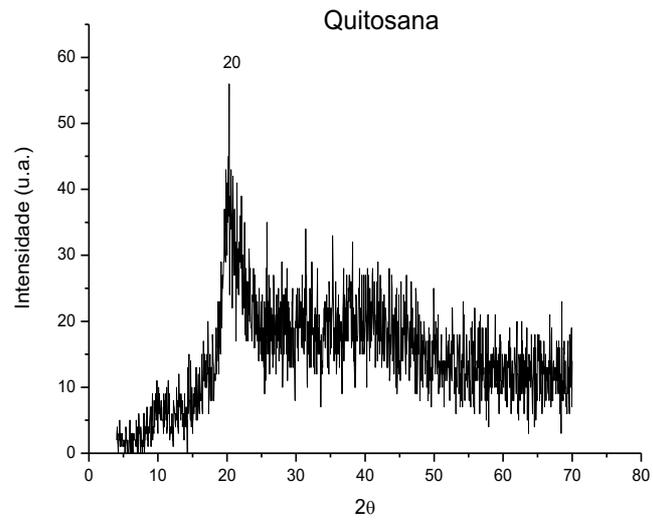


Figura 67. Difratoograma da quitosana.

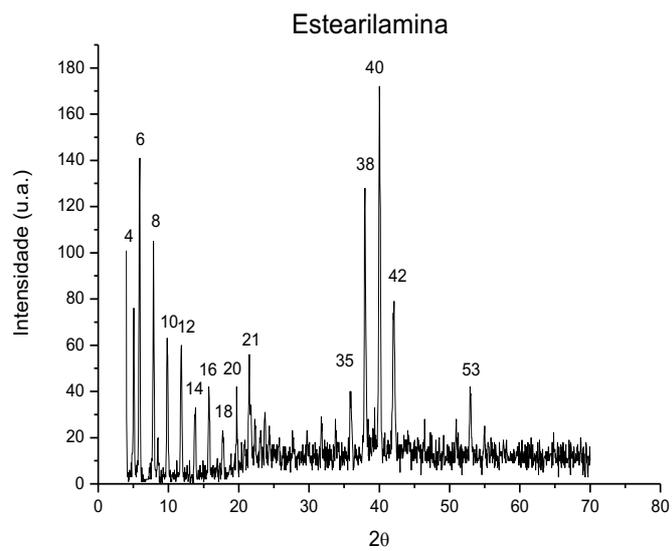


Figura 68. Difratoograma da estearilamina.

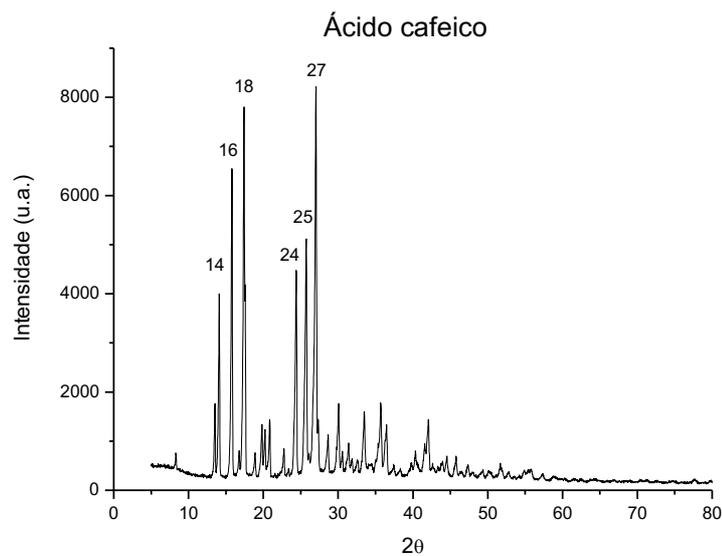


Figura 69. Difratoograma ácido cafeico.

Os difratogramas das misturas físicas I e II e MP I e II estão apresentados, respectivamente, nas Figuras 70, 71, 72, 73.

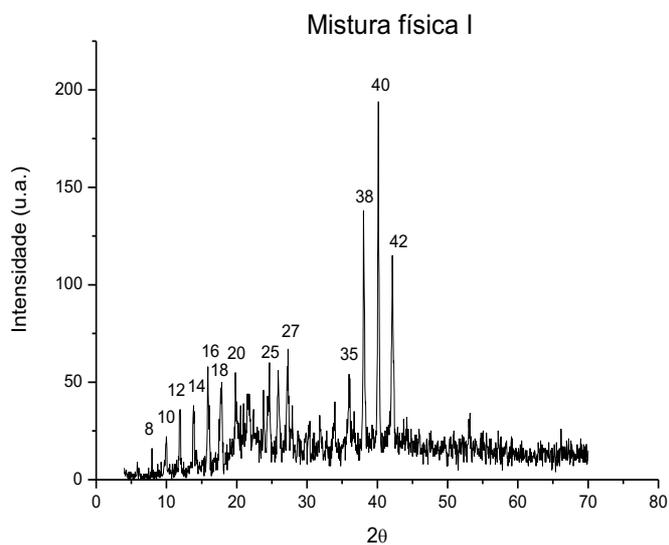


Figura 70. Difratoograma da mistura física I.

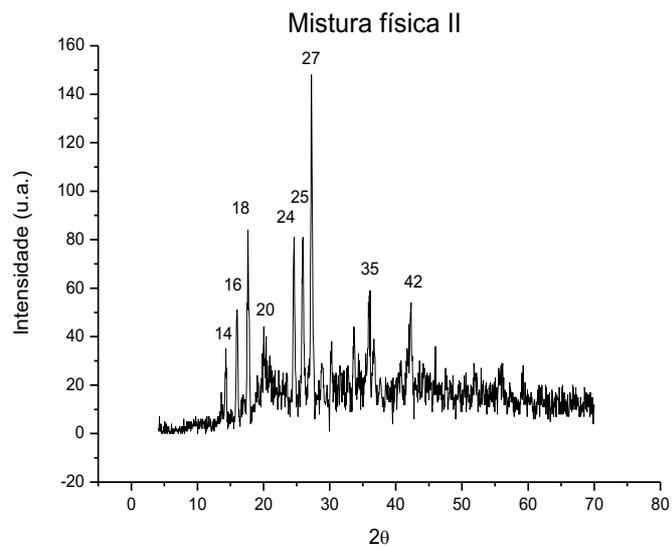


Figura 71. Difratoograma da mistura física II.

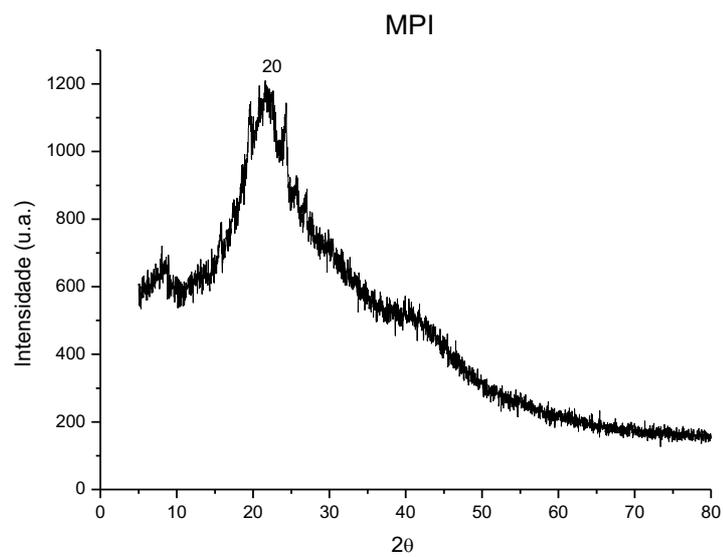


Figura 72. Difratoograma das MPI.

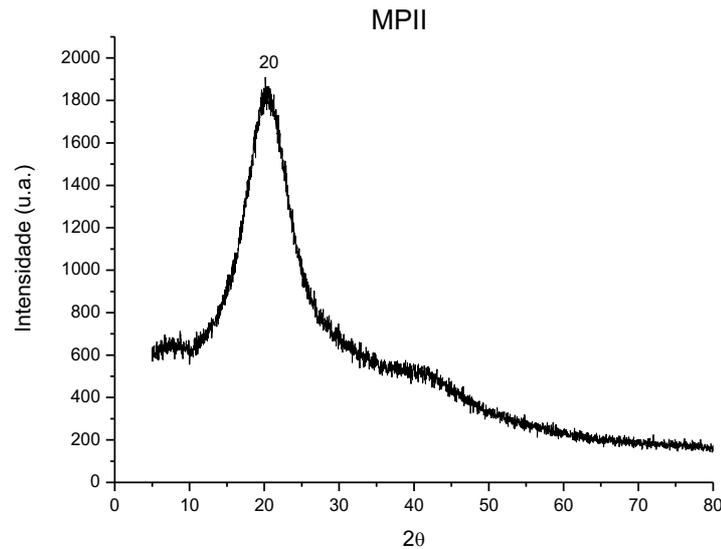


Figura 73. Difratograma das MPIO.

A técnica de difração de raios-X é muito utilizada para estudar e determinar a presença de picos de cristalinidade ou a ausência deles, caracterizando as estruturas não cristalinas.

A partir do difratograma, é possível evidenciar que a quitosana (Figura 67) apresenta característica não cristalina, dados que estão de acordo com a literatura (OSMAN et al., 2013)

Os picos bem definidos no gráfico da estearilamina e do AC (Figura 68 e 69) (SETYAWAN et al., 2014; DESAI et al., 2005), indicam a característica cristalina dessas substâncias.

No difratograma da mistura física I (Figura 70) são observados os picos em 38, 40 e 42° referentes à estearilamina e 24, 25 e 27° referentes ao ácido cafeico. No difratograma da mistura física II (Figura 71) são observados os picos em 24, 25 e 27° referentes ao ácido cafeico. Os picos da estearilamina não são observados, já que ela não está presente nas MPIO.

Os difratogramas das micropartículas (Figuras 72 e 73) indicam que a secagem por atomização favorece a formação de sistemas menos cristalinos. Estes sistemas são favoráveis para desempenhar uma liberação controlada dos fármacos, pois a característica não cristalina facilita o processo de encapsulação ou a liberação dos fármacos na matriz (PEDREIRO, 2015). Essa característica é provocada pela quitosana, que gera uma desorganização na

estrutura cristalina dos fármacos, permitindo uma dispersão sólida na matriz polimérica. Deste modo, a associação dos fármacos com a quitosana originou um sistema menos cristalino com propriedades próprias.

Muitos trabalhos descrevem que quando há perda da cristalinidade, o sistema torna-se amorfo. No entanto, esse termo não é adequado, já que para garantir que um material é realmente amorfo, medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) seriam necessárias.

Comparando o difratograma das MPI e MPIO, observa-se que o halo da MPI apresenta uma intensidade menor e mais largo, comprovando assim, que as MPI são menos cristalinas que as MPIO. A redução na cristalinidade torna as ligações entre os componentes menos estáveis, com um grau organizacional reduzido, favorecendo o processo de liberação. Essa informação pode ser comprovada pelos estudos de liberação, em que as MPI proporcionaram uma liberação mais rápida do ácido cafeico quando comparadas com a liberação mais controlada a partir da MPIO.

Estas informações estão de acordo com informações propostas por autores (OSMAN et al.; 2013), que sugerem que a formação de sistemas amorfos pode ser atribuída às interações a nível intermolecular, entre os componentes do sistema.

5.4.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)/Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG)

Os métodos termoanalíticos, DSC e TG/DTG, foram empregados para avaliar possíveis interações entre o ácido cafeico e o polímero, após processo de obtenção das micropartículas, bem como a estabilidade térmica das substâncias que as compõem.

Para o estudo foram analisadas as substâncias químicas isoladas, as misturas físicas dessas substâncias e as micropartículas. As Figuras 74 a 76 mostram as curvas DSC e TG/DTG da quitosana, estearilamina e ácido cafeico, respectivamente. As Figuras 77 e 78 apresentam as curvas DSC e TG/DTG da mistura física I e mistura física II e as Figuras 79 e 80 as curvas DSC e TG/DTG da MPI e MPIO.

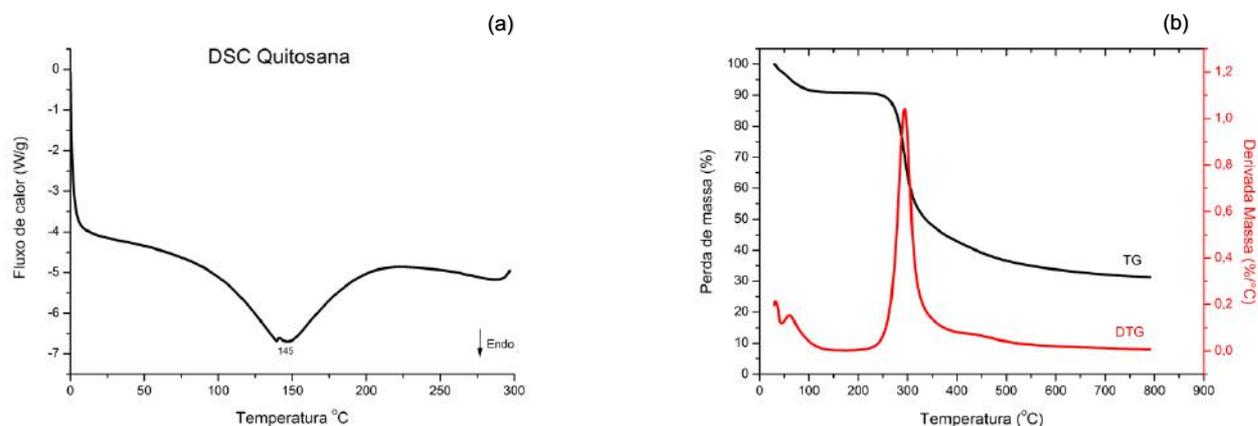


Figura 74. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da quitosana.

A curva DSC da quitosana (Figura 74a) apresenta um evento endotérmico com início em 94,75°C e pico em 145°C com entalpia de 214 J.g⁻¹, o qual pode ser atribuído à perda de água ou resíduo de solventes do polímero. O formato desse pico é bem característico da quitosana (SANTOS et al., 2003). O segundo evento, exotérmico tem início em 290°C, em que começa a ocorrer à decomposição térmica do polímero.

Não se recomenda decompor os fármacos no DSC porque o fluxo de gás que passa é baixo e não consegue varrer os compostos decompostos podendo acarretar contaminação o detector. Por isso, o DSC não é a ferramenta mais adequada para visualizar as decomposições e sim o TG. O TG também da maior precisão para temperaturas de perda de massa como dessolvatação, por isso DSC forneceu uma temperatura mais elevada.

Observa-se na curva de TG/DTG (Figura 74b) que a perda de massa de 8,6% referente ao primeiro evento endotérmico até 100°C ocorre devido à dessolvatação. O segundo evento exotérmico, apresenta perda de massa de aproximadamente 40% em decorrência da decomposição polimérica.

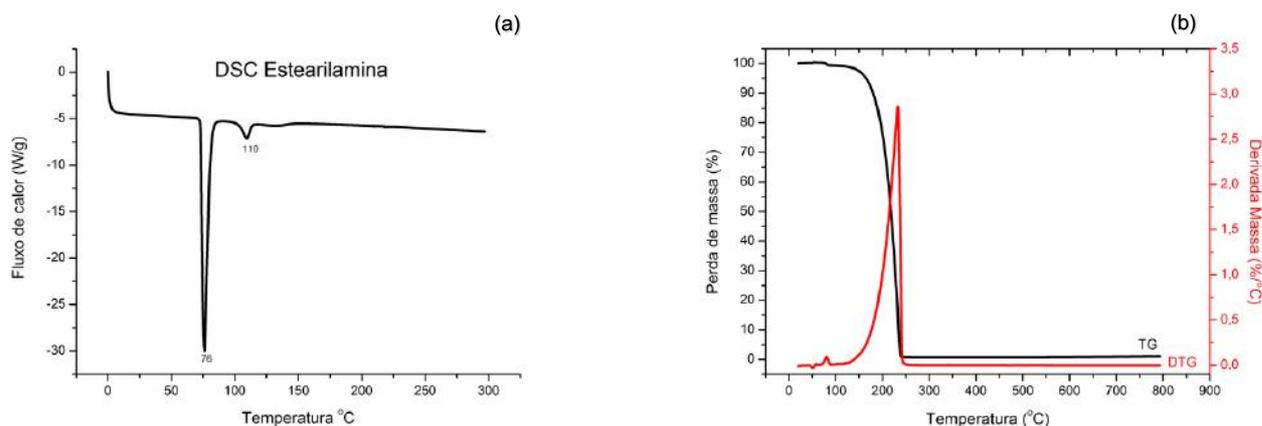


Figura 75. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da estearilamina.

A Figura 75 mostra a curva DSC da estearilamina com dois eventos endotérmicos. O primeiro em 73,2°C com entalpia de 270 J.g⁻¹, que pode ser indicativo da primeira etapa de fusão do material sentida pela balança altamente sensível; o segundo evento em 103,4°C com entalpia de 21,6 J.g⁻¹, pode ser indicativo da segunda etapa da fusão. Os dados são concordantes com a literatura (VILLASMIL-SÁNCHEZ et al., 2013). A curva TG/DTG mostra um pequeno evento perto de 90°C que pode ser referente à consequência do evento de fusão principal demonstrado no DSC. O segundo evento bem evidenciado trata-se de uma perda de massa de praticamente 100% em 150°C que se refere à vaporização da estearilamina.

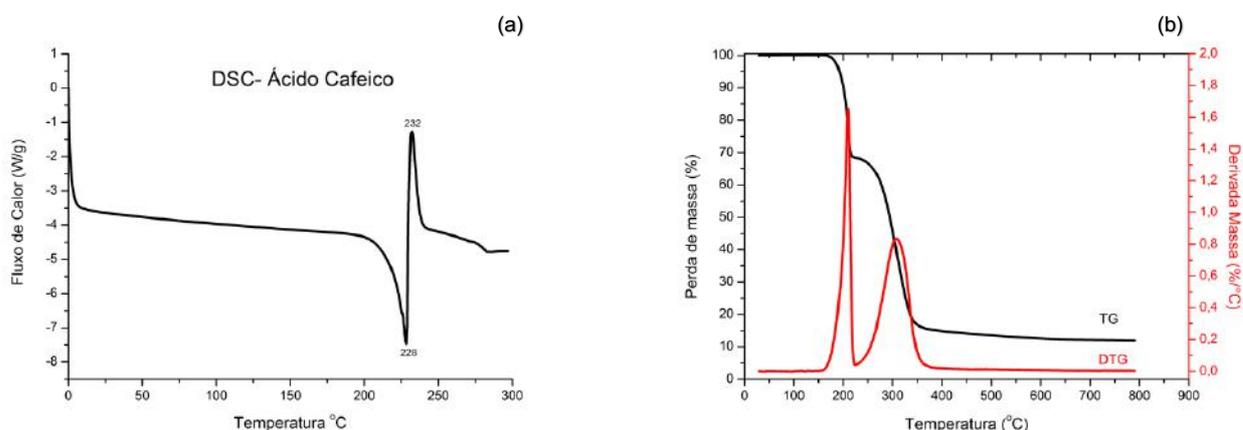


Figura 76. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) do ácido cafeico.

Pelos gráficos de TG e DTG (Figura 76b), o ácido cafeico apresenta duas etapas de decomposição térmica com temperatura inicial de 169,3°C e

216,4°C, com 30% e 55 % de perda de massa, respectivamente. Os valores de decomposição do ácido cafeico estão acima da temperatura de entrada utilizada no *spray dryer*, corroborando com o processo de obtenção das micropartículas.

