

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Dissertação** será disponibilizado somente a partir de 29/09/2022.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

**MÉTODOS ALTERNATIVOS AOS MAMÍFEROS PARA AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÃO E EM FORMULAÇÃO
COSMÉTICA**

SAMANTA DE MATOS SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria Fusco Almeida

COORIENTADORA: Dra. Junya de Lacorte Singulani

ARARAQUARA – SP

2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

MÉTODOS ALTERNATIVOS AOS MAMÍFEROS PARA AVALIAÇÃO DA
TOXICIDADE DO ÁCIDO GÁLICO EM SOLUÇÃO E EM FORMULAÇÃO
COSMÉTICA

SAMANTA DE MATOS SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida
COORIENTADORA: Dra. Junya de Lacorte Singulani

ARARAQUARA - SP
2020

S586m Silva, Samanta de Matos.
Métodos alternativos aos mamíferos para avaliação da toxicidade do ácido gálico em solução e em formulação cosmética / Fernando Henrique Buzo. – Araraquara: [S.n.], 2020.
76 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.
Coorientadora: Junya de Lacorte Singulani.

1. *Galleria mellonella*. 2. *Caenorhabditis elegans*. 3. HaCat. 4. HDFa. 5. HepG2. 6. Ácido gálico. 7. Aplicação tópica. 8. Cosméticos. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Singulani, Junya de Lacorte, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Métodos alternativos aos mamíferos para avaliação da toxicidade do ácido gálico

AUTORA: SAMANTA DE MATOS SILVA

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORDINADORA: JUNYA DE LACORTE SINGULANI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. ANA MARISA FUSCO ALMEIDA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. LILIANA SCORZONI
Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal / Instituto de Ciência e Tecnologia do Câmpus de São José dos Campos da UNESP

Profa. Dra. KETYLIN FERNANDA MIGLIATO
Departamento de Ciências Biológicas / Centro Universitário Central Paulista - UNICEP

Araraquara, 29 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Prof. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida por me confiar a realização desta pesquisa e por ter me ajudado em momentos difíceis durante a graduação e pós-graduação.

À minha coorientadora Dra. Junya de Lacorte Singulani por todos os conhecimentos transmitidos, a assistência para a realização dos ensaios, as leituras e releituras deste trabalho, pelas conversas, aconselhamentos e amizade. Sem você tudo teria sido muito mais difícil.

Agradeço minha companheira Camila por todo apoio, cuidado, escuta e incentivos durante os momentos difíceis que fizeram toda a diferença durante o mestrado (e a vida).

À minha família Claudiney, Vilma, Jéssica, Felipe, Lucas, Viviane, Giulia, Cláudia, Magdalena e Maria Fernanda por todo suporte e encorajamento.

Aos colegas de trabalho do Núcleo de Proteômica Natália, Lígia, Carol Vaso, Angélica, Lariane, Kelvin, Ana Carolina, Carol Mineira, Níura, Kaila, Paulo e Cláudia pelas trocas, ajudas teóricas e técnicas e por tornarem o trabalho mais leve.

À Ketylin, coordenadora do projeto, por acompanhar a realização e fornecer as bases para a realização desta pesquisa.

Aos queridos amigos Isabela, Jonas, Natália e Amanda por estarem ao meu lado durante este processo.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

E a todos aqueles que não foram nomeados e que estiveram comigo, independentemente da distância, dando suporte e boas risadas que tornaram esse período mais leve.

RESUMO

O envelhecimento cutâneo é um processo natural que possui causas internas e externas, dentre elas encontra-se o aumento do estresse oxidativo do organismo que gera danos celulares permanentes. Para minimizar os efeitos das espécies reativas de oxigênio (EROs), os antioxidantes são utilizados para neutralizar estas moléculas e retardar o envelhecimento cutâneo. Novas pesquisas vêm ocorrendo na busca de novas moléculas com atividade antioxidante, sobretudo busca-se substâncias de origem natural que possuam eficácia antioxidante comprovada. Nesse sentido, o ácido gálico (AG), metabólito secundário de vegetais, demonstrou alta capacidade antioxidante, sendo um ativo promissor para formulações cosméticas. Além de sua alta eficácia antioxidante, o AG possui atividade antifúngica, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória que associadas aos cosméticos trariam grandes benefícios aos consumidores. Para que um novo produto cosmético seja incorporado ao mercado são necessários ensaios que demonstrem sua segurança ao consumidor. Em razão disso, ensaios de toxicidade, corrosão e irritação são realizados para garantir que o produto esteja salvo de tais reações ao ser humano. Estes ensaios possuem o histórico de terem sido realizados em animais mamíferos, contudo, devido a questões éticas, estas metodologias vêm sendo substituídas por métodos alternativos. Dentre os métodos alternativos disponíveis atualmente encontram-se culturas celulares, o nematoide *Caenorhabditis elegans* e o inseto *Galleria mellonella*. O presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do AG nestes métodos e modelos alternativos aos mamíferos. Para os ensaios de citotoxicidade utilizou-se das linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT), fibroblastos de derme humana (HDFa) e de hepatocarcinoma humano (HepG2). O ensaio de toxicidade com *C. elegans* foi realizado por contato com o AG em solução e *G. mellonella* foi submetido à avaliação da toxicidade do AG em solução administrada por via injetável e em emulsão óleo/água aplicada nas larvas através da via tópica. Os resultados identificados para CI50 do AG para as linhagens celulares HaCat, HDFa e HepG2 foram iguais a 182,5, 303,4 e 265,1 µg/mL, respectivamente, em 24 h de tratamento e 138,8, 247,0 e 207,8 µg/mL em 48 h. Para o método *in vivo* *C. elegans* a CL50 foi de 16,08 µg /mL em 96 h e para *G. mellonella* a DL50 foi superior a 920 mg/Kg tanto por via injetável quanto por via tópica. Além disso, larvas de *G. mellonella* não apresentaram alteração na resposta imune celular, representada pelo número de hemócitos quando tratadas com

concentrações entre 50 e 200 µg/larva por via injetável e por via tópica. Por outro lado, a resposta humoral das larvas foi alterada pela observação da melanização quando tratadas com 100, 150 e 200 µg/ larva de AG por via injetável e com 150 e 200 µg/larva de AG por via tópica. Concluiu-se que o modelo *C. elegans* demonstrou maior sensibilidade ao AG, seguido das linhagens celulares HaCat, HepG2 e HDFa, respectivamente. *Galleria mellonella* se mostrou uma metodologia promissora para ensaios de toxicidade de cosméticos por via tópica, sendo necessárias pesquisas futuras que validem sua utilização.

Palavras-chave: *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, HaCat, HDFa, HepG2, ácido gálico, aplicação tópica, cosméticos.

ABSTRACT

Skin aging is a natural process that has internal and external causes, among them encounter the increase of the oxidative stress of the organism that generates permanent cellular damage. To minimize the effects of reactive oxygen species (ROS), antioxidants are used to neutralize these molecules and delay the cutaneous aging. New researches have been going on in the search of new molecules with antioxidant activity, it mainly searches for substances of natural origin that possess proven antioxidant efficacy. In this sense, gallic acid (GA), secondary vegetable metabolite, demonstrated high antioxidant capacity, being a promising active for cosmetic formulations. Besides its high antioxidant efficacy, the GA has antifungal, antimicrobial, antiviral and anti-inflammatory activity and which associated with cosmetics would bring great benefits to consumers. In order for a new cosmetic product to be incorporated to the market, it is necessary tests that demonstrate its safety to the consumer. Because of that, toxicity, corrosion and irritation tests are carried out to ensure that the product is safe from such reactions to humans. These tests have a history of being performed on mammalian animals, however, due to ethical issues, these methodologies are being replaced by alternative methods. Among the alternative methods currently available are cellular cultures, the nematoid *Caenorhabditis elegans* and the insect *Galleria mellonella*. The present study aimed to evaluate the toxicity of the GA in these methods and alternative models to the mammals. For the cytotoxicity assays human keratinocyte cell lines (HaCaT), human dermis fibroblasts (HDFa) and human liver cancer cell line (HepG2) were used. The toxicity test with *C. elegans* was performed with the GA in solution and *G. mellonella* was submitted to the evaluation of the toxicity of the GA in solution administered through the injectable route and in oil/water emulsion applied to the larvae through the topical route. The results identified for IC₅₀ of the GA for the HaCat, HDFa and HepG2 cell lines were 182.5, 303.4 and 265.1 µg/mL, respectively, in 24 h treatment and 138.8, 247.0 and 207.8 µg/mL in 48 h. For the *in vivo* method *C. elegans* the CL₅₀ was 16.08 µg/mL in 96 h and for *G. mellonella* the DL₅₀ was higher than 920 mg/Kg both by injection and topical route. Moreover, *G. mellonella* larvae showed no change in cellular immune response, represented by the number of hemocytes when treated with concentrations between 50 and 200 µg/larva by injection and topical route. On the other hand, the humoral response of the larvae was altered by the observation of melanization when treated with 100, 150 and 200 µg/larva of GA by

injection and with 150 and 200 µg/larva of GA by topic application. It was concluded that the methodology *C. elegans* demonstrated higher sensitivity to GA, followed by the HaCat, HepG2 and HDFa cell lines, respectively. *Galleria mellonella* has shown to be a promising methodology for topical toxicity testing of cosmetics, requiring future research to validate its use.

Keywords: *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, HaCat, HDFa, HepG2, gallic acid, topical application, cosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido gálico (AG)	23
Figura 2 – Imagem representativa de larvas de <i>C. elegans</i> adultas em meio de cultura Nematode Growth Medium (NGM)	27
Figura 3 – Desenvolvimento da larva de <i>G. mellonella</i>	28
Figura 4 – Representação do sistema imune das larvas de <i>G. mellonella</i>	29
Figura 5 – Diferença da melanização das larvas de <i>G. mellonella</i>	37
Figura 6 – Viabilidade celular da linhagem queratinócitos humanos (HaCaT) exposta a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão	40
Figura 7 – Viabilidade celular de fibroblastos de derme humana (HDFa) expostos a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão	41
Figura 8 – Viabilidade celular da linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) exposta a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão	42
Figura 9 – Porcentagem de sobrevivência de larvas de <i>C. elegans</i> após tratamento com ácido gálico (AG) por contato. Dados expressos com média e desvio padrão, n amostral igual a $11 < n < 15$ larvas por grupo em cada experimento	43
Figura 10 – Sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> tratadas com solução de ácido gálico (AG) por via injetável (VI). Dados expressos como média e desvio padrão, com n amostral entre $8 < n < 10$ larvas por grupo em cada experimento	44
Figura 11 – Sobrevivência das larvas de <i>G. mellonella</i> tratadas com ácido gálico (AG) em sistema emulsionado por VT. Dados expressos como média e desvio padrão, com n amostral entre $8 < n < 10$ larvas por grupo em cada experimento	45
Figura 12 – Quantificação de hemócitos das larvas de <i>G. mellonella</i> após tratamentos com ácido gálico (AG) por VI. Dados expressos como média e desvio padrão	46
Figura 13 – Quantificação de hemócitos das larvas de <i>G. mellonella</i> após tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT). Dados expressos como média e desvio padrão	47
Figura 14 – Diferença de melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após 24h do tratamento com ácido gálico (AG) por via injetável (VI).....	47

Figura 15 – Score de melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após o tratamento com ácido gálico (AG) por via injetável (VI). Dados expressos como média e desvio padrão	48
Figura 16 – Diferença de melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após 24h do tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT).....	49
Figura 17 – Score de melanização das larvas de <i>G. mellonella</i> após o tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT). Dados expressos em média e desvio padrão	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistema emulsionado contendo ácido gálico (AG).....	35
Tabela 2 – Dose letal mediana (DL50), concentração letal mediana (CL50) e concentração inibitória mediana (CI50) do ácido gálico (AG) para diferentes células e modelos animais encontrados em trabalhos prévios da literatura e no presente estudo	52

LISTA DE ABREVIATURAS

3R	Reduce, Replace and Refine
AG	Ácido gálico
AMPK	Proteína-quinase ativada por monofosfato de adenosina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Butilhidroxianisol
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butilhidroxitolueno
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
CADD	Aided Drug Design
CI50	Concentração inibitória média
CL50	Concentração letal média
Concea	Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal
DL50	Dose letal média
DMEM	Dulbecco Modification of Minimum Essential Media
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Erk	Quinase regulada por sinal extracelular
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fak	Quinase de adesão focal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GA	Gallic acid
HaCat	Célula de queratinócito humanos
HDFa	Célula de fibroblasto de derme humana
HepG2	Célula de hepatocarcinoma humano
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL-1 β	Interleucina- 1 β
IL-6	Interleucina -6