A curva DSC do ácido cafeico (Figura 76a) apresenta um pico endotérmico a 228°C referente ao pico de fusão, seguido do pico exotérmico a 232°C referente à decomposição do material. Esse dado é condizente com a perda de massa por decomposição encontrada na TG (Figura 76b).

A temperatura de entrada no *spray dryer* (85/180°C) não altera as substâncias utilizadas para produzir as micropartículas, visto que a degradação do polímero tem início em 290°C (Figura 74), da estearilamina (Figura 75) e do ácido cafeico (Figura 76) em aproximadamente 200°C.

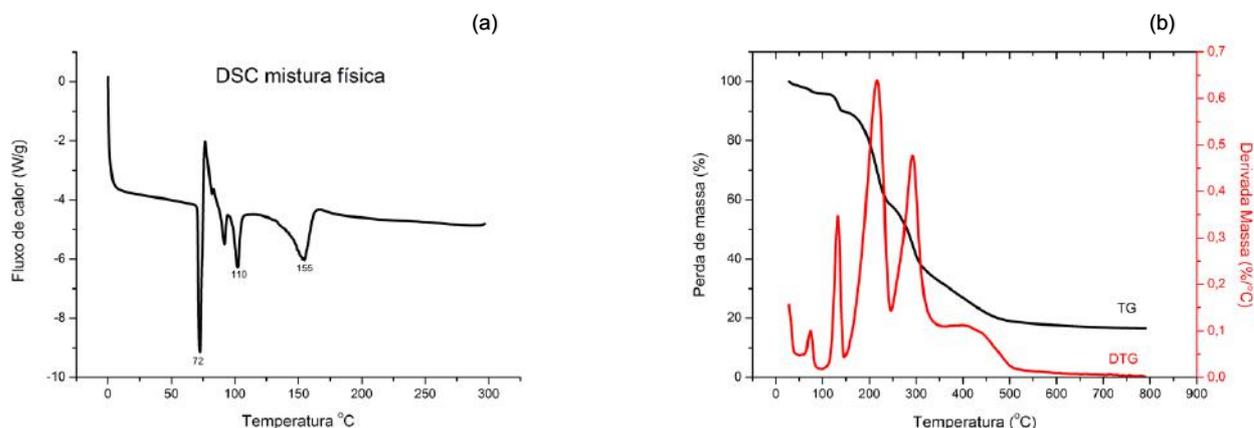


Figura 77. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da mistura física I.

A Figura 77a (mistura física I), a DSC mostra quatro eventos endotérmicos, em 72°C e 110°C indicativo da estearilamina e os demais eventos observados são decorrentes de uma interação entre os componentes, originando um produto com menor estabilidade térmica, como pode ser observado na curva TG/DTG (Figura 77b).

A curva de TG/DTG da mistura física I (Figura 77b) mostra uma perda de massa de 5%, relacionado ao primeiro evento endotérmico antes dos 100°C. Seguida por mais uma perda de massa de 5% com início em 110 °C, a terceira perda de massa foi de 30% com início em aproximadamente 150°C, a partir da qual se inicia a degradação térmica da mistura física, a quarta perda de massa foi de mais 30% com início em aproximadamente 250°C, e por fim a última

perda de massa de 10% com início em 350°C. O primeiro evento apresentado na Figura 76b é decorrente da decomposição da estearilamina já que acontece apenas na Mistura física I e não aparece na II (Figura 78b).

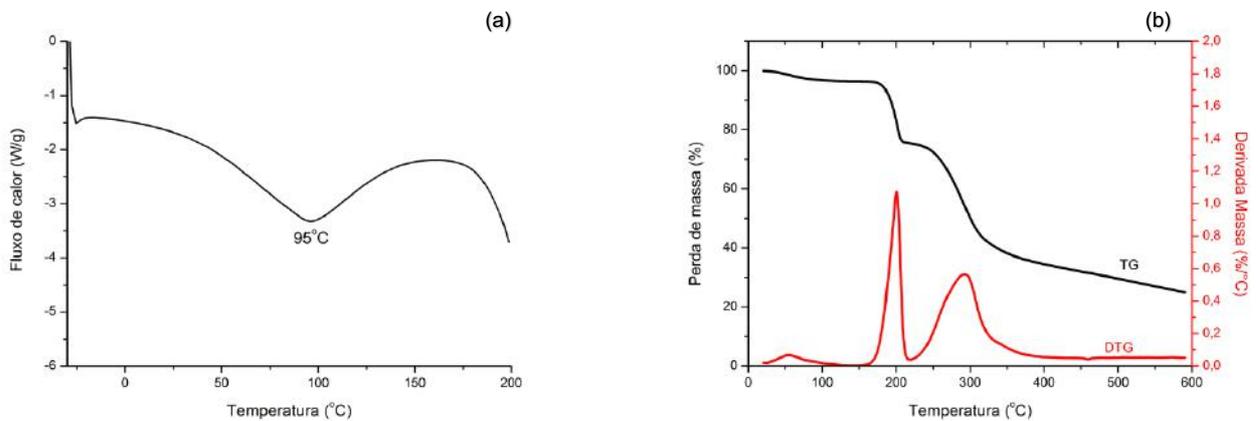


Figura 78. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da Mistura física II

A Figura 78a mostra um evento endotérmico em 95°C característico da quitosana. Os eventos de decomposição do ácido cafeico não foram observados, porque acontecem acima de 200°C. O início do evento endotérmico em aproximadamente 175°C indica o princípio da fusão do AC.

A curva de TG/DTG da mistura física II (Figura 78b) mostra três eventos de perda de massa, o primeiro de 3,1%, o segundo de 21,0% a 174°C correspondente ao AC e o terceiro de 39,7% a 233,8°C que pode ser tanto do AC tanto da quitosana.

Como não foi observado redução da estabilidade térmica da mistura física II, provavelmente o que causou a redução da estabilidade térmica da MPI foi a presença da estearilamina e as interações físico-químicas entre ela e os outros componentes.

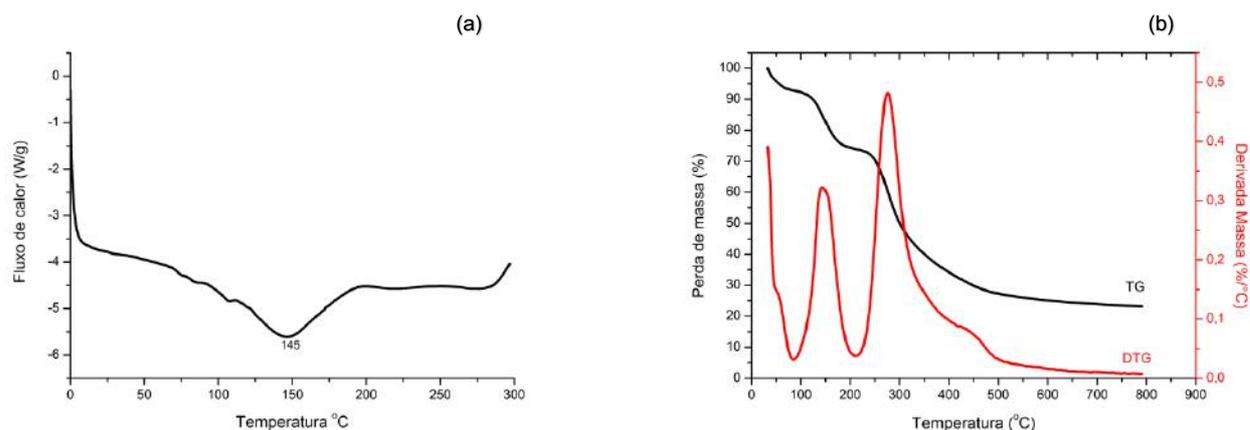


Figura 79. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) das MPI.

Na Figura 79a foi visualizado na curva de DSC da MPI, um pequeno pico endotérmico em aproximadamente 100°C, porém não se pode afirmar com exatidão o que ele representa, por isso foi realizado o ensaio de DSC modulado. O outro evento endotérmico, com temperatura média de 145°C, é devido, provavelmente, à presença predominante da quitosana na micropartícula estruturada. Ressalta-se que essa interação não foi evidenciada na mistura física I dos componentes das micropartículas (Figura 77).

As curvas de TG/DSC da MPI (Figura 79b) apresentam três perdas de massa, a primeira de 10% até 100°C referente à perda de voláteis, a segunda de 15% a 144°C devido à degradação da estearilamina e do ácido cafeico, majoritariamente do AC por conta da baixa concentração de estearilamina nas MP e a terceira perda de 55% a 276°C do AC e quitosana.

No entanto, todos os eventos foram antecipados para temperatura menores, assim como foi observado na mistura física. Assim, o efeito da estearilamina foi observado nesse sistema, mesmo estando em concentrações baixas.

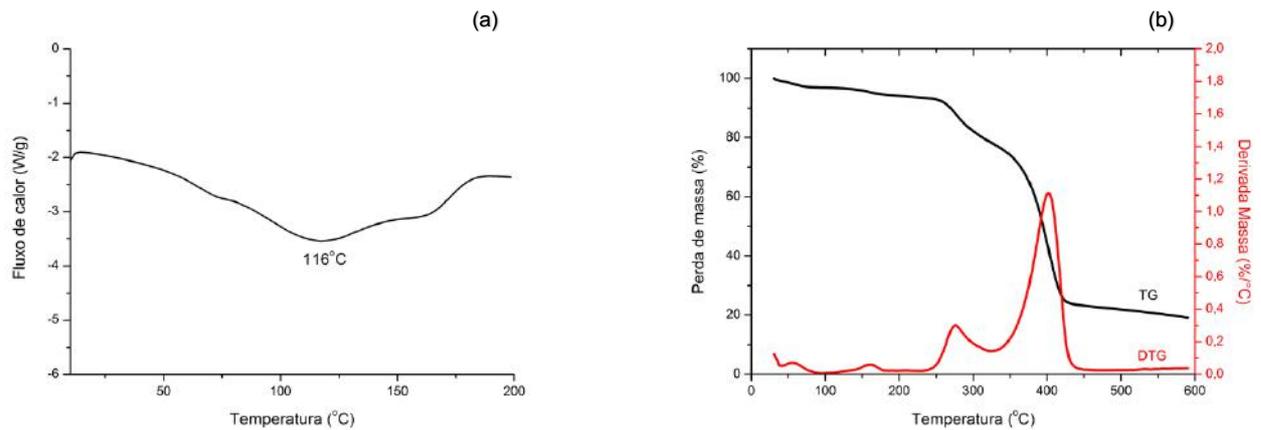


Figura 80. Curvas DSC (a) e TG/DTG (b) da MPII

Na Figura 80a foi visualizado na curva de DSC da MPII e para elucidar os eventos foi realizado o ensaio de DSC modulado. Um evento endotérmico, com temperatura média de 116°C, é devido, provavelmente, à presença predominante da quitosana na micropartícula estruturada.

Foram observadas quatro perdas de massa nas curvas TG/DTG da MPII (Figura 80b). A primeira perda de 3,1% até 100°C referente à perda de voláteis. A segunda de 2,4% a 142°C, a terceira de 14,4% a 248°C e a quarta de 54,5% a 348°C. Esse sistema demonstra maior estabilidade que a mistura física II já que as temperaturas *on-set* foram mais elevadas, assim esse sistema promoveu estabilização do ácido cafeico.

Na Figura 81 são mostradas todas as curvas de DSC realizadas.

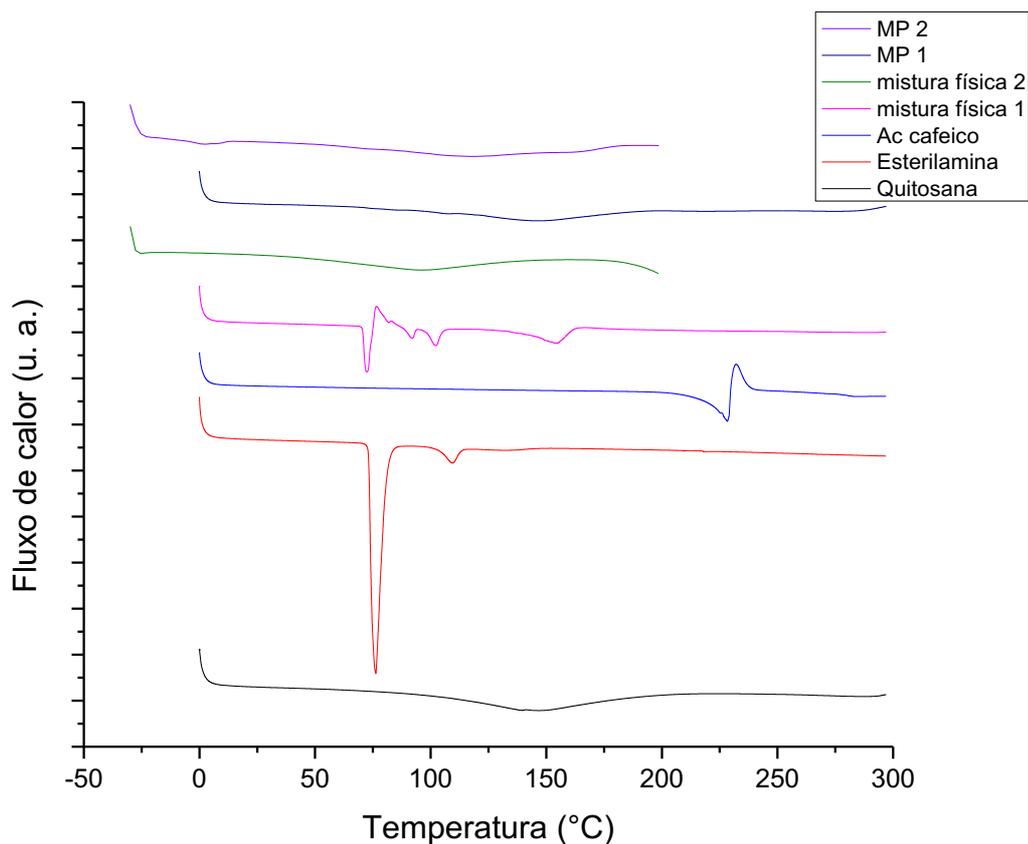


Figura 81. Curvas DSC de todas as substâncias estudadas. MP2: Micropartículas 2; MPI: Micropartículas I; Mistura física 2; Mistura física 1; Ácido cafeico; Estearilamina; Quitosana.

O pico da estearilamina pode ser claramente observado na mistura física I, já na MPI ele não foi visualizado por conta da escala. Para evidenciar a presença da estearilamina na MPI, a curva de DSC modulado foi realizada (Figura 82).

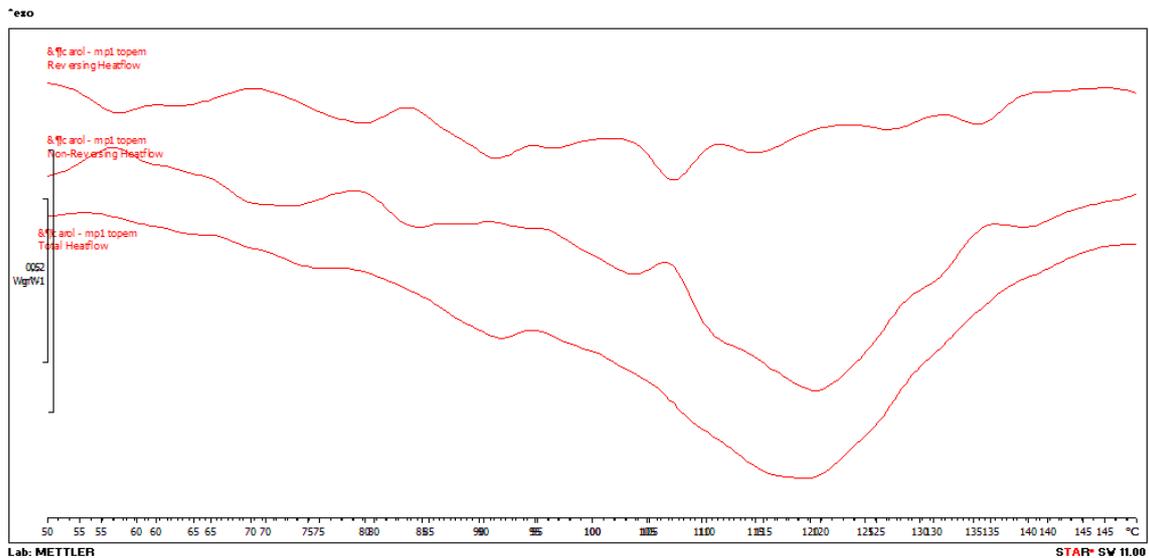


Figura 82. Curvas de DSC modulado da MPI mostrando os eventos reversíveis e irreversíveis.

As curvas de DSC modulado da MPI indicaram que o pequeno pico observado na MPI (Figura 79) em torno de 90°C se deve à fusão, que por ser um evento reversível, aparece na curva de eventos reversíveis e não aparece nos eventos irreversíveis, comprovando a sua presença. Já o segundo pico (115°C) encontrado na MPI aparece na curva de eventos irreversíveis e não aparece na curva de eventos reversíveis, visto que a perda de água não é um evento que pode ser revertido após resfriamento.

Tanto o DSC quanto o DSC modulado possuem a mesma função, ou seja, medir a diferença de calor entre a amostra e a referência; a diferença é que na primeira técnica a taxa de aquecimento é constante e na segunda é senoidal.

No DSC modulado é possível adquirir a curva de eventos reversíveis, irreversíveis e a curva total, que é a soma de ambas. A fusão é um exemplo de evento reversível, no qual independentemente de quantas vezes o material é aquecido ou resfriado, ele continua acontecendo. Em contraste, a decomposição e a evaporação são exemplos de eventos irreversíveis, que uma vez ocorridos, não se repetem.

As curvas de DSC modulado da MPII (Figura 83) mostram que em 90°C se inicia um evento irreversível da quitosana, correspondente à perda de água, corroborando com os resultados encontrados anteriormente.

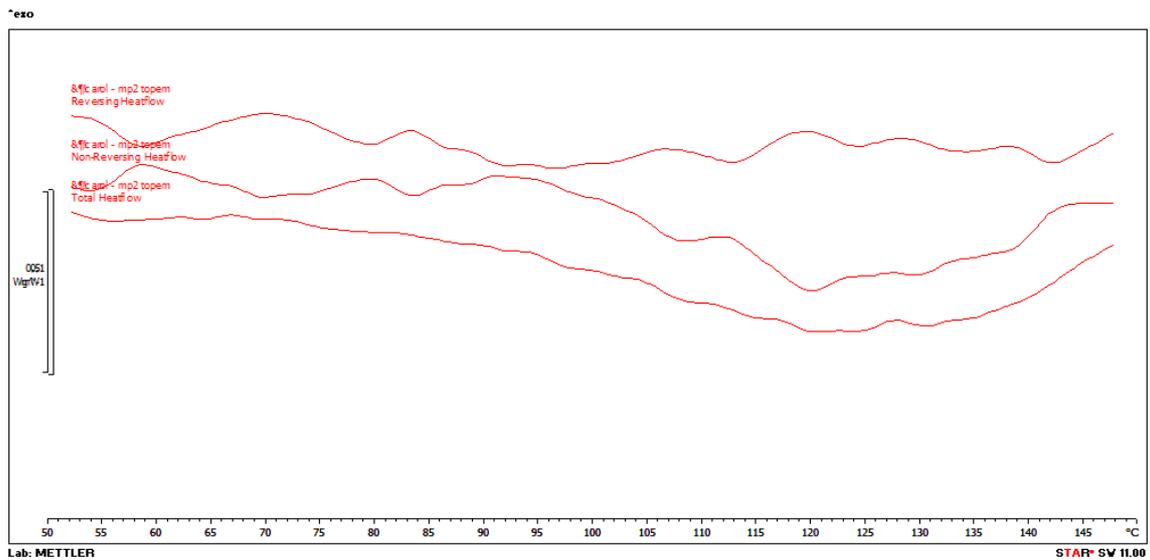


Figura 83. Curvas de DSC modulado da MPlI mostrando os eventos reversíveis e irreversíveis.

A Figura 84 apresenta as curvas de TG/DTG das micropartículas e das misturas físicas. A Figura 85 mostra as curvas de TG/DTG dos compostos isolados.

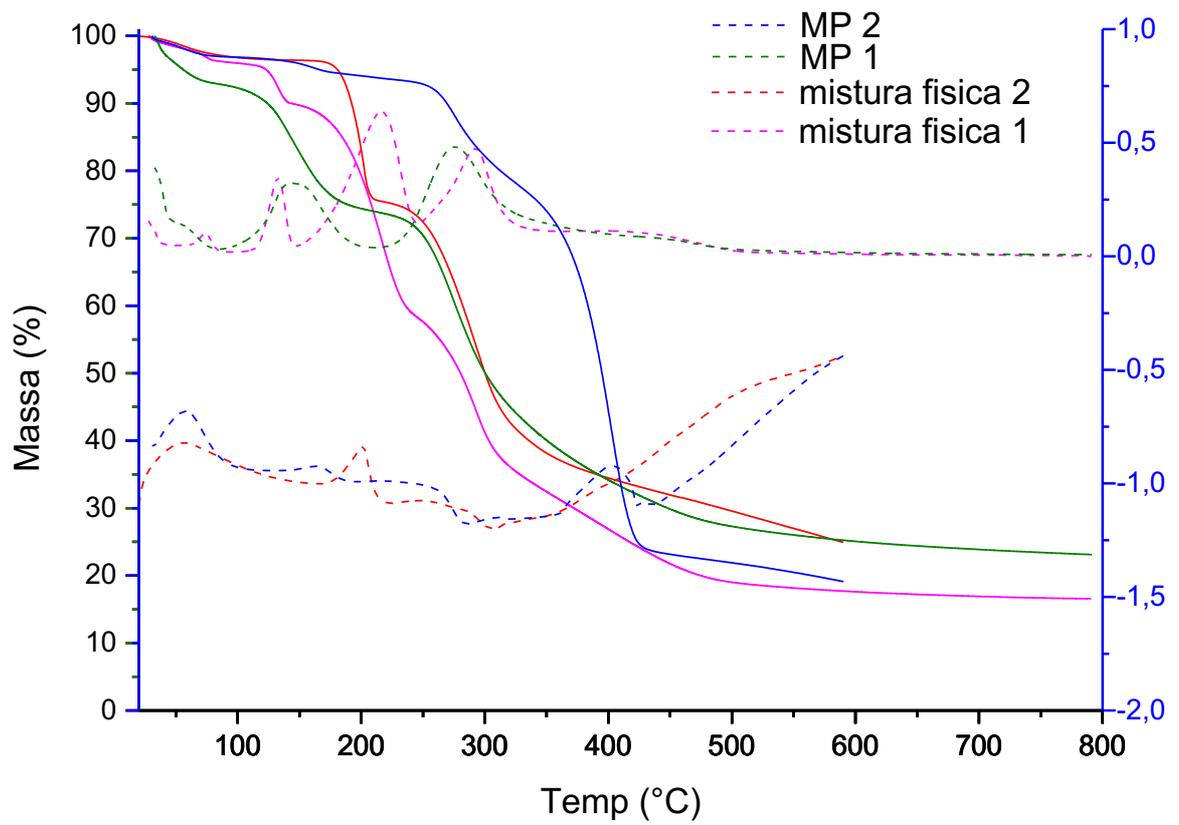


Figura 84. Curvas de TG/DTG da MP2: micropartícula 2, MP1: micropartícula 1; mistura física 2; mistura física 1.

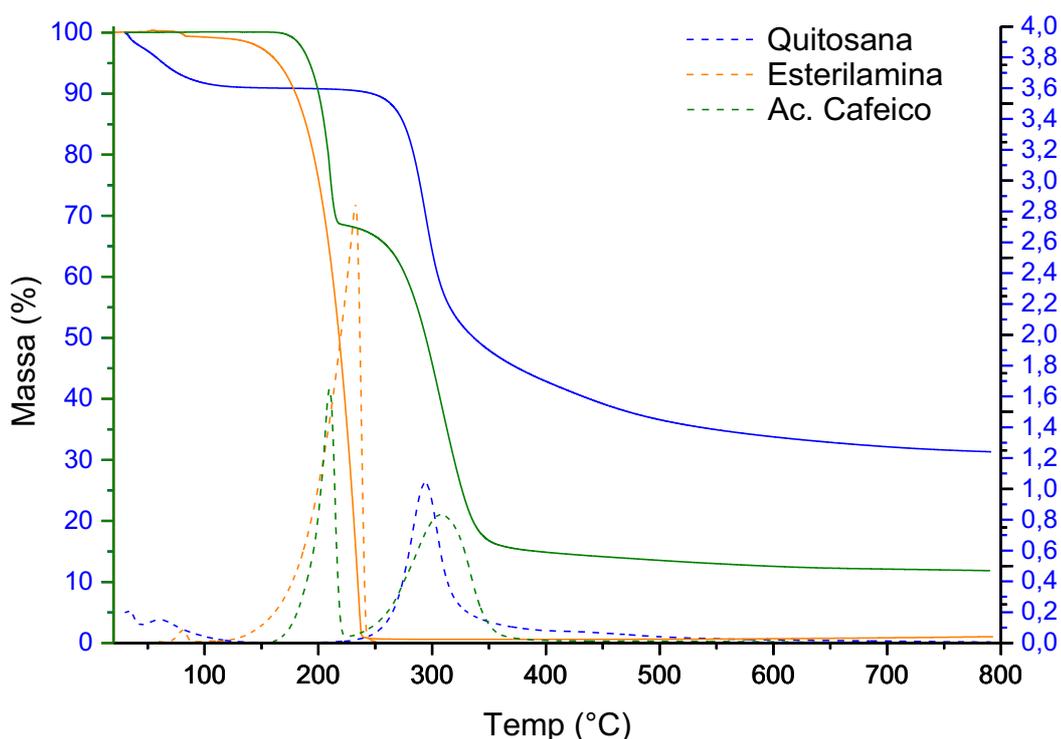


Figura 85. Curvas de TG/DTG da quitosana, estearilamina e ácido cafeico.

Como pode ser observado na Mistura física I, os eventos que acontecem a temperaturas superiores nos compostos isolados, a partir de 150°C, foram antecipados, visto que o primeiro evento acontece a partir de 100°C. Isso pode ter ocorrido por que os materiais interagem entre si, formando outros compostos menos estáveis termicamente, sendo necessário um menor fornecimento de calor para que decomponham. Na mistura física II os componentes se decompõem na mesma temperatura dos componentes isolados mostrando que não há uma interação entre eles.

Comparando a mistura física I e a MPI, observa-se que o evento de decomposição do ácido cafeico e da estearilamina está separado na mistura física em 2 eventos, já na MPI ele aparece como uma única perda de massa, indicando que a matriz está mais homogênea. É relevante destacar que ambas têm a mesma porcentagem de perda de massa e ambas começam mais cedo quando comparadas com os ativos isolados, sugerindo que a estearilamina, presente apenas nestes sistemas, pode estar interferindo na estabilidade. O

segundo evento de perda de massa se interpola na mistura física I e na MPI, que representa a decomposição majoritariamente da quitosana e parte do AC.

Na MP11 o primeiro evento de perda de massa acontece em uma temperatura aproximadamente 100°C maior que na mistura física I, o que implica em um sistema mais organizado e com uma estabilidade térmica muito maior. Destaca-se que o evento do AC que deveria ocorrer em aproximadamente 200°C, não é observado, já que acontece em cerca de 250°C, evidenciando sua estabilização. O segundo evento de perda de massa é a decomposição do sistema total, quitosana e ácido cafeico.

Comparando a MPI com a MP11, a MP11 contribuiu significativamente para aumentar a estabilidade térmica do AC, contribuindo para aumento da *shelf life* do produto. Nesse aspecto a análise térmica foi uma ferramenta de extrema importância para aliar os resultados encontrados na microscopia eletrônica de varredura e os ensaios de liberação. Já que a estrutura organizacional da MP11 mais esféricas, homogêneas e sem poros, proporcionaram maior estabilidade térmica do AC nela contido, tendendo a apresentar um perfil de liberação mais lento.

5.4.5. Determinação do potencial zeta da dispersão de micropartículas

O potencial zeta caracteriza a carga elétrica de superfície das partículas, o qual é influenciado pelo meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão (LEGRAND et al., 1999).

Além disso, tem influência na estabilidade físico-química de sistemas microparticulados, em que as forças repulsivas tendem a evitar a agregação em função das colisões ocasionais entre as partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003).

O valor de potencial zeta da MPI foi $32,4 \pm 0,7$ mV e das MP11 foi $41,6 \pm 1,1$ mV. Nota-se que o potencial zeta das micropartículas de quitosana é positivo nas duas amostras e houve um decréscimo de 9,2 mV da MP11 para a MPI, indicando que a possível presença do ácido cafeico na superfície da MPI pode ter reduzido a carga positiva.

Ressalta-se que o estudo das características de superfície das partículas também é importante por que pode influenciar na interação com sistemas biológicos, através de interações eletrostáticas com membranas biológicas e proteínas, por exemplo (BRAVO-OSUNA, 2007).

Na avaliação da distribuição de tamanho foi verificado um perfil bimodal. As MPI com um pico em 140 μm e outro em 550 μm (Figura 86a) e as MP II com um pico em 140 μm e outro em 480 μm (Figura 86b).

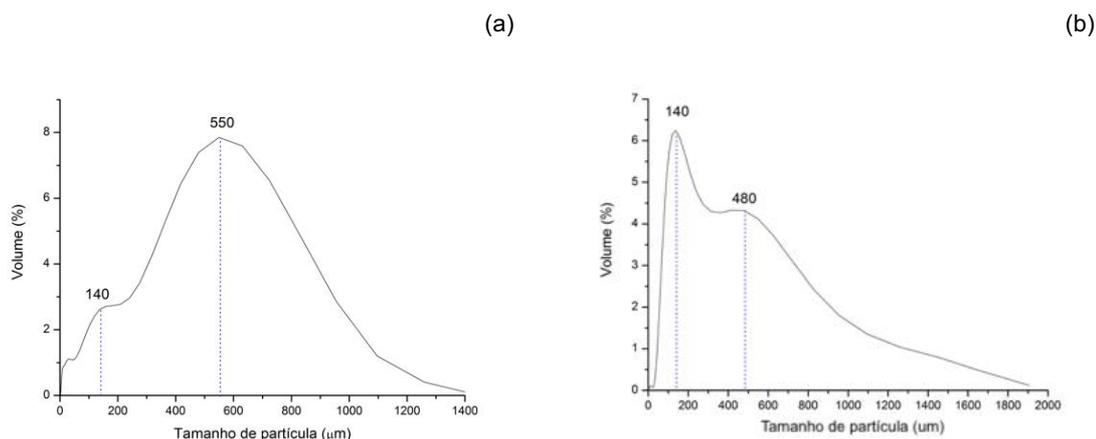


Figura 86. Perfil de distribuição de tamanho das MPI (a) e MP II (b).

Esse perfil discordante com o tamanho real das micropartículas, evidenciado na microscopia eletrônica de varredura (Figuras 54 e 55), pode ser explicado pela dificuldade das micropartículas em manterem sua forma quando em contato com a solução e também devido à tendência em agregação das mesmas (VASCONCELLOS et al., 2011).

5.4.6. Quantificação do AC nas micropartículas

A partir de uma solução de MPI de 10 mg/mL foi obtida concentração de AC de $2,5 \pm 0,2$ mg/mL, e na MP II $1,0 \pm 0,1$ mg/mL. Assim, pode-se afirmar que o AC está em $25,0 \pm 2,0\%$ da MPI e em $10 \pm 1,0\%$ da MP II e esses valores são condizentes com a porcentagem teórica de AC nas respectivas micropartículas.

Considerando que 100mL de solução seriam introduzidos no *spray dryer* para obtenção das MPI, essa solução seria composta por 20mL de dispersão de quitosana 0,5%, 80 mL de etanol, 0,03 g de AC e 0,01g de estearilamina. No entanto, pela curva TG da quitosana (Figura 74) sabe-se que 10% da sua

massa seca é composta por solventes que são eliminados durante o processo de aquecimento até 100°C, então a massa de quitosana de 0,1 g cairia para 0,09 g. Assim, a massa de sólidos resultante seria 0,09 g de quitosana, 0,03 g de AC e 0,01 g de estearilamina, assim a massa de ácido cafeico de 0,03 g corresponde a 23,08% da massa total de 0,13 g dos sólidos presentes, valor que está bem próximo do valor encontrado $25 \pm 2,0\%$ considerando o erro experimental e o desvio padrão entre as replicatas de quantificação.

Seguindo o mesmo raciocínio para a MP11, a solução de entrada do *spray dryer* seria composta por 100 mL de uma dispersão de quitosana 0,5%, 1 g de Polisorbate 80 e 0,15 g de AC. Considerando a perda de massa de 10% da quitosana em compostos voláteis, sua massa cairia de 0,5 para 0,45 g. Assim, a massa de sólidos resultante seria 0,45 g de quitosana, 1 g de Polysorbate 80 e 0,15 g de AC, portanto, a massa de ácido cafeico de 0,15 g corresponde a 9,6% da massa total de 1,55 g dos sólidos ali presentes, valor que está bem próximo do valor encontrado $10 \pm 1,0\%$ considerando o erro experimental e o desvio padrão entre as replicatas de quantificação.

Por esses cálculos é possível concluir que não houve perda de princípio ativo durante o processo de produção pelos dois *sprays dryer* testados.

5.5. Desenvolvimento das formulações

5.5.1. Desenvolvimento do sistema emulsionado

Optou-se por estabelecer alguns parâmetros para o desenvolvimento do sistema emulsionado, tais como: produzir uma emulsão O/A; com viscosidade suficiente para caracterizar um tipo de preparação emulsionada denominada “creme”; e que preferencialmente apresentasse sensorial “leve” ao toque. Para atender a tais objetivos, foram selecionados materiais de uso rotineiro em produtos cosméticos para o desenvolvimento dessas preparações. Além disso, priorizou-se por utilizar um número reduzido de matérias primas, de modo a minimizar possíveis interferentes às análises a serem realizadas. A Tabela 2 apresenta duas fórmulas propostas para o início desse estudo.

A fase hidrofóbica da emulsão foi elaborada com a presença de três materiais graxos distintos, o álcool cetosteárico e o monoestearato de glicerila que atuam como importantes agentes de consistência além do estearato de octila, um éster com propriedade emoliente. Todos são considerados atóxicos, com alta compatibilidade dérmica e com baixo grau de comedogenicidade, sendo amplamente empregados em emulsões (BATISTUZZO et al., 2002; ROWE et al., 2009).

O tensoativo utilizado, álcool cetosteárico etoxilado 20 OE, é do tipo não-iônico. Emulsões contendo este tipo de emulsionante são amplamente empregadas em cosméticos devido a características como: compatibilidade com o pH cutâneo, estabilidade em diversos valores de pH e possibilidade de incorporação de diferentes substâncias ativas, como, por exemplo, o AC, sem gerar possíveis interações químicas que possam comprometer o ativo incorporado e também a estrutura do sistema obtido (JUNGINGER, 1997).

Na fase hidrofílica foram incluídos os conservantes antimicrobianos, metilparabeno e propilparabeno; o propilenoglicol, como umectante e solvente para os parabenos; o EDTA Na₂ (ácido etilendiamino tetra-acético dissódico), um agente sequestrante capaz de formar complexos muito estáveis com diversos íons metálicos e desta forma aumentar o poder de conservação da preparação proposta (ROWE et al., 2009).

Além disso, a fase hidrofílica foi adicionada de um agente de consistência hidrofílico (SANCTIS, 2000). Na formulação E1, o espessante hidrofílico, Rapithix A-100, foi utilizado com a finalidade de produzir aumento da viscosidade da emulsão, sem a necessidade de adição de grandes quantidades de componentes graxos, reforçando desta forma, atender o objetivo primário em conceber uma preparação com sensorial “leve” ao toque. uma vez que a intenção foi obter uma formulação com baixa concentração de material graxo. Além disso, este polímero auxilia no desenvolvimento de formulações estáveis, por causar o espessamento da fase aquosa da formulação, colaborando para a prevenção da separação de fases da emulsão (DEG, 2018).

Inicialmente, foi testada a formulação E1 apresentada na Tabela 2, para veicular as micropartículas de ácido cafeico, já que essa emulsão já havia sido

utilizada para veicular o AC na sua forma livre, quando ainda não disperso em uma matriz polimérica (SPAGNOL et al., 2017).

Foram feitas várias tentativas de incorporação das MP na formulação E1. Primeiramente, as MP foram incorporadas diretamente no creme, em seguida foram previamente dissolvidas em glicerina, para então serem adicionadas no creme, por fim, elas foram adicionadas em uma alíquota da água da emulsão e depois incorporadas no volume total. Em todos os casos ocorreu formação de grumos, fornecendo um aspecto sensorial desagradável e não uniformidade de conteúdo.

Em seguida o Sodium Polyacrylate (Rapithix A-100) foi substituído pelo Sodium Polyacrylate, Hydrogenated Polydecene, Trideceth-6 (Rapithix A-60) mantendo a mesma porcentagem de 1,5% na formulação (E2). Tal proposta objetivou manter a tentativa de emprego do Sodium Polyacrylate, porém adicionado de um tensoativo, o Trideceth-6. Caso o problema ou dificuldade de incorporação encontrado fosse devido a falta de tensoativo, seria obtida uma resposta positiva. Porém, os mesmos problemas permaneceram diante da incorporação das MP.

Desta forma, a suspeita de que o Sodium Polyacrylate poderia ser incompatível com as MP estava se confirmando. Para comprovar essa possibilidade, foi adicionado 0,015 g de MP, 1 g de glicerina, 0,05 g de Rapithix e 4 g de água para verificar se apenas esses constituintes isolados teriam compatibilidade. Como esperado, a resposta foi negativa, já que essa formulação teste também apresentou grumos e aspecto heterogêneo.

Uma possível explicação para essa incompatibilidade seria que o Rapithix A-100 e o Rapithix A-60 são compostos pelo poliacrilato de sódio, um sal sódico do ácido poliacrílico. Tal polímero, possui a característica de ser um polieletrólito aniônico cujos grupos carboxílicos estão carregados negativamente em sua cadeia principal. Dessa forma, esses grupos podem formar agregados com a quitosana que apresenta cargas positivas ao longo da sua estrutura (Figura 87).

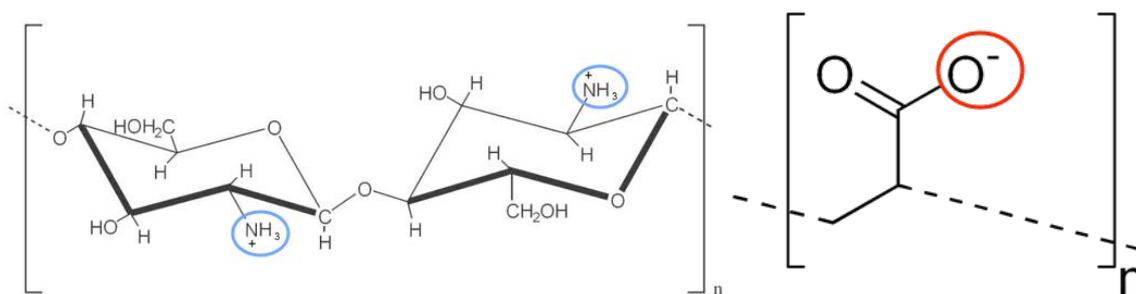


Figura 87. Fórmula estrutural da quitosana e do poliacrilato de sódio.