MMPs	Metaloproteinases de matriz
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NGM	Nematode Growth Medium
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PBS	Tampão fosfato alcalino
PLC	Policaprolactona
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
ROS	Reactive oxygen species
UFAW	Universities Federation for Animal Welfare
UV	Ultravioleta
VI	Via injetável
VT	Via tópica

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
µg	Micrograma
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
µm	Micrômetro
cm	Centrímetro
cm ²	Centímetro quadrado
g	Grama
g/mL	Grama por mililitro
g/mol	Grama por mol
h	Horas
Kg	Kilograma
M	Molar
mg	Miligrama
mg/Kg	Miligrama por kilograma
mg/mL	Miligrama por mililitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milimetro
n	Número
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
rpm	Rotações por minuto

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3 REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1 Envelhecimento cutâneo e novas perspectivas de tratamentos cosméticos	20
3.2 Antioxidantes naturais	21
3.3 O ácido gálico e suas propriedades	22
3.4 Métodos alternativos ao uso de animais mamíferos.....	24
3.4.1 Métodos <i>in vitro</i> – Cultura celular	25
3.4.2 Métodos <i>in vivo</i> – <i>Caenorhabditis elegans</i>	26
3.4.3 Métodos <i>in vivo</i> - <i>Galleria mellonella</i>	27
4 METODOLOGIA	32
4.1 Substâncias químicas.....	32
4.2 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade	32
4.2.1 Preparo da solução de AG	32
4.2.2 Condições de manutenção das células	32
4.2.3 Ensaio de citotoxicidade.....	32
4.3 Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Caenorhabditis elegans</i>	33
4.3.1 Preparo da solução de AG	33
4.3.2 Ensaio de toxicidade	33
4.4 Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	34
4.4.1 Preparo da solução de AG para ensaio por VI	34
4.4.2 Preparo da emulsão contendo AG para ensaio por VT	34
4.4.3 Condições gerais de manutenção	35
4.4.4 Tratamento das larvas.....	35
4.4.5 Ensaio de sobrevivência das larvas	36
4.4.6 Quantificação de hemócitos	36
4.4.7 Quantificação de melanização.....	37
4.5 Análise estatística.....	37
5 RESULTADOS.....	39
5.1 Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade.....	39

5.1.1 Linhagem celular HaCat	39
5.1.2 Linhagem celular HDFa	40
5.1.3 Linhagem celular HepG2	41
5.2 Ensaio <i>in vivo</i> com <i>Caenorhabditis elegans</i>	42
5.4 Ensaios <i>in vivo</i> com <i>Galleria mellonella</i>	43
5.4.1 Ensaio de sobrevivência	43
5.4.2 Quantificação de hemócitos	45
5.4.3 Quantificação de melanização	47
6 DISCUSSÃO	50
7 CONCLUSÃO	63
REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

Há muitos séculos o uso de cosméticos esteve presente em diversas civilizações. A ciência relata seu uso desde o Egito antigo e Mesopotâmia para fins ornamentais e ritualísticos, sendo sua utilização acompanhada de mudanças culturais desde então. Foi somente no século XVI que os cosméticos se tornaram parte da moda e seu uso foi difundido principalmente com a finalidade de melhorar a aparência e esconder imperfeições na face (WITKOWSKI; PARISH, 2001; GONZÁLEZ-MINERO; BRAVO-DÍAZ, 2018). Atualmente, os produtos cosméticos possuem as funções de mudar a aparência, manter o corpo em boas condições, proteger e corrigir os odores do corpo (SHAI; BARAN; MAIBACH, 2009). Nesse contexto, prevenir e retardar os sinais do envelhecimento cutâneo, bem como o câncer de pele, são importantes alvos de pesquisas de novos cosméticos (ZANG; DUAN, 2018).

O envelhecimento cutâneo é um processo natural que ocorre ao longo da vida e o aparecimento de linhas de expressão pode ser ocasionado por diversos fatores. Dentre eles pode-se citar o estresse oxidativo que ocorre devido ao desequilíbrio da capacidade de o organismo neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs), moléculas muito reativas que são produzidas pela mitocôndria quando a pele é exposta aos raios ultravioleta (UV). Essas moléculas desencadeiam danos à estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios e proteínas, as quais podem acarretar em lesões teciduais, envelhecimento prematuro da pele, inflamações e outros agravos e, em maior grau, podem gerar câncer de pele (SCOTTI; VELASCO, 2003; WALTERS; ROBERTS, 2007; WANG; DREESSEN, 2018; BOCHEVA; SLOMINSKI; SLOMINSKI, 2019).

Nesse sentido, o uso de cosméticos que contém em sua formulação antioxidantes que combatem o estresse oxidativo cutâneo e retardam o envelhecimento tem sido amplamente difundidos por diversas empresas, como a Mantecorp® fabricante do cosmético Urby® que possui em sua composição o resveratrol da uva que atua como antioxidante, a Vichy® e seu cosmético Idélia yeux® que utiliza a cafeína e também a ROC® e seu C Supérieur® que utiliza o ácido ascórbico. Além dos antioxidantes em cosméticos serem o princípio ativo que protege a pele dos efeitos dos radicais livres, eles ainda evitam alterações nos produtos advindas da oxidação de substâncias graxas e lipídicas responsáveis pela produção de maus odores e mudança de cor que depreciam e desvalorizam o

produto (ST ANGELO *et al.*, 1996; SILVA; MICHNIAK-KOHN; LEONARDI, 2017).

Compreende-se hoje que a utilização de alguns cosméticos ocasionou sérios agravos à saúde humana por provocarem toxicidade cutânea e até mesmo sistêmica. Cosméticos que continham metais pesados em sua formulação foram responsáveis por tais efeitos danosos ao ser humano. Alguns exemplos de metais pesados contidos em cosméticos no passado são o antimônio, mercúrio, chumbo, arsênio, bismuto e zinco que ao serem absorvidos pela pele desencadeavam sintomas hepáticos, renais, musculares, dentários e poderiam inclusive interferir no sono (WITKOWSKI; PARISH, 2001; FISCHER *et al.*, 2017; BOBAKER *et al.*, 2019). Embora haja conhecimento sobre os malefícios causados à saúde pelo uso de alguns compostos químicos, eles continuam sendo amplamente utilizados no dia a dia da maioria das pessoas. Este é o caso do uso dos antioxidantes fenólicos sintéticos butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT) que estão presentes em alimentos industrializados e embalagens destes, em cosméticos e em medicamentos (XIU-QUIN *et al.*, 2009).