A Figura 88 procura demonstrar a possível interação eletrostática entre o poliacrilato de sódio com carga negativa e a quitosana positiva.

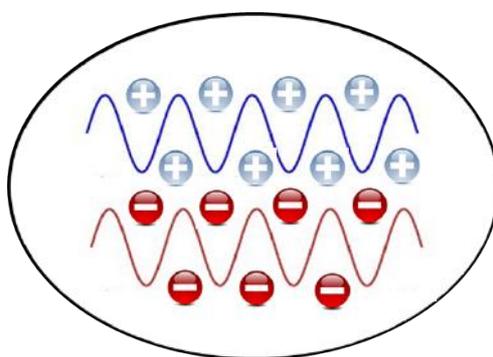


Figura 88. Formação de agregados entre as cargas opostas do poliacrilato de sódio (carga negativa) e da quitosana (carga positiva).

Posteriormente, o Sodium Polyacrylate foi removido da composição da formulação e diversas outras emulsões foram testadas, conforme apresentado na Tabela 3.

Os Steareths são matérias-primas preparadas por reação de óxido de etileno com álcool estearílico, em que o valor numérico do nome corresponde ao número médio de unidades de óxido de etileno. Por exemplo, o Steareth-2 representa que o álcool estearílico recebeu um valor médio de 2 mol de óxido de etileno (WILLIAMS & SCHMITT, 1992).

Todas as formulações dessa etapa (E3-E7) apresentaram viscosidade muito baixa. As formulações E3-E6 separaram fases logo após a remoção da agitação e a formulação E7 separou fase após ser submetida à centrifugação de 1800 rpm por 5 minutos.

Em seguida foi testada uma emulsão catiônica e outras cinco formulações não-iônicas, variando o sistema tensoativo (Tabela 4).

A fórmula E8 apresenta como tensoativo a estearamidopropil dimetilamina, que foi escolhida por ser um agente tensoativo que apresenta carga positiva após neutralização com ácido láctico, assim, buscava-se possível compatibilidade da emulsão, agora catiônica, com as MP de quitosana que também são positivamente carregadas (WILLIAMS & SCHMITT, 1992).

O PPG-5-Ceteth-20, conhecido comercialmente por Procetyl™ AWS é um tensoativo líquido não iônico solúvel em álcool e água, amplamente utilizado no preparo de emulsões e também como um importante agente solubilizante para fragrâncias. É representado quimicamente, pelo álcool cetílico que recebeu o valor médio de 20 mol de oxido de etileno e 5 mol de óxido de propileno. Esta composição proporciona ao ingrediente uma grande multifuncionalidade, porém com destaque para a atividade tensoativa, emulsionante e solubilizante (WILLIAMS & SCHMITT, 1992).

O Polysorbate 60, conhecido comercialmente como Tween™ 60, é um co-emulsificador de óleo em água para uso em produtos cosméticos. Produz emulsões estáveis, especialmente quando usado com álcool cetílico ou estearílico. O Tween™ 60 é amplamente usado em preparações de cuidados pessoais como cremes, géis e produtos de limpeza (O'LENICK JR & O'LENICK, 2008).

A série Tween™ é composta por tensoativos derivados de polioxietileno dos produtos da série Span™. Os tensoativos Tween™ são hidrofílicos, geralmente solúveis ou dispersíveis em água e solúveis em líquidos inorgânicos de graus variáveis (O'LENICK JR & O'LENICK, 2008).

As formulações E8 e E9 apresentaram-se muito fluidas e as de E10 a E13 separaram fase. Assim, a proposta de mexer no equilíbrio hidro- lipofílico do sistema tensoativo não foi eficiente para estabilização da emulsão.

A quarta etapa do desenvolvimento das emulsões consistiu de três emulsões, cujas composições estão apresentadas na Tabela 5.

Algumas modificações foram realizadas da E8 para a E14, a fim de aumentar a fase graxa da emulsão catiônica, na tentativa de estabilizá-la e torná-la mais viscosa. Desta forma, a porcentagem de álcool cetosteárico foi aumentada de 4 para 6%, a porcentagem de monoestearato de glicerila de 1 para 3%, e a porcentagem do tensoativo álcool cetosteárico etoxilado 20 OE de 0,4 para 1%. Essa emulsão apresentou homogeneidade antes e após a

adição das MP e a viscosidade de um creme adequado para uso facial, a que se destina.

A formulação E9 foi modificada para a E15 aumentando de 1 para 3 a porcentagem de monoestearato de glicerila e 1 para 3 a porcentagem de estearato de octila, resultando em uma emulsão mais viscosa, mas ainda com viscosidade de loção e não de creme para aplicação facial.

A E16 apresentou composição similar a E15, diferindo apenas pela substituição do emoliente estearato de octila por triglicerídeos do ácido cáprico/caprílico, mantendo a mesma proporção de 3%. No entanto, essa modificação não corroborou com a viscosidade da emulsão.

Com objetivo de aumentar a viscosidade, foi proposta a emulsão E17. Trata-se de um sistema similar a proposta E15 acrescida de álcool cetosteárilico, que a anterior E15 encontrava-se com 4% e na atual proposta E17, recebeu concentração de 6%. Além disso, aumentou-se a concentração de álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE de 1% para 2% (Tabela 6).

Em seguida, tomou-se uma alíquota de 5 g da emulsão E14 e 5 g da E17 e adicionou-se 1% da MPI em cada uma. Essa concentração foi escolhida com finalidade experimental, apenas para critério de escolha da formulação mais adequada para continuidade dos estudos.

Ambas se mantiveram com aspecto homogêneo e assim foram submetidas ao estudo piloto de liberação, a fim de verificar se a carga da emulsão poderia influenciar na liberação do AC. Como as diferenças encontradas na quantidade liberada não foram significativas, conforme pode ser observado na Figura 89, a E17 (Figura 90), com sensorial mais agradável, foi a escolhida para prosseguimento dos testes de liberação e permeação cutânea.

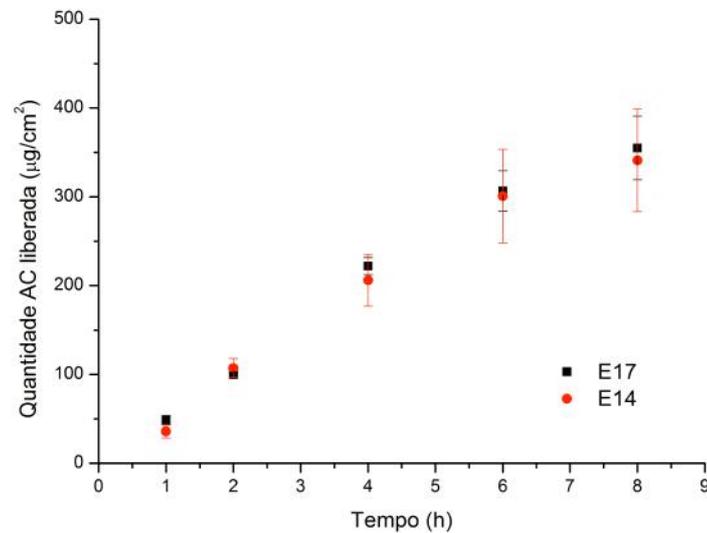


Figura 89. Teste piloto de liberação das formulações E14 e E17.



Figura 90. Emulsão E17 base e emulsão E17 com AC.

5.5.2. Desenvolvimento de um sistema em filme

Como não existem produtos em filme contendo AC no mercado, a proposta foi trazer algo inovador, a fim de comparar os resultados dos testes, quando possível, com uma emulsão clássica.

O Pullulan® utilizado nesta formulação é um material cuja viscosidade não é afetada por aquecimento, por mudanças de pH e pela maioria dos íons; apresenta excelentes propriedades adesivas quando seco, sendo capaz de formar um filme transparente, incolor, impermeável ao oxigênio, com excelentes propriedades mecânicas e que se dissolve facilmente em água,

sendo ainda biodegradável. Por essas propriedades, o mesmo foi escolhido como agente formador de película (SINGH et al., 2008).

O Pullulan® forma soluções aquosas viscosas, mas não forma géis, por isso, como agente geleificante foi utilizado o RapiThix™ A-100 (*sodium polyacrylate*), homopolímero aniônico pré-neutralizado (SINGH et al., 2008).

A hidroxietilcelulose, conhecida como HEC, é um éter não iônico, obtido do processamento da celulose de algodão ou polpa de celulose. A celulose é tratada quimicamente com óxido de etileno, resultando na HEC, um espessante de emprego geral, solúvel em água em temperatura ambiente, biodegradável, fisiologicamente inerte e forma um hidrocoloide com diversas aplicações na indústria. De forma geral pode-se afirmar que a hidroxietilcelulose é usada como um material que apresenta as seguintes funções: espessante, estabilizante, elemento formador de película, anti-sedimentante, emulsionante, retentor de água e gelificante (formação de gel) (O'LENICK JR & O'LENICK, 2008).

O benzoato de alquila C12-C15 é uma mistura de ésteres de ácido benzoico e álcoois que possuem comprimentos de cadeia de carbono de 12 a 15. Nos produtos cosméticos o C12-15 Alkyl Benzoate funciona como agente de condicionamento da pele, ou seja, como emoliente. Os ésteres de benzoato de alquila de cadeia longa, tais como benzoato de alquila C12-15, são líquidos com característica lipofílica de baixa viscosidade. Quando usados em produtos cosméticos, proporcionam um condicionamento leve e sedoso após o contato com a pele. Por esse sensorial agradável é que foi escolhido para integrar o filme F4 e reduzir o sensorial pegajoso muitas vezes conferido pela HEC (O'LENICK JR & O'LENICK, 2008).

Álcool cetílico etoxilado e propoxilado (PPG-5- Ceteth-20), mais conhecido comercialmente por Procetyl™ AWS é um surfactante líquido não iônico solúvel em álcool e água. Foi escolhido para integrar a F5 por sua característica emulsificadora (WILLIAMS & SCHMITT, 1992).

A hidroxipropil metilcelulose (HPMC) é um pó branco a amarelado ou acinzentado, higroscópico. É solúvel em água fria formando uma solução coloidal. É obtida por modificação química da celulose, que garante suas propriedades uniformes, em oposição aos hidrocoloides de fontes naturais que apresentam alta variabilidade. Além disso, apesar da presença de grupos

hidrofóbicos na cadeia HPMC, este polímero mantém parcialmente as propriedades hidrofílicas. Essas propriedades permitem que o HPMC atue como um emulsionante e como um polímero formador de filme (WILLIAMS & SCHMITT, 1992).

Os filmes F1 e F2 (Tabela 7) apresentavam-se inicialmente translúcidos, incolores, flexíveis, com superfície contínua e lisa, no entanto, com a adição das MPs ocorreu formação de aglomerados similarmente ao ocorrido com o sistema emulsionado (item 5.5.1).

Os filmes F3 e F4 separaram as fases logo após o preparo. O F5 não separou fase, mas também não formou filme após secagem.

A formulação escolhida foi a F6, o filme contendo hidroxipropil metilcelulose (Figura 91), para incorporação das MP e prosseguimento dos testes de liberação e permeação cutânea, já que se apresentou flexível, com superfície contínua e homogênea.

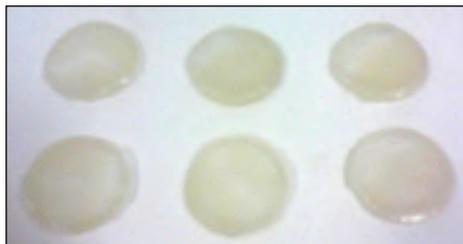


Figura 91. Formulação em filme F6.

5.6. Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do AC

5.6.1. Estabilidade do AC na solução receptora

No presente estudo, os valores de pH 5,5 e 7,4 foram escolhidos por serem valores representativos do pH fisiológico da superfície da pele e dos fluidos fisiológicos, respectivamente (MELERO et al., 2008). O valor de 5,5 representa a média do pH da superfície da pele, visto que a pele em si não possui valor de pH. A superfície da pele apresenta pH em função da secreção recebida e distribuída sobre ela, que oscila na faixa de 4 a 6 (LEONARDI et al., 2002).

O pKa do AC foi calculado usando *software* ACD/Labs 6.0 que exibiu valores de 12,79 e 9,97 para as hidroxilas e 4,04, para o grupo carboxílico presentes na estrutura química do AC (Figura 6). Em pH acima de 7, o ácido

cafeico dimeriza após a oxidação dos grupos OH, tornando-se um novo produto sem capacidade antioxidante (FRIEDMAN et al., 2000; MAGNANI et al., 2014a), essa informação explica a maior degradação do AC observada neste estudo em pH 7,4.

Para integrar a solução receptora juntamente com o tampão fosfato de sódio pH 5,5, o etanol foi selecionado por facilitar a solubilização do ácido cafeico no meio, garantindo as *sink conditions*. Trabalhos anteriores demonstraram que o etanol afeta menos a pele do que tensoativos, metanol ou outros solventes. Até 50% de etanol pode ser utilizado para garantir as *sink conditions*, mas acima disso pode mudar as propriedades da pele. Os tensoativos possuem baixa pureza, sofrem variações dependendo do lote de fabricação, além de alterarem as propriedades da pele, assim como o metanol (MELERO et al., 2008; MELERO, 2009).

O gráfico apresentado na Figura 92 mostra que a solução tampão fosfato de sódio pH 7,4 + etanol (50:50) provocou a degradação do ácido cafeico a partir de 8h de estudo. Assim, a solução tampão fosfato de sódio pH 5,5 + etanol (50:50) foi a selecionada para prosseguimento dos estudos de liberação *in vitro*.

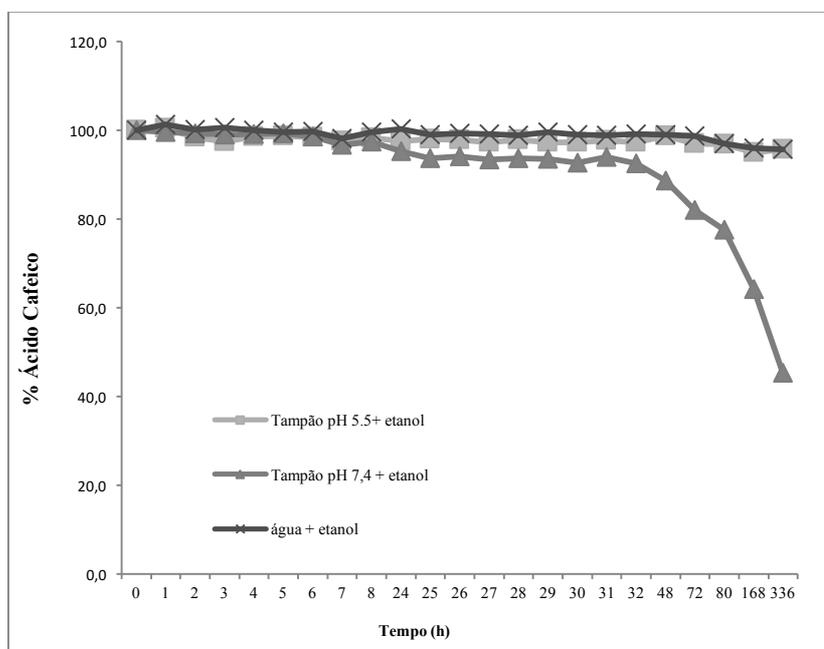


Figura 92. Estabilidade do ácido cafeico em três diferentes tipos de soluções receptoras, tampão pH 5,5 + etanol (50:50); tampão pH 7,4 + etanol (50:50); água + etanol (50:50) ao longo de 336 h.

5.6.2. Estudo de liberação

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia, España, sob financiamento BEPE Fapesp (2016/06742-7).

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol (50:50).

A Figura 93 demonstra que as MP11, obtidas a partir de uma solução aquosa, apresentaram uma liberação mais lenta e controlada que as obtidas a partir de uma solução hidro alcoólica, as MP1.

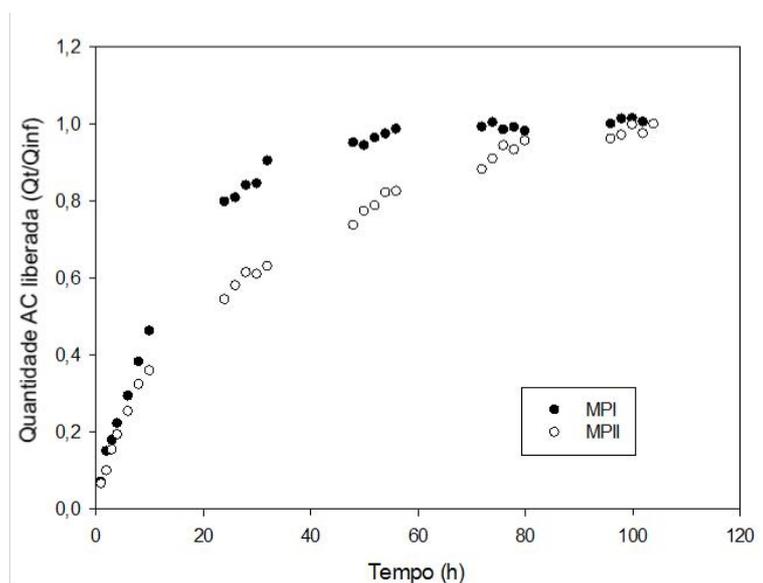


Figura 93. Perfil de liberação do AC a partir das dispersões de MPI e MP11 ao longo de 104 h (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

Nas primeiras 10 h de liberação, as partículas MPI apresentaram perfil de liberação ordem zero (Figura 94) e assíntota da curva nas próximas horas indica que ocorreu equilíbrio entre as concentrações das fases receptora e doadora.

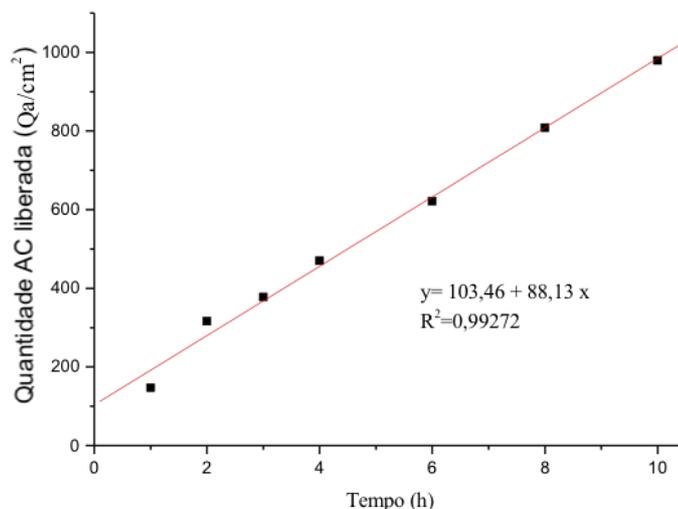


Figura 94. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir da dispersão de MPI nas primeiras 10 h. cm²

O modelo de ordem zero descreve a dissolução do ativo a partir de matrizes que não desagregam e liberam o fármaco lentamente, pode ser representada pelas equações 5 e 6.

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \quad \text{Equação (5)}$$

O rearranjo da equação (5) produz:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad \text{Equação (6)}$$

Em que:

Q_t é a quantidade de fármaco dissolvida no tempo t ,

Q_0 é a quantidade inicial de fármaco na solução (a maioria vezes, $Q_0 = 0$),

K_0 é a constante de liberação da ordem zero expressa em unidades de concentração/tempo.

Para estudar a cinética de liberação, os dados obtidos nos estudos de liberação do AC *in vitro* foram plotados quanto a quantidade cumulativa de AC liberada em função do tempo (HADJIIOANNOU et al., 1993; NARASIMHAN et al., 1999).