Em 1986 a International Agency for Research on Cancer (IARC) publicou resultados de estudos que avaliaram o potencial carcinogênico de várias substâncias químicas, incluindo o BHA e o BHT e concluíram que a administração de BHA em ratos estava diretamente relacionada ao aumento da incidência de câncer no fígado e na bexiga (IARC, 1986). Além disso, estudos subsequentes apontaram que os antioxidantes fenólicos sintéticos possuíam a capacidade de causar mutações no DNA, alterar funções reprodutoras, interferir no sistema endócrino e gerar desequilíbrios na esteroidogênese (BOTTERWECK *et al.*, 2000; KANG *et al.*, 2005; JEONG *et al.*, 2005; MEIER *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2018).

Dessa forma, a busca por antioxidantes naturais que não acarretem prejuízos à saúde dos consumidores se tornou imprescindível. Estudos recentes demonstram haver presença de atividade antioxidante na uva, no morango, no chá verde, no açaí e no jabolão (MOHAMED; ALI; EL-BRAZ, 2013; GIAMPIERI; ALVAREZ-SUAVEZ; BATTINO, 2014; NERI-NUMA *et al.*, 2017; RAZMARAI *et al.*, 2017; KOONYOSYING *et al.*, 2018). O fruto do jabolão, em especial, possui metabólitos secundários com alta capacidade antioxidante, dentre os quais encontra-se o ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) (AG) e devido a esta propriedade protege o organismo do estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID, 2006; MOHAMED; ALI; EL-BRAZ, 2013; BADHANI; SHATMA; KAKKAR, 2015).

Associado à sua atividade antioxidante, o AG tem demonstrado possuir ação antifúngica, antimicrobiana, antiviral e até mesmo anti-inflamatória (OSBORNE; PEELER; ARCHER, 1981; KROES *et al.*, 1992; BORGES *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017; DE PAULA E SILVA *et al.*, 2019), características essas que associadas a um cosmético trariam grandes benefícios aos seus consumidores.

Ao desenvolver formulações cosméticas deve-se levar em consideração a segurança e o risco de exposição dos usuários ao produto, sendo assim, testes de irritação, absorção e corrosividade cutânea são realizados. Estes testes possuem o histórico de terem sido realizados em mamíferos, tais como camundongos, coelhos, cachorros e primatas. Atualmente, busca-se uma redução brusca do uso destes animais e também seu uso humanitário em pesquisas científicas através do conceito dos 3Rs (reutilizar, refinar, substituir), conceito implementado por Russell e Bruch em 1959 que vem consolidando-se através de leis que regulamentam a pesquisa científica com intuito de reduzir o número de animais utilizados e substituir estes por modelos alternativos e com isso minimizar a dor que possam vir a sentir (MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009; ELLISON *et al.*, 2019).

Para que tais objetivos fossem alcançados, alguns métodos ou modelos alternativos ao uso de mamíferos têm sido implementados em pesquisas científicas, tais como culturas celulares, *Danio rerio* (zebrafish), *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus*, *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella* (CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018).

Tais metodologias possuem menor custo, necessitam de espaços pequenos, maior facilidade de manutenção e manuseio, crescem em tempo reduzido proporcionando estudos em larga escala e não possuem restrições éticas quando comparados aos mamíferos (DOKE; DAHWALE, 2015; SINGULANI *et al.*, 2018).

Diante disso, buscou-se avaliar a toxicidade do AG em diferentes métodos e modelos alternativos aos mamíferos. Além disso, um produto cosmético contendo AG em sua formulação como ativo antioxidante foi desenvolvido e testado por via tópica em *G. mellonella*. O trabalho pode contribuir futuramente na validação desses métodos e modelos alternativos em ensaios de toxicidade de cosméticos.

7 CONCLUSÃO

A avaliação da toxicidade do AG em diferentes modelos e métodos alternativos aos mamíferos indicou diferentes concentrações tóxicas do composto para cada um deles através da análise da CI50, CL50 e DL50. *C. elegans* apresentou maior sensibilidade ao AG, seguido das células HaCat, HepG2 e HDFa, respectivamente. *G. mellonella* não apresentou toxicidade ao AG nas concentrações estudadas.

O ensaio de citotoxicidade com as linhagens celulares sugere que a CI50 do AG em 24 h é superior àquela apresentada em 48 h nas três linhagens de células aqui estudadas. A partir disso, podemos sugerir que a toxicidade ao AG aumentou conforme o tempo de tratamento aumentou, sendo necessárias menores concentrações em 48 h para gerar o mesmo efeito observado em 24 h.

A toxicidade do AG foi avaliada no método alternativo aos mamíferos *C. elegans* através da quantificação da CL50 e através desse dado concluímos que é necessária uma concentração de aproximadamente 7 vezes menor que a observada em modelos celulares para levar à morte de 50% das larvas.

O método alternativo aos mamíferos *G. mellonella* foi submetido aos ensaios de avaliação da sobrevivência, quantificação de hemócitos e melanização para análise da toxicidade do AG. Concluímos que não foi possível determinar a DL50 da substância quando administrada em solução por via injetável ou em emulsão óleo/água por via tópica.

Para os ensaios de via tópica com *G. mellonella* concluímos que uma formulação de emulsão óleo/água foi mais adequada para a homogeneização do AG nas concentrações propostas quando comparada a uma formulação aquosa de gel de hidroxietilcelulose 2%.

Os ensaios realizados através da via injetável do AG em solução na *G. mellonella* sugerem que não houve alterações na taxa de sobrevivência e na resposta imune celular. A pesquisa ainda sugere que há alterações na resposta humoral do inseto quando tratadas com concentrações de AG em solução acima de 463 mg/Kg. Para os ensaios realizados com a aplicação da emulsão óleo/água através da via tópica nas larvas de *G. mellonella*, os resultados apontam semelhanças ao observado no animal quando o AG foi aplicado por via injetável em

solução, difere somente em concentração capaz de ocasionar alterações na resposta humoral que foram superiores a 695 mg/Kg.

Os métodos alternativos de culturas celulares das linhagens HaCat, HepG2 e HDFa e o modelo alternativo aos mamíferos *C. elegans* se mostraram viáveis para avaliação da toxicidade do AG através dos dados de CI50 e CL50, respectivamente.