Esse modelo ordem zero descreve a dissolução do fármaco de vários tipos de formas farmacêuticas de liberação modificada, tal como em alguns tipos de sistemas transdérmicos, bem como em matriz com ativos de baixa

solubilidade, sistemas osmóticos, etc. (LIBO & REZA, 1996; FREITAS & MARQUETTI, 2005, DASH et al., 2010).

A Figura 95 mostra que o perfil de liberação de Power não se ajustou bem para as MPI, no entanto a Figura 96 comprova que esse modelo descreve perfeitamente o perfil de liberação controlada das MPIO.

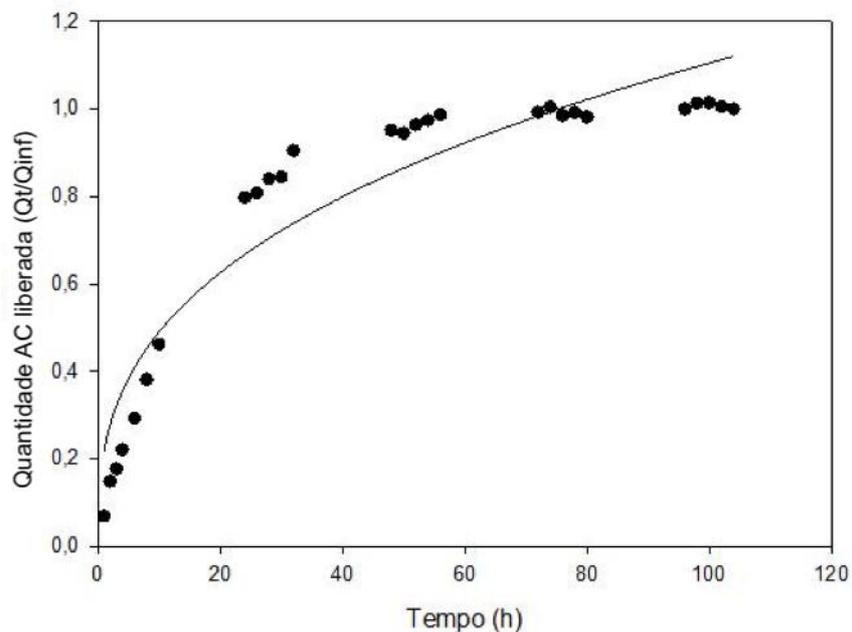


Figura 95. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir da dispersão de MPI (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

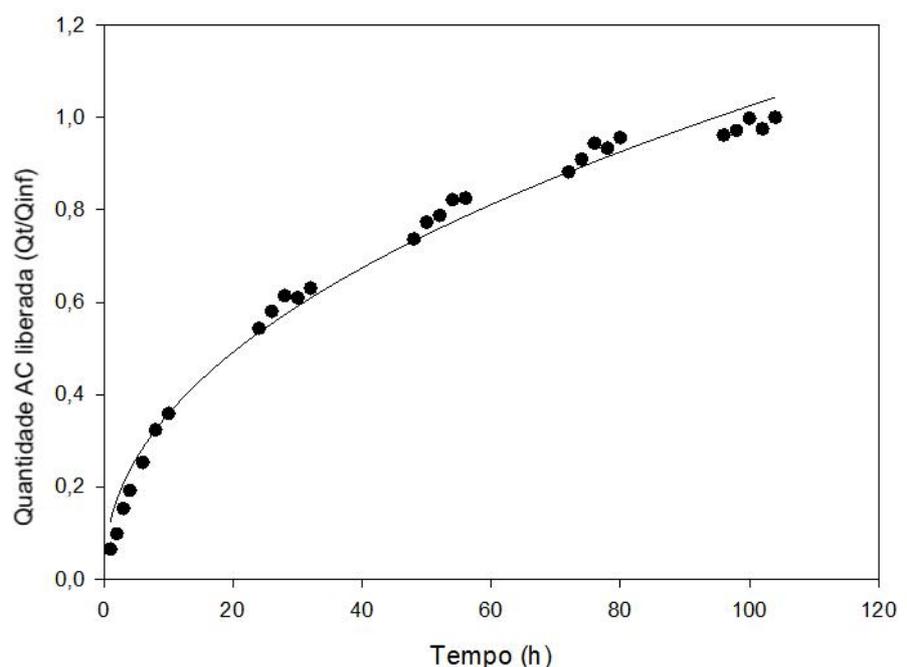


Figura 96. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir da dispersão de MP11 (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

O modelo matemático de Power, definido por Peppas (1985), representado pela equação (7), foi utilizado por ser muito versátil.

$$\frac{Q_t}{Q_{inf}} = k * t^n \quad \text{Equação (7)}$$

Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente, k é uma constante que inclui características geométricas do dispositivo e n é o expoente de liberação, indicativo do mecanismo de liberação do fármaco. Um caso especial do mesmo é a relação de Higuchi, em que $n = 0,5$ que pode ser usada para facilitar as comparações.

Através da curva do perfil de liberação de Power do AC a partir das MP11 foi possível calcular alguns parâmetros de liberação. O valor de K_d ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$) = 0,1249, que indica o valor da constante de velocidade que rege o processo, foi retirado a partir do valor de a da curva. O valor de $n = 0,4570$, que é um expoente de liberação difusional, foi retirado a partir do valor de b da curva. Segundo Berrozpe et al. (2013), valores de $0,43 < n < 0,5$ são indicativos de que o processo de liberação está governado por intumescimento ou erosão da matriz.

O coeficiente de determinação, também chamado de r^2 , é uma medida de ajustamento de um modelo estatístico em relação aos valores observados. O r^2 varia entre 0 e 1, indicando, em percentagem, o quanto o modelo consegue explicar os valores observados. Quanto maior o r^2 , mais explicativo é o modelo, melhor ele se ajusta à amostra. No caso, o r^2 do modelo de Power é 0,9927, isto significa que 99,27% da variável dependente consegue ser explicada pelos regressores presentes no modelo.

A regressão não linear foi realizada por meio do software Sigmaplot®10.0. A qualidade do ajuste foi avaliada pela correlação entre valores experimentais e valores preditos pelo modelo. O intervalo de confiança ($\alpha = 0,05$) foi considerado para os parâmetros a fim de tirar conclusões sobre os mecanismos de liberação.

A Figura 97 demonstra o perfil de liberação do AC a partir dos filmes de MPI e MP11 ao longo de 104 h, confirmando que o filme de MP11, apresenta liberação do AC mais lenta e controlada quando comparado ao filme de MPI.

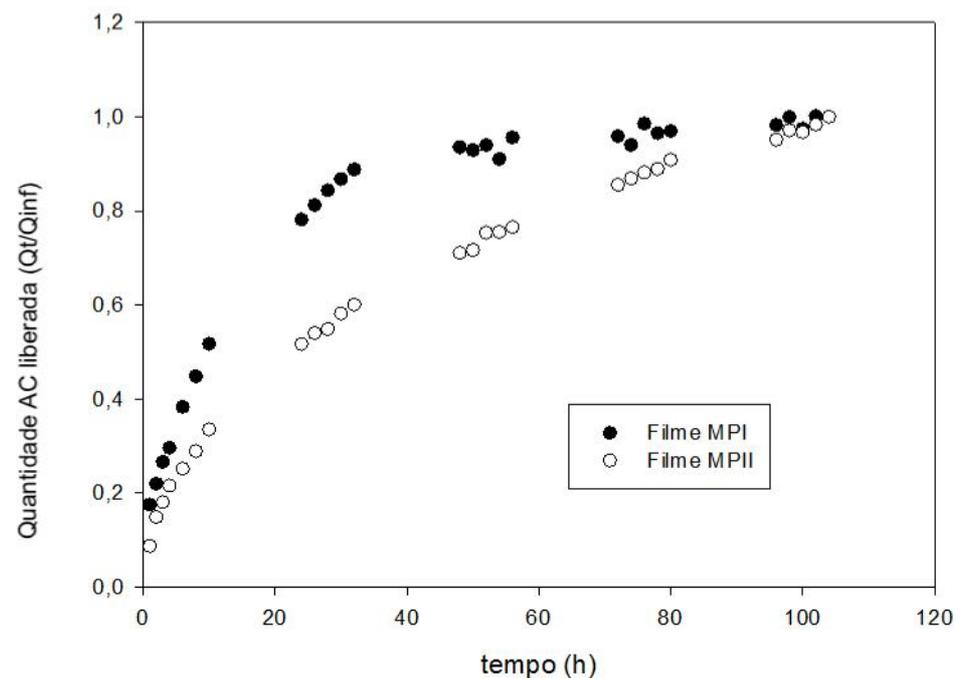


Figura 97. Perfil de liberação do AC a partir dos filmes de MPI e MP11 por 104 h (Qt e Qinf são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

Nas primeiras 10 h de liberação, o filme contendo partículas MPI apresentou perfil de liberação ordem zero (Figura 98) e após 48h a assíntota

da curva indica que ocorreu equilíbrio entre as concentrações das fases doadora e receptora. A Figura 99 demonstra que o perfil de liberação de Power não se ajustou bem para o filme contendo as MPI, no entanto, a Figura 100 comprova que esse modelo descreve perfeitamente o perfil de liberação controlada do filme de MP11.

Esses resultados são condizentes com os encontrados para o perfil e liberação das emulsões contendo MPI e MP11 (Figuras 101 a 104).

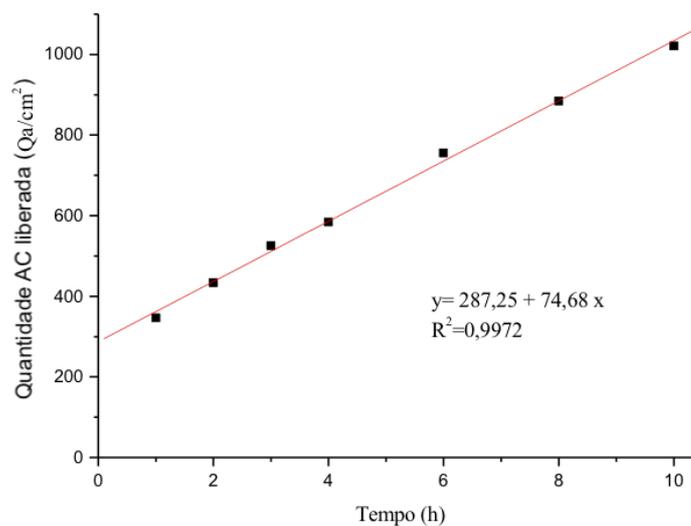


Figura 98. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir do filme de MPI nas primeiras 10 h.

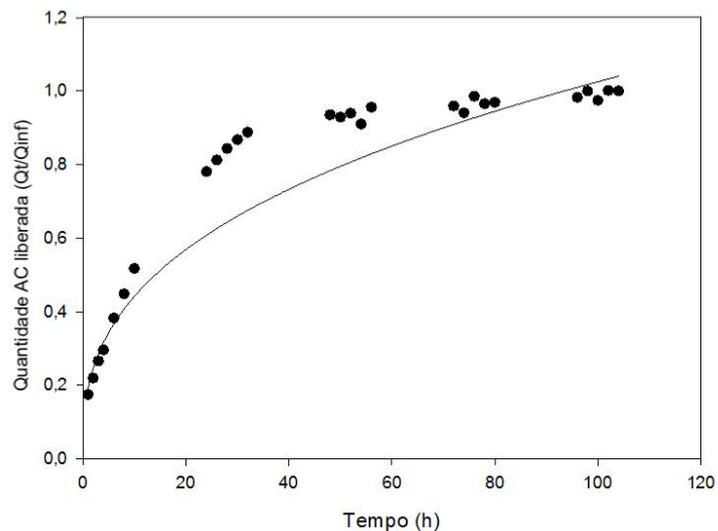


Figura 99. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir do filme de MPI (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

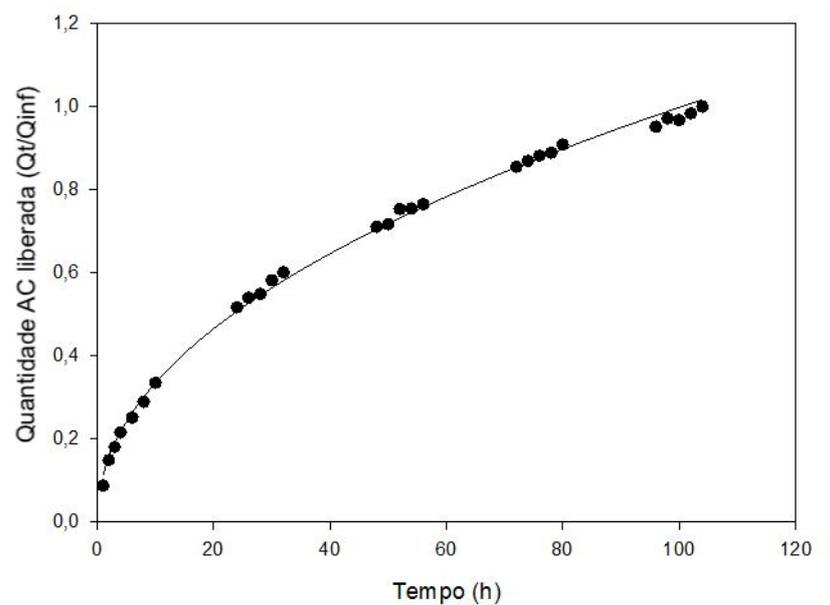


Figura 100. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir do filme de MP11 (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

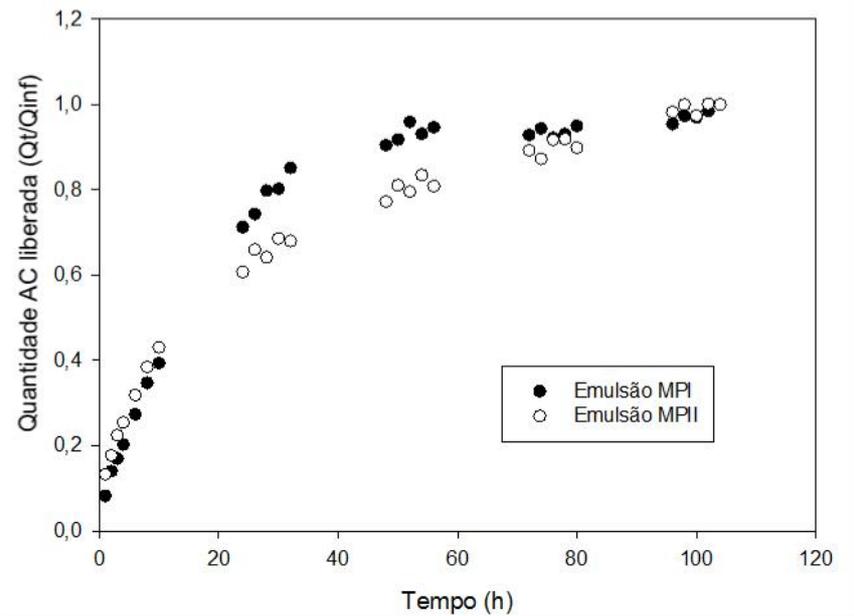


Figura 101. Perfil de liberação do AC a partir das emulsões de MPI e MPIO ao longo de 104 h (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

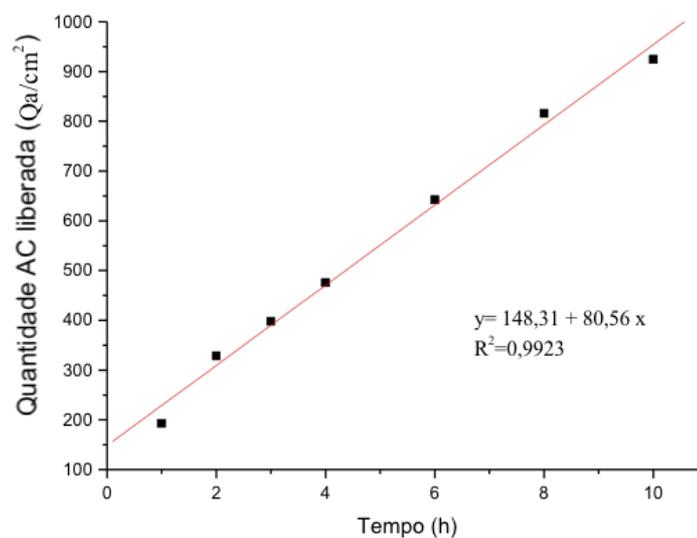


Figura 102. Perfil de liberação de ordem zero do AC a partir das emulsões de MPI nas primeiras 10 h.

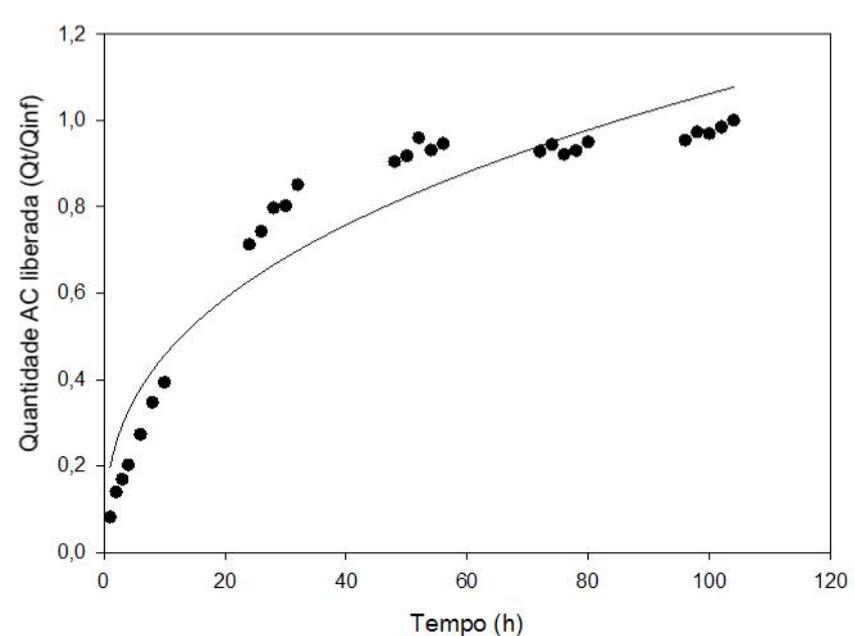


Figura 103. Perfil de liberação de Power não ajustado do AC a partir das emulsões de MPI (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

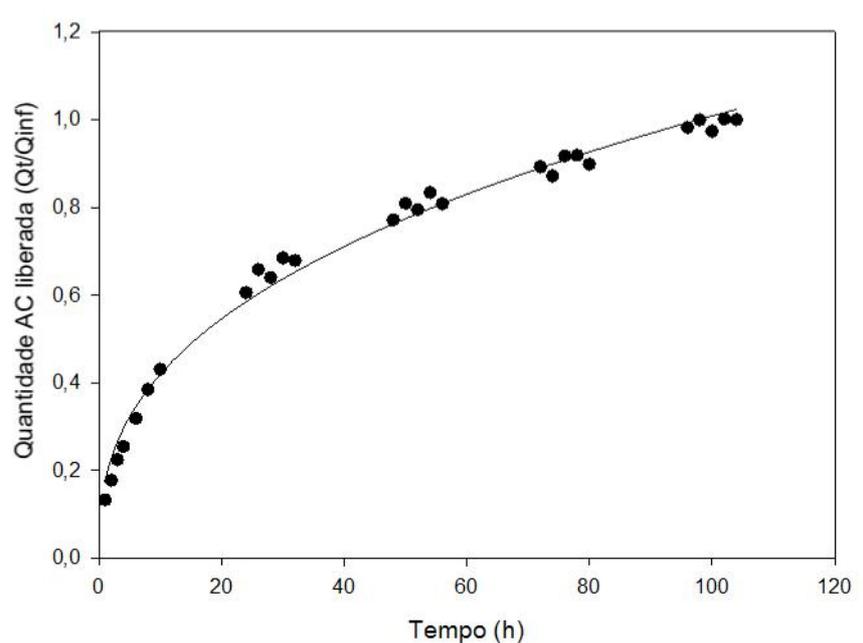


Figura 104. Perfil de liberação ajustado para Power do AC a partir das emulsões de MP11 (Q_t e Q_{inf} são as quantidades cumulativas absolutas de fármaco liberadas no momento t e tempo infinito respectivamente).