Galleria mellonella se mostrou um modelo promissor na investigação da toxicidade do AG e estudos futuros que demonstrem a viabilidade deste modelo ser utilizado em ensaios de toxicidade de cosméticos através da via tópica são necessários para concluir a possibilidade de sua validação como método alternativo.

REFERÊNCIAS

- ALLARD, P. *et al.* A *C. elegans* screening platform for the rapid assessment of chemical disruption of germline function. **Environ. Health Perspect.**, Massachusetts, v. 121, n. 6, p. 717-724, 2013.
- ALLEGRA, E. *et al.* *Galleria mellonella* larvae allow the discrimination of toxic and non-toxic chemicals. **Chemosphere**, Inglaterra, v. 198, p. 469-472, 2018.
- ALNUQAYDAN, A. M.; SANDERSON, B. J. Toxicity and genotoxicity of beauty products on human skin cells in vitro. **J. Clin. Toxicol.**, Austrália, v. 6, n. 4, 9 p., 2016.
- ALONSO, C. *et al.* Skin penetration and antioxidant effect of cosmeo-textiles with gallic acid. **J. Photochem. Photobiology**, Barcelona, v. 156, p. 50-55, 2016.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. 2ª ed., Brasília, 2012a.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira**. 2ª ed., Brasília, 2012b.
- ALI, A. *et al.* Nanomaterial induced immune responses and cytotoxicity. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, Itália, v. 16, n. 1, p. 40-57, 2016.
- APFELD, J.; ALPER, S. What can we learn about human disease from the nematode *C. elegans*? **Methods Mol. Biol.**, Estados Unidos, v. 1706, p. 53-75, 2018.
- ATIT, R.; THULABANDU, V.; CHEN, D. Dermal fibroblast in cutaneous development and healing. **Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.**, Cleveland, v. 7, n. 2, 2018.
- BALLS, M. Alternative to animal experiments: serving the middle ground. **AATEX**, Reino Unido, v. 11, n. 1, p. 4-14, 2005.
- BADHANI, B.; SHATMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Adv.**, Índia, n. 35, 632 p., 2015.
- BARREIROS, A.L.B.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BIRBEN, E. *et al.* Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organ J.**, Ankara, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BLANCO, L. A. A. *et al.* Differential cellular immune response of *Galleria mellonella* to *Actinobacillus pleuropneumoni*. **Cell and Tissue Research**, Viçosa, v. 370, n. 1, p. 153-168, 2017.
- BOBAKER, A. M. *et al.* Determination and assessment of the toxic heavy metal elements abstracted from the traditional plant cosmetics and medical remedies: case study in Libya. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Benghazi, v. 16, n. 11, art. n.

1957, 2019.

BOCHEVA, G.; SLOMINSKI, R. M.; SLOMINSKI, A. T. Neuroendocrine aspects of skin aging. **Int. J. Mol.**, Bulgaria, v. 20, n. 11, 19 p., 2019.

BORGES, A. *et al.* Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acid against pathogenic bacteria. **Microb. Drug Resist.**, Porto, v. 19, n. 4, p. 256-265, 2013.

BOTTERWECK, A.A. *et al.* Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherland cohort study. **Food Chem. Toxic.**, Holanda, v. 38, n. 7, p. 599-605, 2000.

BOYD, W. A. *et al.* A high-throughput for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay. **Toxic. Appl. Pharmacol.**, Estados Unidos, v. 245, n. 2, p. 153-159, 2010.

BOYD, W. A. *et al.* Developmental effects of the ToxCast™ phase I and phase II chemicals in *Caenorhabditis elegans* and corresponding responses in zebrafish, rats, and rabbits. **Environ Health Perspect.**, Carolina do Norte, v. 125, n. 5, p. 586-593, 2016.

BRASIL. **Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008.** Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm>. Acesso em: 11 maio de 2020.

BROWNE, N.; HEELAN, M.; KAVANAGH, K. An analysis of structural and functional similarities of insect hemocytes and mammalian phagocytes. **Virulence**, Irlanda, v. 4, n. 7, p. 597-603, 2013.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, Bragança, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARVALHO, A. N. *et al.* Oxidative stress and antioxidants in neurological diseases: is there still hope? **Curr Drug Targets**, Lisboa, v. 18, n. 6, p. 705-718, 2017.

CAVINATO, M. *et al.* Plant extracts and natural compounds used against UVB-induced photoaging. **Biogerontology**, Austria, v. 18, n. 4, p. 499-516, 2017.

CHAIKUL, P. *et al.* Characteristics and in vitro anti-skin aging activity of gallic acid loaded in cationic CTAB noisome. **Europ. J. Pharm. Sci.**, Tailândia, v. 131, p. 39-49, 2019.

CHAMPION, O. L.; TITBALL, R. W.; BATES, S. Standardization of *G. mellonella* larvae to provide reliable and reproducible results in the study of fungal pathogens. **J. Fungi**, Exeter, v. 6, n. 3, 11 p., 2018.

COATES, C. J. *et al.* The insect, *Galleria mellonella*, is a compatible model for evaluating the toxicology of okadaic acid. **Cell Biol. Toxicol.**, País de Gales, v. 35, n. 3, p. 219-232, 2019.

CORSI, A. K.; WIGHTMAN, B.; CHALFIE, M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. **Genetics**, Washington, v. 200, n. 2, p. 387-407, 2015.

DE PAULA E SILVA, A. C. A. *et al.* Decyl gallate as a possible inhibitor of N-glycosylation process in *Paracoccidioides lutzii*. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Araraquara, v. 63, p. 1909-1918, 2019.

D'ORAZIO, J. *et al.* UV radiation and the skin. **Int. J. Molec. Sci.**, Kentucky, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

Di MATTIA, C. *et al.* Effect of phenolic antioxidants on the dispersion state and chemical stability of olive oil O/W emulsions. **Food Res. Int.**, Itália, v. 42, n. 8, p. 1163-1170, 2009.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: a review. **Saudi Pharm. J.**, India, v. 23, n. 3, p. 223-229, 2015.

DOLLAHITE, J. W.; PIGEON, R. F.; CAMP, B. J. The toxicity of gallic acid, pyrogallol, tannic acid, and *Quercus havardi* in the rabbit. **Am. J. Vet. Res.**, Estados Unidos, v. 23, p. 1264-1267, 1962.

DONATO, M. T.; TOLOSA, L.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. In: VINKEN, M.; ROGIERS, V. **Protocols in In Vitro Hepatocyte Research. Methods in Molecular Biology**. Nova York: Ed. Springer Protocols, 2014. p. 77-93.