O estudo do perfil de liberação *in vitro* da substância em estudo é uma etapa importante na caracterização de sistemas de liberação, pois permite

avaliar os parâmetros tecnológicos em relação às formulações convencionais. O perfil de liberação está diretamente relacionado com a distribuição do fármaco na matriz polimérica e, portanto, depende diretamente das características físico-químicas do ativo e dos componentes da matriz polimérica em que está associado (BARBASSA, 2014).

Microesferas porosas, como as MPI apresentam elevada área superficial, permitindo o maior contato com o meio e levando ao aumento considerável na velocidade de liberação em todos os sistemas de liberação (YANG et al., 2000). O fármaco liberado nas primeiras horas pode estar localizado na superfície ou nas camadas mais externas da partícula e, desse modo, a pequena distância difusional existente entre a sua localização e o meio pode ter conduzido à liberação mais rápida (FREIBERG & ZHU, 2004). Já as MP II, que são menos porosas, possuem uma superfície mais lisa e uniforme, conseguiram controlar melhor a liberação do AC em todos os sistemas, seja na dispersão aquosa das MP, filme ou emulsão, conforme pode ser observado na Figura 105.

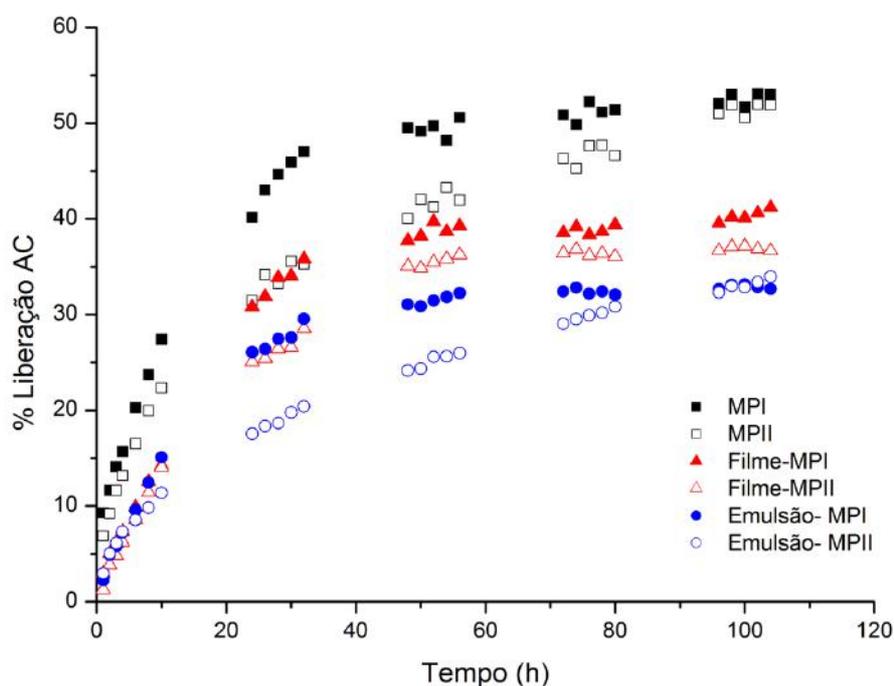


Figura 105. Porcentagem de liberação das formulações contendo AC.

Estudos prévios de liberação de uma emulsão e um filme contendo a mesma concentração de 0,5%, ou seja, 5 mg/mL de ácido cafeico em sua forma livre mostraram que o perfil cinético de liberação em oito horas de estudo segue o modelo de Higuchi (SPAGNOL et al., 2017), que descreve a liberação de ativos por um processo de difusão (MONTEIRO et al., 2007). Em oito horas de liberação a emulsão liberou $900 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e o filme $1100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AC e após esse tempo não ocorreu aumento da liberação (SPAGNOL et al., 2017). No presente trabalho, comparando o mesmo período de 8 h, a emulsão de MPI liberou $815,9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AC e a de MPII liberou $743,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Já o filme de MPI liberou $884,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e o de MPII liberou $637,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Assim, as quantidades liberadas em todas as formulações são inferiores quando o AC se encontra internalizado na micropartícula de quitosana, indicando que a encapsulação promove uma redução na velocidade de liberação.

Pela quantidade de ativo liberado nas 8 h, tanto na emulsão quanto no filme, a MPI apresenta valores absolutos superiores quando comparada com a MPII. Além disso, decorridas as 8h iniciais do experimento, ocorreu um aumento na quantidade de ativo liberada até 104 h, sendo que a emulsão de MPI liberou $2.350,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ de AC e a de MPII liberou $1.934,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Já o filme de MPI liberou $2.205,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ e o de MPII liberou $1.975,7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Assim, o objetivo das micropartículas para estender o período e modificar cinética de liberação foi atendido.

Como a concentração antimicrobiana do AC encontrada nesse trabalho variou de 375 a $1500 \mu\text{g}/\text{mL}$ dependendo dos microrganismos testados e a antioxidante variou de 0,37 a $41,11 \mu\text{g}/\text{mL}$, comprova-se que as concentrações de AC liberadas seguramente apresentam atividade. A concentração máxima de AC testada por Magnani et al., 2014b ($1140 \mu\text{g}/\text{mL}$) não atingiu 50% de morte celular em células HaCat, podendo-se afirmar que o AC é seguro nas condições testadas, podendo ser aplicado em produtos de uso tópico.

Um estudo realizado por Mittal et al. (2013) mostrou que as nano e micropartículas tendem a penetrar mais profundamente no folículo piloso do que os fármacos não encapsulados. Assim, a possibilidade de aplicação de um produto na pele que promova o acúmulo das micropartículas no folículo piloso

e libere o ativo estendendo sua atividade por até 104 h parece ser bastante promissora (SPAGNOL et al., 2018).

5.7. Avaliação da permeação *in vitro* do AC

Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacéutica, Universidad de Valencia, España sob financiamento BEPE Fapesp (2016/06742-7).

Esse teste se faz necessário para produtos cosméticos que visam atingir a camada córnea, epiderme, e preferencialmente a derme, porém não é desejável que atinjam os vasos sanguíneos em concentrações significativas para provocar efeitos sistêmicos. Além disso, analisar o perfil e a velocidade com que a substância permeante atravessa as camadas da pele também é interessante no desenvolvimento de um sistema de liberação controlada.

A fim de verificar uma possível influência dos constituintes das micropartículas (quitosana e polissorbatato 80) na permeação do ácido cafeico, foram realizados três controles em solução tampão fosfato (pH 5,5) com etanol (50:50), sendo que o primeiro controle era apenas com ácido cafeico; o segundo foi uma solução de ácido cafeico e quitosana; e o terceiro, uma solução de ácido cafeico, quitosana e polissorbatato 80. Todos contendo AC a 5 mg/mL. Os valores de fluxo do AC através da epiderme (J), o coeficiente de permeabilidade (Kp) e tempo de latência (TI) obtidos nas diferentes condições estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AC nos controles.

	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	Kp (cm^2/s)	TI (h)
AC	$5,50 \pm 0,46^a$	$3,13 \times 10^{-7} \pm 2,66 \times 10^{-8}^b$	$1,78 \pm 0,34^c$
AC + Q	$5,03 \pm 0,74^a$	$2,79 \times 10^{-7} \pm 4,13 \times 10^{-8}^b$	$1,17 \pm 1,80^c$
AC + Q + T	$6,17 \pm 0,48^a$	$3,40 \times 10^{-7} \pm 2,68 \times 10^{-8}^b$	$1,05 \pm 1,11^c$

J: Fluxo do permeante através da epiderme; Kp: coeficiente de permeabilidade; TI: tempo de latência; AC: solução de Ácido Cafeico; AC + Q: solução de ácido cafeico e quitosana; AC+Q+T: solução de ácido cafeico, quitosana e Tween 80. ^{a,b,c}: letras iguais indicam valores estatisticamente iguais.

Os valores apresentados demonstram que não ocorreu diferença estatisticamente significativa nos valores de fluxo, coeficiente de permeabilidade e tempo de latência entre os controles, indicando que a quitosana e o polissorbato 80 não afetam esses parâmetros cinéticos.

A Figura 106 mostra o perfil de permeação *in vitro* do AC nas soluções controle. Os resultados comprovam que não ocorreu relação entre o coeficiente de permeabilidade e a atividade termodinâmica do AC nesses veículos, uma vez que há um imbricamento entre os valores de desvio padrão das curvas.

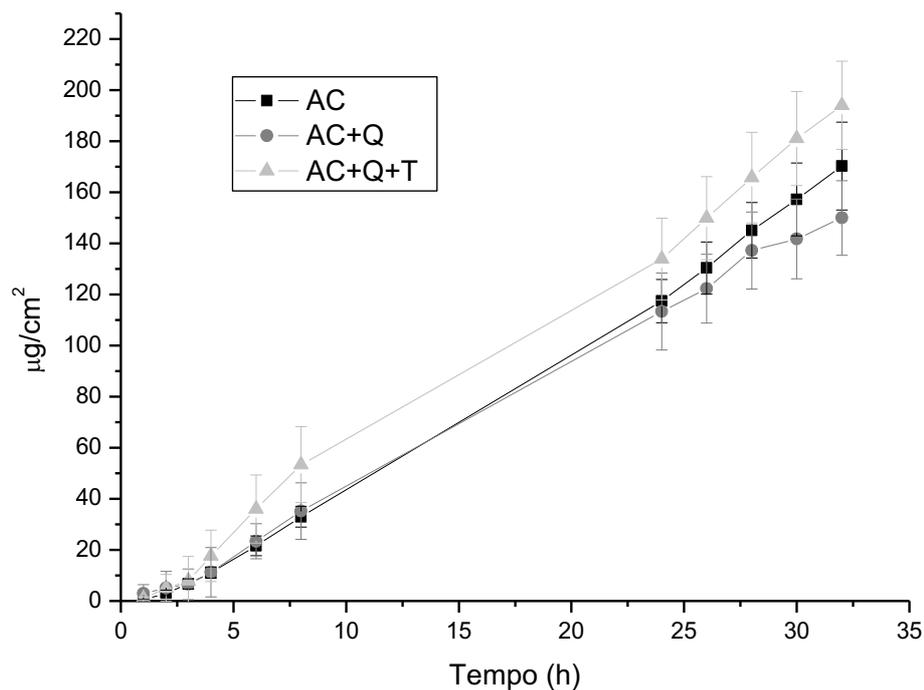


Figura 106. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir de diferentes controles AC: solução controle de ácido cafeico; AC + Q: solução controle de ácido cafeico e quitosana; AC+Q+T: solução controle de ácido cafeico, quitosana e polissorbato 80.

As Figuras 107 a 109 demonstram o Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir das dispersões, filmes e emulsões contendo MPI e MPII.

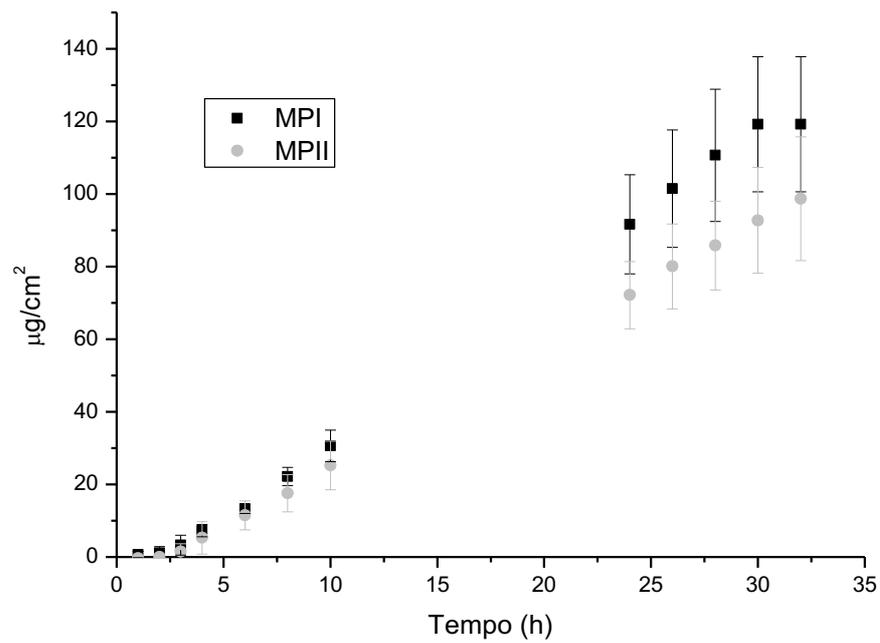


Figura 107. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir da MPI e da MPII.

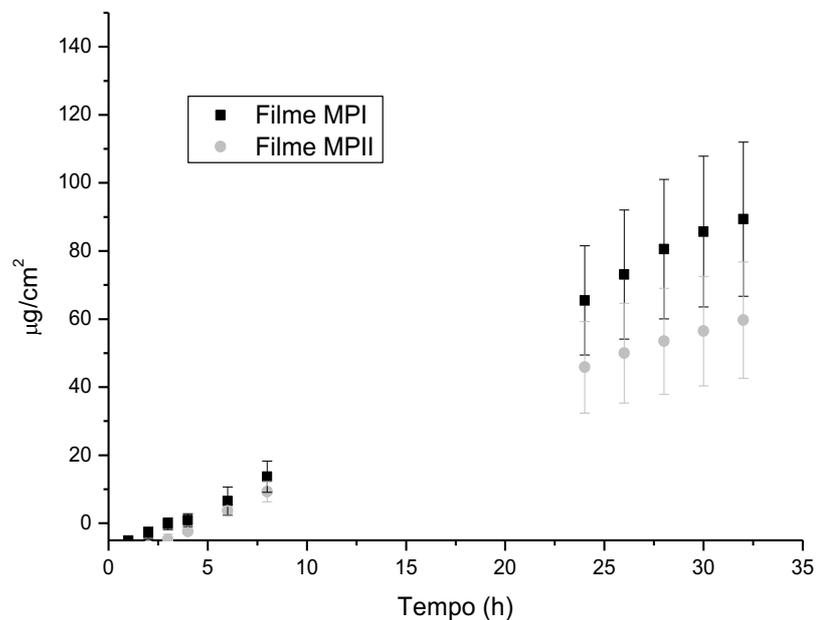


Figura 108. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir do filme com MPI e do filme com MPII.

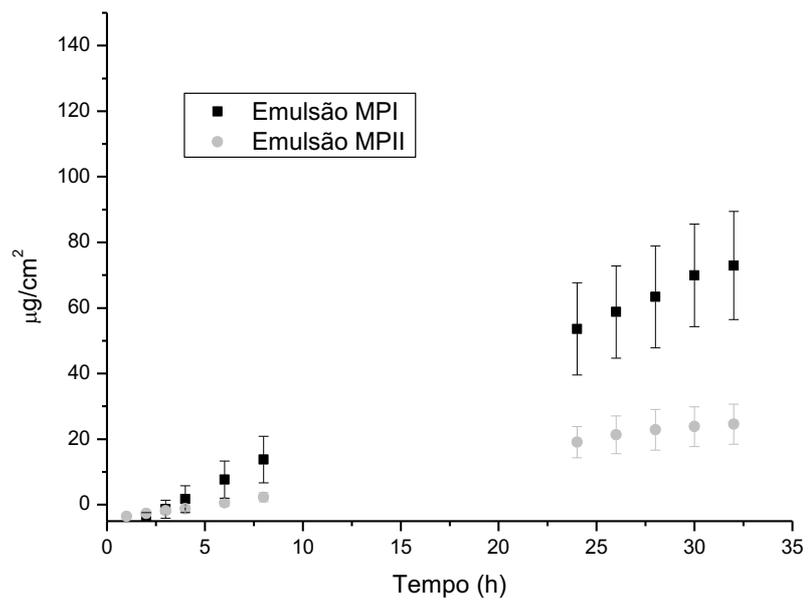


Figura 109. Perfil de permeação (média \pm desvio padrão) do AC através da epiderme a partir da emulsão com MPI e da emulsão com MPII.

A Tabela 21 apresenta os parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AC obtidos a partir das micropartículas MPI e MPII incorporadas em uma dispersão aquosa, filme e emulsão. Como o coeficiente de permeabilidade é um parâmetro avaliado apenas para soluções de liberação imediata, ele não foi calculado para as formulações contendo micropartículas de AC.

Tabela 21. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AC microparticulado nas formulações.

	J ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)	TI (h)
Dispersão MPI	4,28 \pm 0,73	2,33 \pm 0,50
Dispersão MPII	3,37 \pm 0,53	2,46 \pm 0,81
Filme MPI	3,16 \pm 0,75	3,29 \pm 0,59
Filme MPII	2,15 \pm 0,63	3,59 \pm 0,22
Emulsão MPI	2,52 \pm 0,53	2,88 \pm 0,92
Emulsão MPII	0,92 \pm 0,24	4,04 \pm 0,28

J: Fluxo do permeante através da epiderme; TI: tempo de latência; MP: Micropartícula.

Foi observado aumento do tempo de latência e redução no fluxo de AC nesta ordem: dispersão, filme e emulsão. Em todas as formulações (dispersão, filme e emulsão) foi observado que o fluxo foi menor e o tempo de latência foi maior para as MPII do que para as MPI (Figuras 107 a 109), indicando uma similaridade entre o perfil de permeação e de liberação, em que as MPII apresentaram uma liberação mais lenta e controlada do AC quando comparadas com as MPI.

A técnica de *heat separation* utilizada para o preparo das peles utilizadas nesse experimento proporciona a separação entre as camadas da epiderme e derme, uma vez que o calor quebra as ligações que as mantêm unidas e é por isso que elas podem ser facilmente separadas.

Supõe-se que quando a substância atravessa o estrato córneo pode se espalhar para as camadas viáveis mais profundas e em seguida para o sangue. Ou seja, se uma dose é aplicada a um creme, uma vez que a dose é atingida em todas as camadas da pele, ela para de permear. Se queremos um nível contínuo permeação, então se utiliza um sistema de liberação controlada, que libera a mesma dose continuamente ao longo do tempo.

De acordo com estudos de citotoxicidade realizados por Magnani et al. (2014b) em células HepG2, a concentração de 781,8 µg/mL foi a que causou 50% de morte celular. Já nos estudos realizados com células HaCat, mesmo a concentração máxima de AC utilizada (1140 µg/mL) não foi capaz de matar 50% das células. As concentrações permeadas que atingiram a fase receptora foram suficientemente elevadas para apresentar atividade antioxidante nas camadas mais profundas da pele sem provocar citotoxicidade.

Mittal e colaboradores (2013) verificaram que nanopartículas foram os veículos ideais para liberação de substâncias via transfolicular já que elas são capazes de penetrar mais profundamente nos folículos pilosos do que os fármacos em solução. Assim, as partículas tendem a permanecer no folículo e liberar os ativos nela contidos ao longo do tempo nas camadas viáveis da pele.

A estratégia de utilizar sistemas estruturados em escala nano ou micro também foi utilizada por Mathes et al. (2016) e verificaram que formulações baseadas em nanotecnologia forneceram uma estratégia viável para entrega mais eficiente de fármacos ao folículo piloso. Além disso, se apresentaram como uma maneira de minimizar os efeitos adversos dos glicocorticóides potentes, oferecendo liberação de maneira controlada.

Assim, esse estudo forneceu uma perspectiva positiva para que sejam realizados futuros estudos de retenção transepidérmica do AC a fim de confirmar a maior afinidade das micropartículas ao folículo piloso e a concentração mais elevada do ativo nas camadas mais profundas da pele.