DZIALO, M. *et al.* The potencial of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. **Int. J. Mol. Sci.**, Wroclaw, v. 17, n. 2, art. n. 160, 2016.

ELLIS, J. D. *et al.* Standard methods for wax moth research. **J. Apicul. Res.**, Flórida, v. 52, n. 1, p. 1-17, 2013.

ELLISON, C. A. *et al.* Challenges in working towards an internal threshold of toxicological concern (iTTC) for use in the safety assessment of cosmetics: discussions from the cosmetics Europe iTTC working group workshop. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Estados Unidos, v. 103, p. 63-72, 2019.

ERIRHIE, E. O.; IHEKWEREME, C. P.; IIODIGWE, E. E. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. **Interd. Toxicol.**, Nigéria, v. 11, n. 1, p. 5-12, 2018.

FISCHER, A. *et al.* The assessment of toxic metals in plant udes in cosmetics and cosmetology. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, Polônia, v. 14, n. 10, art n. 1280, 2017.

Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). **Métodos Alternativos**. Disponível em: <<https://www.ictb.fiocruz.br/content/m%C3%A9todos-alternativos>>. Acesso em: 15 julho de 2020.

GASPARRINI, M. *et al.* Strawberry-Based Cosmetic Formulations Protect Human Dermal Fibroblasts against UVA-Induced Damage. **Nutrients**, Itália, v. 9, n. 6, 15 p., 2017.

GIAMPIERI, F.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; BATTINO, M. Strawberry and human health: effects beyond antioxidante activity. **J. Agric. Food Chem.**, Itália, v. 62, n. 16, p. 3867-3876, 2014.

GILCHREST, B. A. A review of skin ageing and medical therapy. **British Journal of Dermatology**, Boston, v. 135, n. 6, p. 867-875, 1996.

GOMES, L. A. P. *et al.* *Punica granatum* L. (pomegranate) extract: *in vivo* study of antimicrobial activity against *Porphyromonas gingivalis* in *Galleria mellonella* model. **Sci. World J.**, v. 2016, 5 p., 2016.

GONZÁLEZ-MINERO, F. J.; BRAVO-DÍAZ, L. The use of plants in skin-care products, cosmetics and fragrances: past and present. **Cosmetics**, Espanha, v.5, art. n. 50, 2018.

HALLIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radic. Res. Commun**, Londres, v. 9, n. 1, p. 1-32, 1990.

HAMM, J. *et al.* Alternative approaches for identifying acute systemic toxicity: Moving from research to regulatory testing. **Toxicology in vitro**, Washington. v. 41, p. 245–259, 2017.

HARISHKUMAR, R. *et al.* Toxicity and selective biochemical assessment of quercetin, gallic acid, and curcumin in zebrafish. **Biol. Pharm. Bull.**, Vellore, v. 42, n. 12, p. 1969-1976, 2019.

HILL, A. J. *et al.* Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. **Toxicol. Sci.**, Madison, v. 86, n. 1, p. 6-19, 2005.

HUNT, P. R. The *C. elegans* model in toxicity testing. **J. Appl. Toxicol.**, Estados Unidos, v. 37, n. 1, p. 50-59, 2016.

HWANG, E. *et al.* Gallic acid regulates skin photoaging in UVB-exposed fibroblast in hairless mice. **Phytother. Res.**, Coreia, v. 28, n. 12, p. 1778-1788, 2014.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Butylated hydroxyanisole (BHA). In Some Naturally Occurring and Synthetic Food Components, Furocoumarins and Ultraviolet Radiation. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans**: vol. 40. Lyon, 1986. p. 123-159.

JANG, J. *et al.* Antiaging Activity of Peptide Identified from Fermented *Trapa Japonica* Fruit Extract in Human Dermal Fibroblasts. **Evidence-Based Complem. Alt. Medic.**, Seoul, art n. 2020, 2020.

JEONG, S. H. *et al.* Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. **Toxicology**, Coreia, v. 208, n. 1, p. 49-62, 2005.

KAHKONEN, M. P. *et al.* Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem**, Finlândia, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KANG, H. G. *et al.* Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. **Toxicology**, Coreia, v. 213, n. 1-2, p. 147-156, 2005.

KENNETH, B. B.; BRUCE, N. A. The free radical theory of aging matures. **Phys. Rev.**, Califórnia, v. 78, n. 2, p. 547-581, 1998.

KHLEBNIKOV, A. I. *et al.* Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.**, Rússia, v. 15, n. 4, p. 1749-1770, 2007.

KHORSANDI, K. *et al.* Anti- cancer effect of gallic acid in presence of low level laser irradiation: ROS production and induction of apoptosis and ferroptosis. **Cancer Cell Int.**, Tehran, v. 20, art. n. 18, 2020.

KIM, S. H. *et al.* Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. **Toxicol. Sci.**, Daegu, v. 91, n. 1, p. 123-131, 2006.

KOCH, W. *et al.* Applications of tea (*Camellia sinensis*) and its active constituents in cosmetics. **Molecules**, Polônia, v. 24, n. 23, art. n. 4277, 2019.

KOONYOSYING, P. *et al.* Green tea extract modulates oxidative tissue injury in beta-thalassemic mice by chelation of redox iron and inhibition of lipid peroxidation. **Biomed. Pharm.**, Tailândia, v. 108, p.1694-1702, 2018.

KOSTYUK, V. *et al.* Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics. **Rejuvenation Res.**, Minsk, v. 21, n. 2, p. 91–101, 2018.

KRIMMEL, B. *et al.* OH-radical induced degradation of hydroxybenzoic- and hydroxycinnamic acids and formation of aromatic products- A gamma radiolysis study. **Rad. Phys. Chem.**, Viena, v. 79, n. 12, p. 1247-1254, 2010.

KROES, B. H. *et al.* Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, Utrecht, v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

KWADHA, C. A. *et al.* The biology and control of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insects**, Nairobi, v. 8, n. 2, art. n. 61, 2017.

LAVINE, M. D.; STRAND, M. R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, Georgia, v. 32, n. 10, p. 1295-1309, 2002.

LI, Z. J. *et al.* Antifungal activity of gallic acid *in vitro* and *in vivo*. **Phytother. Res.**, Xingiang, v. 31, n. 7, p. 1030-1045, 2017.

LOBO, V. *et al.* Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, Bombay, v. 4, n. 8, p.118-126, 2010.