6. CONCLUSÃO

✓ Ácido cafeico mostrou atividade antioxidante significativa. Especialmente na captura de $O_2^{\cdot-}$ e $HOCl/OCl^-$ que são relevantes nos processos de sinalização e defesa do organismo.

✓ Promissor como agente antimicrobiano, de modo a atender à crescente demanda por substâncias que substituam ou reduzam as concentrações de antimicrobianos clássicos.

✓ O desenvolvimento da emulsão e da preparação cosmética em filme evidenciou que esta é uma etapa crucial na execução de um trabalho, visto escolha das matérias primas de maneira não criteriosa pode comprometer todo o planejamento da pesquisa. Assim, foi possível obter formulações compatíveis com as micropartículas em estudo e que tivessem aspecto sensorial e características físico químicas o mais adequadas possíveis.

✓ Os resultados mostraram que o *spray drying* é um método eficiente para obtenção de MP de quitosana contendo AC, produzindo microestruturas de 1 a 5 μm de diâmetro. As MP oriundas de solução aquosa demonstraram-se esféricas e com superfície lisa, ideal para liberação controlada, já as oriundas de solução hidroalcoólica apresentaram-se porosas e com material residual não internalizado.

✓ Esse resultado foi condizente com o perfil de liberação e permeação já que as MP obtidas a partir de solução aquosa apresentaram liberação e permeação mais lenta e controlada que as obtidas a partir de solução hidroalcoólica. Assim, conclui-se que o método de produção e composição das micropartículas influi no perfil de liberação do ácido cafeico, por tanto, todas as condições de produção devem ser estreitamente controladas.

Os resultados mostraram-se promissores em relação a proposta de desenvolvimento de formulações contendo AC como um ativo multifuncional veiculado em micropartículas (MP) de quitosana destinadas a aplicação facial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUFFIE, J. A.; MARSHALL, W. R. Jr. Factors influencing the properties of spray-dried materials. *Chem. Eng. Prog.*, v. 49, n. 9, p. 480-486, 1953.

CROSBY, E. J.; MARSHALL, W. R. Jr. Effects of drying conditions on the properties of spray-dried particles. *Chem. Eng. Prog.*, v. 54, n. 7, p. 53-63, 1958.

KIM, D-J.; JUNG, J-Y. Granule performance of zirconia/ alumina composite powders spray-dried using polyvinyl pyrrolidone binder. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 27, p. 3177-3182, 2007.

BERTRAND, G.; FILIATRE, C.; MAHDJOUR, H.; FOISSY, A.; CODDET, C. Influence of slurry characteristics on the morphology of spray-dried alumina powders. *Journal of the European Ceramic Society*, v. 23, p. 263-271, 2003.

ABIHPEC. **Aumenta procura por produtos para pele.** Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/2014/05/abihpec-aumenta-procura-por-produtos-para-pele>. Acesso em: 25 mar. 2018.

ABIHPEC. **Panorama do Setor de HPPC.** Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/novo/wp-content/uploads/2016-PANORAMA-DO-SETOR-PORTUGU%C3%8AS-14jun2016.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2017.

ABRAMS, R. **California Becomes Latest State to Ban Plastic Microbeads.** Disponível em: <https://www.nytimes.com/2015/10/09/business/california-bans-plastic-microbeads.html>. Acesso em: 20 mar. 2018.

AHMAD, M.; MANZOOR, K.; SINGH, S.; IKRAM, S. Chitosan centered bionanocomposites for medical specialty and curative applications: A review. *Int. J. Pharm.*, v. 529, n.1, p. 200-217, 2017.

ALLEVATO, M. A. Sistemas terapêuticos transdérmicos. *Act. Terap. Dermatol.*, v.30, n.3, p.154-165, 2007.

ALMAJANO, M.P.; CARBO, R.; DELGADO, M.E.; GORDON, M.H. Effect of pH on the antimicrobial activity and oxidative stability of oil-in-water emulsions containing caffeic acid. *J. Food Sci.*, v.72, n.5, p. 258-263, 2007.

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.

ALPAR, H.O.; SOMAVARAPU, S.; ATUAH, K.N.; BRAMWELL, V.W. Biodegradable mucoadhesive particulates for nasal and pulmonar antigen and DNA delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, n.33, p. 411-430, 2005.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.V. Métodos para a determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Quím. Nova**, v.33, n.10, p.2202-2210, 2010.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.

ASSIS, R.P.; CASTRO, J.F.A.; GUTIERRES, V. O.; ARCARO, C. A.; BROTTTO, R. S.; OLIVEIRA, O. M.M.F.; BAVIERA, A. M.; BRUNETTI, I. L. Effects of uremic solutes on reactive oxygen species in vitro model systems as a possibility of support the renal function management. **BMC Nephrol.**, v.16, n.50, p.1-13, 2015.

AZEVEDO, V.V.C.; CHAVES, S.A.; BEZERRA, D.C.; FOOK, M.V.L.; COSTA, A.C.F.M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Rev. Eletr. Mat. Proc.**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BARBASSA, L. **Micropartículas poliméricas catiônicas contendo antibióticos quinolônicos para potencial liberação controlada intra-ocular.** Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Araraquara-SP, 2014.

BARON, S. **Medical Microbiology.** 4. ed. Texas: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRY, B.W. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.*, v.14, p.101-114, 2001.

BATISTUZZO, A.O.B.; ETO, Y.; ITAYA, M. **Formulário Médico Farmacêutico**. 2.ed. São Paulo: Tecnopress, 2002.

BENITA, S. **Microencapsulation: methods and industrial applications**. 2. ed. – Drugs and Pharmaceutical Sciences, New York: Taylor & Francis Group, v.73, p. 1-122, 2006.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quím. Nova**, v.6, p.1340-1344, 2006.

BERROZPE, J.D.; LANAÓ, J.M.; GUITART, P. **Tratado general de biofarmacia y farmacocinética I**. Madrid: Síntesis, 2013.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOAVENTURA, G. **Proibição dos microplásticos em cosméticos**. Disponível em: <https://cosmeticaemfoco.com.br/proibicao-dos-microplasticos-em-cosmeticos/>. Acesso em: 20 mar. 2018.

BORGUINI, R.G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. Tese de Doutorado. Faculdade de Saúde Pública. Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2006.

BORS, W.; MICHAEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochim. et Biophys. Acta**, v. 796, p.312-319, 1984.

BORTOLINI, G. V. **Atividade antioxidante, antigenotóxica e antimutagênica de extratos de folhas de *Vitis labrusca* (variedade Isabel) orgânica e convencional em células de mamífero**. Dissertação de mestrado. Universidade de Caxias do Sul, 2012.

BRAND-WILLAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infecciosas – Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº 29, de 1º de junho de 2012. Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes.

BRAVO-OSUNA, I.; VAUTHIER, C.; FARABOLLINI, A.; PALMIERI, G.F.; PONCHEL, G. Mucoadhesion mechanism of chitosan and thiolated chitosan-poly (isobutyl cyanoacrylate) core-shell nanoparticles. **Biomaterials**, v.28, p.2233-43, 2007.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 126, p. 482-488, 1985.

BUNHAK, E.J.; MENDES, E.S.; PEREIRA, N.C.; CAVALCANTI, O.A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. **Quím. Nova**, v.30, n.2, p.312-317, 2007.

BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLU, Ö. I. *In vitro* antioxidant properties of dantrolene sodium. **Pharmacol. Res.**, v.44, n.6, p.491–495, 2001.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Rev. Biochem.**, v.58, p.79-110, 1989.

CAMPOS, F.M.; COUTO, J.A.; HOGG, T.A. Influence of phenolic acids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. **J. Appl. Microbiol.**, v. 94, n. 2, p.167-74, 2003.

CANILLAC, N.; MOUREY, A. Effects of several environmental factors on the anti- *Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excelsa*. **Int. J. Food Microbiol.**, v.92, n. 1, p. 95-103, 2004.

CHADHA, R.; BHANDARI, S. Drug-excipient compatibility screening- Role of thermoanalytical and spectroscopic techniques. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 87, p. 82-97, 2014.

CHEN, F.; LI, S.; LI, C.; LIU, M.; LI, Z.; XUE, H.; JING, X.; WANG, J. A novel method for speech acquisition and enhancement by 94 GHz millimeter-wave sensor. **Sensors**, v.16, n.1, p.1-14, 2016.

CHEN, Z.; BERTIN, R.; FROLDI, G. EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH[•] assay using several statistical programs. **Food Chem.**, v.138, p.414-420, 2013.

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.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 300-375, 2001.

CHING, T.; JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to antiasthmatic drugs. **Anal. Biochem.**, v. 218, p. 377-381, 1994.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1033–1043, 2000.

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

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia: Ciência e Técnica**. São Paulo: Medfarma, 2012.

CORRÊA, M.A. **Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997. 146p.

COTINGUIBA, G.G.; SILVA, NASCIMENTO, J.R.N.; AZEVEDO, R.R.S.; ROCHA, T.J.M.; SANTOS, A.F. Método de avaliação da defesa antioxidante:

uma revisão de literatura. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.15, n.3, p. 231-237, 2013.

CUNHA, M.G.; CUNHA, A.L.G.; MACHADO, C.A. Hipoderme e tecido adiposo subcutâneo: duas estruturas diferentes. **Surg. Cosmet. Dermatol.** v.6, n.4, p.355-359, 2014.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.73, p.645-652, 1996.

DANIELS, R. Strategies for skin penetration enhancement. **Skin Care Forum**, v.37, n.1, p. 50-55, 2004.

DASH, S.; MURTHY, P. N.; NATH, L.; CHOWDHURY, P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. **Acta Pol. Pharm- Drug Res.**, v. 67, n. 3, p. 217- 223, 2010.

DE PINHO, R. A.; ARAÚJO, M.C.; GHISI, G.L.M.; BENETTI, M. Coronary heart disease, physical exercise and oxidative stress. **Arqui. Bras. Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 515-521, 2010.

DEG. **Rapihix A-60 - Informe técnico, 2014.** Disponível em: http://www.fagron.com.br/Literaturas/LITERATURAS%20COSMETICAS/RAPITHIX_A%2060.pdf. Acesso em: 10 fev. 2018.

DESAI, K.G.H.; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technol.**, v. 23, n. 7, p.1361-1394, 2005.

DIMZON, I.K.D.; KNEPPER, T.P. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.72, p. 939-945, 2015.

DOSSIÊ DE ANTIOXIDANTES. **Os Antioxidantes.** Disponível em: <http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2018.

DUH, P.D.; TU, Y.Y.; YEN, G.C. Antioxidant activity of water extract of harn g jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Lebens. Wiss. Technol.**, v.32, p.269–277, 1999.

EATON, J.W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen-peroxide - mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin. Med.**, v.118, n.1, p.3-4, 1991.

ELDER, D.E.; ELENITSAS, R.; JOHNSON JR., B.L.; MURPHY, G. F.; LEVER, X. **Histopatologia da pele**. 10. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.

ENCICLOPÉDIA Britannica Digital Learning. Edição. Chicago, Il.: Encyclopedia Britannica Inc, 2018. Disponível em: <http://https://escola.britannica.com.br/levels/fundamental/assembly/view/135568>
Acesso em: 20 março 2018.

ERENO, D. Nanotecnologia- Beleza fundamentada. **Pesquisa Fapesp**, n.146, p. 80-85, 2008.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. **Nature**, v.408, p.239, 2000.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **Int. J. Pharm.**, v.282, p. 1-18, 2004.

FREITAS, M.N.; MARCHETTI, J.M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **Int. J. Pharm.**, v.295, p.201-211, 2005.

FRIEDMAN, M.; JURGENS, H.S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.2101- 2110, 2000.

FRONZA, T.; GUTERRES, S.; POHLMANN, A.; TEIXEIRA, H. **Nanocosméticos: em direção ao estabelecimento de marcos regulatórios**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

FU, Y.J.; SHYU, S.S.; SU, F.H.; YU, P.C. Development of biodegradable copoly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. **Colloids Surf. B**, v. 25, p. 269-279, 2002.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxid. Redox Signal.**, v.15, n.6, p.1583-1606, 2011.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3597–3604, 2000.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GAN, L.; WANG, J.; JIANG, M.; BARTLETT, H.; OUYANG, D.; EPERJESI, F.; LIU, J.; GAN, Y. Recent advances in topical ophthalmic drug delivery with lipid based nanocarriers. **Drug Discovery Today**, v.18, n.5, p. 290-297, 2013.

GARRIDO, M.P.J.; CERQUEIRA, A.S.; CHAVARRI, D.; SILVA, T.; BORGES, F., GARRIDO, J.M.P.J. Microencapsulation of caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid phenethyl amide by inclusion in hydroxypropyl- β -cyclodextrin. **Food Chem.**, v. 254, p. 260- 265, 2018.

GENARO-MATTOS, T.C.; MAURÍCIO, Â.Q.; RETTORI, D.; ALONSO, A.; HERMES-LIMA, M. Antioxidant activity of caffeic acid against iron-induced free radical generation - a chemical approach. **Plos One**, n.10, p.1-12, 2015.

GENNARO, A. R. **Remington the science and practice of pharmacy**. 20. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radic. Biol. Med.**, v.13, p.435- 448, 1992.

GREENWALD, P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. **J. Nutr.**, v.134, p.3507-3512, 2004.

GROSS, R.; MARX, A. Symmetry, Crystal Systems and Bravais Lattices. Disponível em: <http://www.physics-in-a-nutshell.com/article/6/symmetry-crystal-systems-and-bravais-lattices>. Acesso em: 22 mar. 2018.

GÜLÇİN, I.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖĞLU, Ö. I. On the *in vitro* antioxidant properties of melatonin. **J. Pineal Res.**, v.33, p.167–171, 2002.

GUO, Q.; ALY, A.; SCHIEIN, O.; TREXLER, M.M.; ELISSEEFF, J.H. Moxifloxacin *in situ* gelling microparticles - bioadhesive delivery system. **Results Pharma Sci.**, v.2, n.1. p.66-71, 2012.

HADJIOANNOU, T.P.; CHRISTIAN, G.D.; KOUPPARIS, M.A. **Quantitative calculations in pharmaceutical practice and research**. New York: VCH Publishers, 1993.

HADSHIEW, M. I.; ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. **Am. J. Contact Dermat.**, v.11, n.1, p.19-25, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr. Reviews**, v.70, n.5, p.257–265, 2012.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2015.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. **Biol. Pharm.**, v.32, p.1141-1148, 1983.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complement. Altern. Med.**, v.8, n.63, p.1-10, 2008.

HOEFEL, H.H.K.; LAUTERT, L. Intravenous administration of antibiotics and bacterial resistance: nursing responsibility. **Nurs. Electr.**, v.8, p.441-449, 2006.

HONEYWELL-NGUYEN, P.L.; WOUTER GROENINK, H.W.; DE GRAAFF, A.M.; BOUWSTRA, J.A. The *in vivo* transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. **J. Contr. Release**, v.90, n.2, p. 243-255, 2003.

HUANG, M.T.; FERRARO, T. Phenolic-compounds in food and cancer prevention. **ACS Symposium Series**, v.507, p.8-34, 1992.

HYNES, M.J.; O'COINCEANAINN, W. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **J. Inorg. Biochem.**, v.98, p.1457-1464, 2004.

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. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

ITO, M.; BAN, A.; ISHIHARA, M. Anti-ulcer effects of chitin and chitosan, healthy foods, in rats. **Jap. J. Pharmacol.**, v. 82, p. 218-225, 2000.

JOSHI, A.S.; GAHANE, A.; THAKUR, A.K. Deciphering the mechanism and structural features of polysorbate 80 during adsorption on PLGA nanoparticles by attenuated total reflectance – Fourier transform infrared spectroscopy. **RSC Adv.**, v.6, p.108545-108557, 2016.

JUKANTI, R.; GADDAM, P.; JALAGAM, M.; BUNDARI, S. Transcorneal permeation of ciprofloxacin liposomes. Effect of surface charge and nonionic surfactants. **J. Dispersion Sci. Technol.**, v. 32, p. 935-942, 2011.

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

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.

KABARA, J.J.; ORTH, D.S. Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs. In: KABARA, J.J.; ORTH, D.S. (Ed.). **Principles for product preservation**. New York: Marcel Dekker, 1997.

KAKKAR, P.; DAS, B.; VISWANATHAN, P. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase. **J. Biochem. Biophys.**, v. 21, p. 130-132, 1984.

KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 24, n. 5, p. 816-826, 2007.

KONDO, S.; HOZUMI, Y.; ASO, K. Organ culture of normal and psoriatic skin: Effect of serum-free medium and lymphoid cells on epidermal differentiation of explants. **J. Dermatol. Sci.**, v.1, n.3, p. 222, 1990.

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.633-644, 2007.

KUMARAN, K.S.; PRINCE, P.S.M. Caffeic acid protects rat heart mitochondria against isoproterenol-induced oxidative damage. **Cell Stress Chaperones**, v. 15, p. 791-806, 2010.

LAFAY, S.; GIL-IZQUIERDO, A. Bioavailability of phenolic acids. **Phytochem. Rev.**, v.7, n.2, p.301, 2008.

LAPENNA, D.; CUCCURULLO, F. Hypochlorous acid and its pharmacological antagonism: An update picture. **Gen. Pharmacol.**, v. 27, n. 7, p. 1145- 1147, 1996.

LEGRAND, P.; BARRATT, G.; MOSQUEIRA, V.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-Ph.; S.T.P. Polymeric nanocapsules as drug delivery systems: A review. **Pharma Sci.**, v. 9, p. 411 418, 1999.

LEONARDI, G.R.; GASPAR, L.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **An. Bras. Dermatol.**, v. 77, p.563-569, 2002.

LIBO; REZA F. Zero-Order release kinetics from a self-correcting floatable asymmetric configuration drug delivery system. **J. Pharm. Sci.**, v.85, p.170, 1996.

LIU, J.; WEN, X.; LU, J.F.; KAN, J.; JIN, C. Free radical mediated grafting of chitosan with caffeic and ferulic acids: Structures and antioxidant activity. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.65, p.97-106, 2014.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn. Rev.**, v.4, n.8, p. 118–126, 2010.

LÚCIO, M.; NUNES, C.; GASPAR, D.; FERREIRA, H.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, S. Antioxidant activity of vitamin e and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies *in vitro*. **Food Biophys.**, v. 4, p. 312–320, 2009.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MAGNANI, C.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Caffeic acid: a review of its potential use in medications and cosmetics. **Anal. Methods**, v.6, p.3203-3210, 2014(a).

MAGNANI, C.; CHIARI, B.G.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. *In vitro* safety evaluation of caffeic acid. **Athens J. Health**, v. 1, p. 01-08, 2014(b).

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Quim. Nova**, v.19, p.529-535, 1996.

MARQUELE, F.D.; OLIVEIRA, A.R.M.; BONATO, P.S.; LARA, M.G.; FONSECA, M.J.V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.41, p.461-468, 2006.

MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J. P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIANA, L. The “*in vitro*” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **Int. J. Pharm.**, v.331, n.1, p.139-144, 2007.

MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; LATOS, M. Determination of antioxidant activity of caffeic acid and p-coumaric acid by using electrochemical and spectrophotometric assays. **Int. J. Electrochem. Sci.**, v.11, p.10644-10658, 2016.

MATHES, C.; MELERO, A.; CONRAD, P.; VOGT, T.; RIGO, L.; SELZER, D.; PRADO, W.A.; DE ROSSI, C.; GARRIGUES, T.M.; HANSEN, S.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **J. Control. Release**, v.223, p. 207-214, 2016.

MAURYA, D. K.; DEVASAGAYAM, T. P. A. Antioxidant and prooxidant nature of hydroxycinnamic acid derivatives ferulic and caffeic acids. **Food Chem. Toxicol.**, v.48, p.3369-3373, 2010.