LOURENÇO, S. C.; MOLDAO-MARTINS; M.; ALVES, V. D. Antioxidants of natural plant origins: from sources to food industry applications. **Molecules**, Lisboa, v. 24, n. 22, art. n. 4132, 2019.

LOVELL, C. R. *et al.* Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. **British J. Dermatol.**, Reino Unido, v. 117, n. 4, p. 419-428, 1987.

MAKRANTONAKI, E.; ZOUBOULIS, C.C. Characteristics and pathomechanisms of endogenously aged skin. **Dermatology**, Alemanha, v. 214, n. 4, p. 352-360, 2007.

MARQUES, R.G.; MORALES, M.M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cirúrgica Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 1, p. 69-74, 2009.

MARTINS, C. *et al.* Development of W-1/O/W-2 emulsion with gallic acid in the internal aqueous phase. **Food Chem.**, Curitiba, v. 314, art. n. 126174, 2020.

McDANIEL, D.; FARRIS, P.; VALACCHI, G. Atmospheric skin aging- Contributors and inhibitors. **J. Cosmet. Dermatol.**, Virginia, v. 17, n. 2, p. 124-137, 2018.

MEIR, B. W. *et al.* Mechanistic basis for inflammation and tumor promotion in lungs of 2,6-di-tert-butyl-4- methylphenol-treated mice: electrophilic metabolites alkylate and inactivate antioxidant enzymes. **Chem. Res. Toxicol.**, Denver, v. 20, n. 2, p. 199-207, 2007.

MOHAMED, A. A.; ALI, S. I.; EL-BRAZ, F. K. Antioxidant And antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. **PloS One**, v. 8, n. 4, art. n. 60269, 2013.

MOON, S. S. *et al.* Synthesis of a novel α -glucosyl ginsenoside F1 by cyclodextrin glucanotransferase and its *in vitro* cosmetic applications. **Biomolecules**, Coreia, v.8, n. 4, art. n. 142, 2018.

MUSSARD, E. *et al.* *Andrographis paniculata* and its bioactive diterpenoids protect dermal fibroblasts against inflammation and oxidative stress. **Antioxidants**, Orléans, v.9, n. 5, art. n. 432, 2020.

NAM, S. H. *et al.* Transglycosylation of gallic acid by using *Leuconostoc glucansucrase* and its characterization as a functional cosmetic agent. **AMB Expr.**, Coreia do Sul, v. 7, art. n. 224, 2017.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. **Maturitas**, Manchester, v. 69, n. 3, p. 249-256, 2011.

NERI-NUMA, I. A. *et al.* Small Brazilian wild fruits: nutrients, bioactive compounds, health-promotion properties and commercial interest. **Food Res. Intern.**, Campinas, v. 103, p. 345-360, 2018.

NIEHUES, H. *et al.* 3D skin models for 3D research: The potencial of 3D reconstructed skin models to study skin barrier function. **Exp. Dermat.**, Nijmegen, v.27, n. 5, p. 501-511, 2018.

OECD. Test Guideline 404: Acute Dermal Irritation/ Corrosion in vivo Method. OEDC, Paris, 2004.

OSBORNE, L.C.; PEELER, J.T.; ARCHER, D.L. Reduction of human beta interferon by gallic acid. **Infect. Immun.**, Ohio, v. 33, n. 3, p. 769-774, 1981.

OSMANOV, A.; WISE, A.; DENNING, D. W. *In vitro* and *in vivo* efficacy of miramistin against drug-resistant fungi. **J. Medic. Microbiol.**, Manchester, v. 68, p. 1047-1052, 2019.

PACE, R.T.; BURG, K.J.L. Toxic effects of resazurin on cell cultures. **Cytotechnology**, Clemson, v. 67, p. 13-17, 2015.

PAMIES, D.; HARTUNG, T. 21st century cell culture for 21st century toxicology. **Chem Res Toxicol.**, Estados Unidos, v. 30, n. 1, p. 43-52, 2017.

PATEL, S. S.; GOYAL, R. K. Cardioprotective effects of gallic acid in diabetes-induced myocardial dysfunction in rats. **Pharmacognosy Res.**, Índia, v. 3, n. 4, p. 239-245, 2011.

PEDROSO, R. S. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti- *Candida spp.* activity of plant- derived products. **Plants**, Uberlândia, v. 8, art. n. 494, 2019.

PEI, R.; LIU, X.; BOLLING, B. Flavonoids and gut health. **Curr. Opin. Biotech.**, Madison, v. 61, p. 153-159, 2020.

PEREIRA, T. C. *et al.* Recent advances in the use of *Galleria mellonella* model to study immune responses against human pathogens. **J. Fungi**, São José dos Campos, v.4, n. 4, art. n. 128, 2018.

PETRUK, G. *et al.* Antioxidants from Plants Protect against Skin Photoaging. **Oxi. Med. Cell. Longev.**, Nápoles, v. 2018, 11 p., 2018.

PUBCHEM, 2020. CID 370 (Ácido Gálico). Disponível em: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid>. Acesso em: 24 jan. de 2020.

PUNITHAVATHI, V. R. *et al.* Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **Eur. J. Pharmacol.**, Tamil Nadu, v. 650, n. 1, p. 465-471, 2011.

QUAN, T. *et al.* Ultraviolet irradiation induces Smad7 via induction of transcription AP-1 in human skin fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, Michigan, v.280, n. 9, p. 8079-8085, 2005.

RAMARAO, N.; NIELSON-LEROUX. C.; LERECLUS, D. The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. **J. Vis. Exp.**, França, v. 70, art. n. 4393, 2012.

RAZMARAI, N. *et al.* Evaluation of cytotoxic effect and antioxidant activity of grape seed extract, crocin, and phenytoin. **Arch. Razi Inst.**, Iran, v. 72, n. 3, p. 181-187, 2017.

RISS, T. L. *et al.* Cell viability Assays. In: MARKOSSINAN, S. *et al.* **The assay Guidance Manual**. Eli Lilly & Company, Bethesda, 3^a ed., 2016.

ROTH, R. A.; JAESCHKE, H.; LUYENDYK, J. L. Toxic responses of the liver. In: KLAASSEN, C. D. **Casarett & Doull's Toxicology: the basic science of poisons**. Ohio: Ed. McGraw-Hill Education, 9^a ed., 2018. p. 719-766.

RUSSELL, W. M. S., BURCH, R. L. **The principles of experimental technique**. Londres: Methuen & Co. Ltd., Special ed., 1959. 238 p.