MELERO, A.; GARRIGUES, T.M.; ALMUDEVER, P.; MARTIN VILLODRE, A.; LEHR, C.M.; SCHAFER, U. Nortriptyline hydrochloride skin absorption: Development of a transdermal patch. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.69, p. 588-596, 2008.

MELERO, A. **Desarrollo de un parche transdérmico de clorhidrato de nortriptilina como terapia de apoyo en deshabitación tabáquica.** Thesis Doctoral. Universitat de Valencia, 2009.

MENDES, A.A.; OLIVEIRA, P.C.; CASTRO, F.; GIORDANO, R.L.C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quím. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, p.405-441, 2005.

MENON G.K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug. Deliv.**, v.54, n.1, p. 3-17, 2002.

MENON, G. K.; DRYER, L.; KALAFSKY, R. Approaches to the development of cosmetic products to counter the effects of skin aging. In: DAYAN, N. (Ed.), **Skin aging handbook: An integrated approach to biochemistry and product development.** Norwich, New York: William Andrew, p. 265-290, 2009.

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.

MILOUDI, L.; BONNIER, F.; BERTRAND, D.; BYRNE, H. J.; PERSE, X.; CHOURPA, I.; MUNNIER, E. Quantitative analysis of curcumin-loaded alginate nanocarriers in hydrogels using Raman and attenuated total reflection infrared spectroscopy. **Anal. Bioanal. Chem.**, v.409, p. 4593-4605, 2017.

MITTAL, A.; RABER, A.S.; SCHAEFER, U.F.; WEISSMANN, S.; EBENSEN, T.; SCHULZE, K.; GUZMÁN, C. A.; LEHR, C.M.; HANSEN, S. Non-invasive delivery of nanoparticles to hair follicles: A perspective for transcutaneous immunization. **Vaccine**, v.31, n.34, p.3442-3451, 2013.

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

MONTEIRO, L. M.; SOUZA, A. E.; GIANOTTO, E. A. S.; NERY, M. M. F.; DUARTE, J. C.; FREITAS, O.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M. M. Comprimidos matriciais preparados com hidroxipropilmetilcelulose e pectina contendo quercetina para liberaç o col n-espec fica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179-184, 2007.

MUDGIL, M.; PAWAR, P.K. Preparation and *in vitro*/*ex vivo* evaluation of moxifloxacin-loaded PLGA nanosuspensions for ophthalmic application. **Sci. Pharm.**, v. 81, n.2, p.591-606, 2013.

MOSTEFA, N. M.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.28, n.3, p. 211-218, 2006.

MURRAY, J. C.; BURCH, J. A.; STREILEIN, R. D.; IANNACCHIONE, M. A.; HALL, R. P.; PINNELL, S. R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.59, p.418-425, 2008.

NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S.K.; PEPPAS N.A. **Quantitative calculations in pharmaceutical**. New York: John Wiley and Sons, 1999.

NAZER, A.I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J.L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella sv. Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiol.**, v. 22, p.391-8, 2005.

NEELGUND, G.M.; KARTHIKEYAN, B., SHIVASHANKAR, S.A., OKI, A. Single-step, size-controlled synthesis of colloidal silver nanoparticles stabilized by octadecylamine. **Appl. Surf. Sci.**, v. 356, p. 726-731, 2015.

NEMANIC, M. M.; WHITNEY, J.; ARNAUD, S.; HERBERT, S.; ELIAS, P.M., Vitamin D3 production by cultured human keratinocytes and fibroblasts. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.115, n.2, p. 444-450, 1983.

NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 20, p.22, 2008.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Adv.**, v.35, p.1-36, 2015.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. Guidance document for the conduct of skin absorption studies, n.28, Paris, 2004.

O'LENICK JR, A.J.; O'LENICK, T. **Organic Chemistry for Cosmetic Chemists**. Allured: Carol Stream, 2008.

O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co., 2006.

OKONOZI, S.; DUANGRAT C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPHON, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chem.**, v.103, n.3, p.839-846, 2007.

OLIVEIRA, G.L.S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH^{*}: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

OSMAN, R.; KAN, P.L.; AWAD, G.; MORTADA, N.; EL-SHAMY, A.E.; ALPAR, O. Spray dried inhalable ciprofloxacin powder with improved aerosolisation and antimicrobial activity. **Int. J. Pharm.**, v. 449, p.44-58, 2013.

OZTURK, G.; GINIS, Z.; AKYOL, S.; ERDEN, G.; GUREL, A.; AKYOL, O. The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers. **Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.**, v.16, p. 2064-2068, 2012.

PAIVA-MARTINS, F.; GORDON, M. H. Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.79, n.6, p.571-6, 2002.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA.; 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.

PANI, R.; LAITANO, R.F.; PELLEGRINI, R. Diagnostic X-ray spectra measurements using a silicon surface barrier detector. **Phys. Med. Biol.**, v.32, n.9, p.1135-49, 1987.

PEDREIRO, L.N. Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal. 2015, 149f. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

PELLATI, F.; BENVENUTI, S.; MAGRO, L.; MELEGARI, M.; SORAGNI, F. Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.35, n.2, p.289-301, 2004.

PEPPAS, N. A. Analysis of fickian and non-fickian drug release from polymers. **Pharm. Acta Helv.**, v. 60, p. 110-111, 1985.

PEREIRA, A.L.; LEAL, F.; AZULAY, D.R. **Infecções bacterianas da pele**. 5. ed. Rio de janeiro: Guanabara Koogan, p.301-21, 2011.

PÉREZ-GREGORIO, M.R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L.M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **Food Sci. Technol.**, v. 44, n. 8, p. 1793-1801, 2011.

PIROT, F.; BERARDESCA, E.; KALIA, N.; SINGH, M.; MAIBACH, I.; GUY, R. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and non-invasive quantitation in vivo. **Pharm. Res.**, v.15, n.3, p.492-494, 1998.

PRIOR, R. L.; CAO, G. H. *In vivo* total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 27, n. 11- 12, p. 1173-1181, 1999.

PRIOR, R. L.; WU, X. L.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n.10, p.4290-4302, 2005.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, n.9-10, p.1231-1237, 1999.

REYNAUD, F.; TSAPIS, N.; DEYME, M.; VASCONCELOS, T.G.; GUEUTIN, C.; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R.; FATTALA, E. Spray-dried chitosan-metal microparticles for ciprofloxacin adsorption: kinetic and equilibrium studies. **Soft Matter.**, v.7, n.16, p.7304- 7312, 2011.

ROBY, M.H.H.; SARHAN, M. A., SELIM, K.A.H., KHALEL, K.I. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Ind. Crops. Prod.**, v.43, p.827- 831, 2013.

RODRIGUES, L.B.; AVALOS, A.; CHIAIA, N.; NADARAJAH, A. Effect of formulation and process parameters on chitosan microparticles prepared by an emulsion crosslinking technique. **AAPS Pharm. Sci. Tech.**, v.18, n.4, p.1084-1094, 2017.

ROSA M. F. F.; RODRIGUES, S.; SOUZA E.K.F. Sistema complexo bio inspirado – Modelagem matemática da pele humana via Bond Graph. **Est. Tecn. Eng.**, v.10, n.2, p.49-56, 2014.

ROSEN, M.R. **Delivery system handbook for personal care and cosmetic products**. New York: William Andrew Publishing, 2005.

ROSSANEZI, G. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada de Ceterolaco de trometamina obtidas por *Spray drying***. 2008, 68f. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. London: Pharmaceutical Press, 2009.

ROY, H.; NAYAK, B. S. Formulation and design of microparticles based drug delivery system of selective anti-retroviral drug by chitosan. **Sch. Acad. J. Pharm.**, v.6, n.1, p.34-39, 2017.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BONINA, F. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, n.3, p.476-480, 1999.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. *In vitro* and *in vivo* evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.**, v.199, n.1, p. 39-47, 2000.

SALAS-REYES, M.; HERNÁNDEZ, J.; DOMÍNGUEZ, Z.; GONZÁLEZ, F.J.; ASTUDILLO, P.D.; NAVARRO, R.E.; MARTÍNEZ-BENAVIDEZ, E.; VELÁZQUEZ-CONTRERAS, C.; CRUZ-SÁNCHEZ, S. Electrochemical Oxidation of Caffeic and Ferulic Acid Derivatives in Aprotic Medium. **Braz. Chem. Soc.**, v. 22, n. 4, p.693-701, 2011.

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.

SALEEM, M.; KIM, H.J.; JIN, C.; LEE, Y.S. Antioxidant caffeic acid derivatives from leaves of *Parthenocissus tricuspidata*. **Arch. Pharm. Res.**, v.27, n.3, p.300-304, 2004.

SANCHEZ-MORENO, C.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutr. Res.**, v.20, n.7, p.941-953, 2000.

SANCTIS, D.S. Emulsões aspectos técnicos e práticos para o desenvolvimento de formulações. **Rev. Racine**, p.51, 2000.

SANTOS, J.; SOARES, J.P., DOCKAL, R.; CAMPANA-FILHO, S.P.; CAVALHEIRO, E.T.G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, n.4, p.242-249, 2003.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, n.11, p.1191-1212, 2001.

SCHAFFAZICK, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos

nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v.26, n.5, 726-737, 2003.

SELOMULYA, C.; LIU, W.; WU, W.D.; CHEN, X.D. Uniform chitosan microparticles prepared by a novel spray - drying technique. **Int. J. Chem. Eng.**, p.1-7, 2011.

SETYAWAN, D.; SARI, R.; YUSUF, H.; PRIMA HARINASTITI, R. **Preparation and characterization of artesunate - nicotinamide cocystal by solvent evaporation and slurry method**. 7. ed. Airlangga: Innovare Academic Sciences, 2014.

SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada intraocular de fármacos**. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SILVA-JUNIOR, A.A. **Micropartículas de ácido poli-lático-co-glicólico obtidas por *Spray drying* para liberação prolongada intra-ocular de fármacos**. 2008, 179f. Tese de Doutorado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

SILVA, C.; RIBEIRO, A.; FERREIRA, D.; VEIGA, F. Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.39, n.1, p.1-20, 2003.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmet. Toiletries**, v.8, n.5, p.37-46, 1996.

SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C.; SÁ, M.M.; TERENCE, H. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v.73, n.4, p.515-531, 2008.

SINHA, V.R.; SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DAHAWAN, S. Produção de micropartículas pelo método de *Spray Dryer*. **Int. J. Pharm.**, v.274, p.1-33, 2004.

SIQUEIRA, V.L. **Cuidados microbiológicos em cosméticos e produtos de higiene pessoal**. Disponível em: http://www.crq4.org.br/informativomat_394. Acesso em: 25 mar. 2018.

SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. **Use of emulsions as topical drug delivery systems**. In: NIEDELLOU, F.; MARTI-MESTRES, G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 259-269.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Sacharomyces cerevisiae*. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.1, n.1, p.95-100, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SONI, M. G.; CARABIN, I.G.; BURDOCK, G.A. Safety assessment of esters of hydroxybenzoic acid (parabens). **Food Chem. Toxicol.**, n.43, p.985-1015, 2005.

SPAGNOL, C.M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. 148f. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

SPAGNOL, C.M.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Validation of HPLC-UV assay of caffeic acid in emulsions. **J. Chromatogr. Sci.**, v.54, n.3, p.305-311, 2015.

SPAGNOL, C.M.; FILIPPO, L.D.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Caffeic acid in dermatological formulations: *in vitro* release profile and skin absorption. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 20, n.8, p.675-681, 2017.

SPAGNOL, C.M., ISAAC, V.L.B., CORRÊA, M.A., SALGADO, H.R.N., 2017. Patente: **Processo de preparo de filmes poliméricos secos, formulação de filmes poliméricos secos obtida e seu uso**. INPI – Instituto Nacional da Propriedade Industrial. BR1020150173342 (b).

SPAGNOL, C.M., ZAERA, A.M., ISAAC, V.L.B., CORRÊA, M.A., SALGADO, H.R.N. Release and permeation profiles of spray-dried chitosan microparticles containing caffeic acid. **Saudi Pharm. J.**, v.26, p.410-415, 2018.

STEINBERG, D. C. **Preservatives for Cosmetics**. 2. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corp, 2006.

STROHAL R., PAUCZ, L.; FRIEDL, J.; PEHAMBERGER, H.; STINGL, G. The T-cell receptor repertoire of lymphocytes infiltrating cutaneous melanoma is predominated by V[alpha] specificities present in Tcells of normal skin. **Abstracts from the Second Tricontinental Meeting of JSID, SID and ESDR**. v.6, n.1, 1993.

SWAMINATHAN, S.; PASTERO, L.; SERPE, L.; TROTTA, F.; VAVIA, P.; AQUILANO, D.; TROTTA, M.; ZARA, G.; CAVALLI, R. Cyclodextrin-based nanosponges encapsulating camptothecin: physicochemical characterization, stability and cytotoxicity. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.74, n.2, p.193-201, 2010.

TAINER, J.A.; GETZOFF, E.D.; RICHARDSON, J.S.; RICHARDSON, D.C. Structure and mechanism of copper, zinc superoxide- dismutase. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 284-287, 1983.

TAVARES, A. T.; PEDRIALI, C. A. Relação de uso de parabeno em cosméticos e a sua ação estrogênica na indução no câncer no tecido mamário. **Revista Multidisciplinas da Saúde**, p.61-74, 2011.

TERAO, J.; KARASAWA, H.; ARAI, H.; NAGAO, A.; SUZUKI, T.; TAKAWA, K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.57, 1204-1205, 1993.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Artmed, Porto Alegre, 2017.

TRAN, T.N.; SCHULMAN, J.; FISHER, D. E. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. **Pigm. Cell Melanoma R.**, v. 21, n. 5, p. 509-516, 2008.

TSAI, Y.L.; CHIOU, S.Y.; CHAN, K.C.; SUNG, J.M.; LIN, S.D. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. **LWT - Food Science Technol.**, v.46, p. 169-176, 2012.

TUBARO, F.; GHISELLI, A.; RAPUZZI, P.; MAIORINO, M.; URSINI, F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 24, n. 7/8, p. 1228-1234, 1998.

UCHEGBU, I.F.; SCHÄTZLEIN, A.G. **Polymers in Drug Delivery**. 1. ed. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2006.

UJVARI, E. C. **A história da humanidade contada pelos vírus**. 4. ed. São Paulo: Contexto, 2015.

VALDIVIA, A.; PÉREZ-ALVAREZ, S.; AROCA-AGUILAR, J.D.; IKUTA, I.; JORDÁN, J. Superoxide dismutases: a physiopharmacological update. **J. Physiol. Biochem.**, v. 65, n. 2, p. 195-208, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VAN ROSSUM, M.M.; MOMMERS, J.M.; VAN HOOIJDONK, C.A.E.M.; VAN ERP, P.E.J.; VAN DE KERKHOF, P.C.M. The response of distant uninvolved psoriatic skin to standardised injury is not different from that in normal skin. **J. Dermatol. Sci.**, v.16, n.1, p. 85, 1998.

VASCONCELLOS, F.C.; GOULART, G.A.S.; BEPPU, M.M. Production and characterization of chitosan microparticles containing papain for controlled release applications. **Powder Technol.**, v.205, p.65-70, 2011.

VEHRING, R.; FOSS, W. R.; LECHUGA-BALLESTEROS, D. Particle formation in spray drying. **J. Aerosol Sci.**, v.38, n.7, p. 728-746, 2007.

VENTURA, C.A.; TOMMASINI, S.; CRUPI, E.; GIANNONE, I.; CARDILE, V.; MUSUMECI, T.; PUGLISI, G. Chitosan microspheres for intrapulmonary administration of moxifloxacin: Interaction with biomembrane models and *in vitro* permeation studies. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.68, n.2, p.235-244, 2008.

VIERA, G.H.; MOURÃO, J.A.; ANGELO, A.M.; COSTA, R.A.; VIEIRA, R.H. Antibacterial effect (*in vitro*) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v.52, n.3, p.129- 132, 2010.

VILLASMIL-SANCHES, S.; RABASCO, A.M.; GONZALES-RODRIGUES, M.L. Thermal and ³¹P-NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative ³¹P-NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. **Colloids Surf. B Biointerfaces**, v.1, n.105, p.14-23, 2013.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v.156, p.67–72, 2001.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: A review of the current and future technologies. **Dermatol. Ther.**, v.23, p. 31-47, 2010.

WANG, F.; YANG, J. A comparative study of caffeic acid and a novel caffeic acid conjugate SMND-309 on antioxidant properties *in vitro*. **LWT - Food Sci. Technol.**, v.46, p. 239-244, 2012.

WEN, A.M.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiol.**, v.20, p. 305-11, 2003.

WIECHERS, J. W. Aspects of multifunctionality in skin care products. In: SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. (Ed.). **Multifunctional cosmetics**. New York: Marcel Dekker, 2003, v.26 (Cosmetic Science and Technology Series), Cap. 5, p.83-98.

WHITEMAN, M.; CHEUNG, N.S.; ZHU, Y.Z.; CHU, S.H.; SIAU, J.L.; WONG, B.S.; ARMSTRONG, J.S.; MOORE, P.K. Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 326, n. 4, p. 794-798, 2005.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WILLIAMS, D.F.; SCHMITT, W.H. **Cosmetics and toiletries industry**. 2. ed. London: Blackie Academic & Professional, 1992.

WORLDWIDE CHEMICAL INFORMATION, TRADING & ADVERTISING.

Caffeic Acid. Disponível em:

<http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/CAFFEIC%20ACID.htm>.

Acesso em: 25 mar. 2018.

WRIGHT, G.D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chem. Commun.**, v. 47, p. 4055-4061, 2011.

YANG, Y.; CHUNG, T.; BAI, X. L.; CHAN, W. K. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. **Chem. Eng. Sci.**, v. 55, p. 2223-2236, 2000.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photo ageing: Mechanism, prevention and therapy. **Br. J. Dermatol.**, v.157, p.874–877, 2007.

YAMADA, Y.; YASUI, H.; SAKURAI, H. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. **Photochem. Photobiol.**, v.82, p.1668-1676, 2006.

YU, Y.; WANG, Q.; YUAN, J.; FAN, X.; WANG, P.; LI, CUI. Hydrophobic modification of cotton fabric with octadecylamine via laccase/TEMPO mediated grafting. **Carbohydr Polym.**, v.137, p. 549- 555, 2016.

ZANETTI-RAMOS, B.G. Quebrando paradigmas com a nanotecnologia. **Cosmetics & Toiletries**, v. 27, p.50, 2015.

ZHAVEH, S.; MOHSENI FAR, A.; BEIKI, M.; KHALILI, S. T.; ABDOLLAHI, A.; RAHMANI-CHERATI, T.; TABATABAEI, M. Encapsulation of Cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. **Ind. Crops and Prod.**, v.69, p. 251- 256, 2015.

ZGLICZYŃSKI, J.M.; STELMASZYŃSKA, T.; DOMAŃSKI, J.; OSTROWSKI, W. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 235, n. 3, p. 419-&, 1971.

ANEXO I

UNIVERSITAT
 VALÈNCIA Vicerectorat
 d'Investigació i Política Científica

D. José María Montiel Company, Profesor Contratado Doctor Interino del departamento de Estomatología, y Secretario del Comité Ético de Investigación en Humanos de la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València,

CERTIFICA:

Que el Comité Ético de Investigación en Humanos, en la reunión celebrada el día 4 de julio de 2016, una vez estudiado el proyecto de investigación titulado:

“Evaluación de la absorción transdérmica, la distribución de activos en las distintas capas de la piel y acumulación en folículo piloso de un radioprotector de uso tópico de uso tópico”, número de procedimiento H1462978691586,

cuya responsable es Dña. Ana Melero Zaera,

ha acordado informar favorablemente el mismo dado que se respetan los principios fundamentales establecidos en la Declaración de Helsinki, en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y cumple los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

Y para que conste, se firma el presente certificado en Valencia, a cinco de julio de dos mil dieciséis.