SAKAGUCHI, N. *et al.* Cell death-inducing activity by gallic acid derivatives. **Biol. Pharmac. Bullet.**, Japão, v. 22, n. 5, p. 471-475, 1999.

SÃO PAULO. **Lei nº 15.316, de 23 de janeiro de 2014**. Proíbe a utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes e dá outras providências. Disponível em: <<https://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2014/lei-15316-23.01.2014.html>>. Acesso em: 05 out. de 2020.

SCORZONI, L. *et al.* Comparison of virulence between *Pacacoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, Araraquara, v. 6, n. 8, p. 766-776, 2015.

SCOTTI, L; VELASCO, M. V. R. Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia: estudo das alterações da pele no decorrer do tempo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção. São Paulo: **Tecnopress**, 2003. 114 p.

SCULLY, L. R., BIDOCHLA, M. J. Serial passage of the opportunistic pathogen *Aspergillus flavus* through an insect host yields decreased saprobic capacity. **Can. J. Microbiol.**, Canadá, v. 51, n. 2, p. 185-189, 2005.

SEGERITZ, C. P.; VALLIER, L. Cell culture: growing cells as model systems in vitro. In: JALALI, M.; SALDANHA, F.; JALALI, M. **Basic Science Methods for Clinical Researchers**. Reino Unido: Ed. Academic Press, 2017. p. 151-172.

SHAI, A.; BARAN, R.; MAIBACH, H. I. Handbook of cosmetic skin care: 2^a ed. Londres: **Informa UK Ltd.**; 2009. 296 p.

SHEEHAN, G., KAVANAGH, K. Analysis of the early cellular and humoral responses of *Galleria mellonella* larvae to infection by *Candida albicans*. **Virulence**, Irlanda, v. 9, n. 1, p. 163-172, 2017.

SILVA, I. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic, apoptotic, mutagenic, and chemopreventive activities of semi-synthetic esters of gallic acid. **Food Chem. Toxicol.**, Araraquara, v. 105, p. 300-307, 2017.

SILVA, L. N. *et al.* Virulence of *Candida haemulonii* complex in *Galleria mellonella* and efficacy of classical antifungal drugs: a comparative study with other clinically relevant non-albicans *Candida* species. **FEMES Yeast Research**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 7, 2018.

SILVA, S. A. M. E. *et al.* Gallic acid- loaded gel formulation combats skin oxidative stress: development, characterization and *ex vivo* biological assays. **Polymers**, São Paulo, v. 9, n. 9, art. 391, 2017.

SILVA, S. A. M. E.; MICHNIAK-JOHN, B.; LEONARD, G. R. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. **An. Bras. Dermatol.**, São Paulo, v. 92, n. 3, p. 367-374, 2017.

SIMPSON, C. L.; PATEL, D. M.; GRREN, K. Y. Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, Chicago, v. 12, p. 565-580, 2011.

SINGKUM, P. *et al.* A powerful *in vivo* alternative model in scientific research: *Galleria mellonella*. **Acta Microbiol. Immunol. Hung.**, Bankok, v. 66, n. 1, p. 31-55, 2019.

SINGLETON, V. L.; KRATZER, F. H. Toxicity and related physiological activity of phenolic substances of plant origin. **Agric. Food Chem.**, Califórnia, v. 17, n. 3, p. 497-512, 1969.

SINGULANI, J. L. *et al.* Activity of gallic acid and its ester derivatives in *Caenorhabditis elegans* and zebrafish. **Future Med. Chem.**, Araraquara, v. 9, n. 16, p. 1863-1872, 2017.

SINGULANI, J.L. *et al.* Applications of invertebrate animal models to dimorphic fungal infections. **J. Fungi**, Araraquara, v. 4, v. 4, art. n. 118, 2018.

SMITH, T. L. External morphology of the larva, pupa and adult of the wax moth *Galleria mellonella*. **J. Kansas Entomol. Soc.**, Arkansas, v. 38, n. 3, p. 287-310, 1965.

SOLE-BOLDO, L. *et al.* Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. **Communic. Biol.**, Alemanha, v.3, art. n. 188, 2020.

ST ANGELO, A.J. Lipid oxidation on foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, New Orleans, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

ST ANGELO, A. J. *et al.* Lipid oxidation on foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, Los Angeles, v. 36, n. 3, p. 175-224. 1996.

STRAND, M. R. The insect cellular immune response. **Insect Sci.**, Georgia, v. 15, p. 1-14, 2008.

SU, T. R. *et al.* Inhibition of melanogenesis by gallic acid: possible involvement of the PI3K/Akt, MEK/ERK and Wnt/ β -catenin signaling pathways in B18F10 cells. **Int. J. Mol. Sci.**, Taiwan, v. 14, n. 10, p. 20443-20458, 2013.

TANAKA, M. *et al.* Gallic acid inhibits lipid accumulation via AMPK pathway and suppresses apoptosis and macrophage-mediated inflammation in hepatocytes. **Nutrients**, Japão, v. 12, art. n. 1479, 2020.

TANNENBAUM, J.; BENNETT, B. T. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose. **J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.**, Califónia, v. 54, n. 2, p. 120-132, 2015

THAMSERMSANG, O. *et al.* IL-1 β -induced modulation of gene expression profile in human dermal fibroblasts: the effects of Thai herbal Sahatsatara formula, piperine and gallic acid possessing antioxidant properties. **BMC Complement. Altern. Med.**, Bangkok, v. 17, art. n. 32, 2017.

The Scientist, 2016. Disponível em: < <https://www.the-scientist.com/the-nutshell/new-class-of-photoreceptor-discovered-in-c-elegans-32501> > Acesso em: 24 jan. de 2020.

TSANG, M. S. M. *et al.* Anti-inflammatory activities of Pentaherbs Formula, berberine, gallic acid and chlorogenic acid in atopic dermatitis-like skin inflammation. **Molecules**, Hong Kong, v.21, art. n. 519, 2016.

UCHMANOWICZ, I. Oxidative stress, frailty and cardiovascular diseases: current evidence. **Adv. Exp. Med. Biol.**, Polônia, v. 1216, p. 65-77, 2020.

VAN DEN HOF, W. F. P. M. *et al.* Classification of hepatotoxicants using HepG2 cells: a proof of principle study. **Chem. Res.Toxicol.**, Maastricht, v. 27, n. 3, p. 433–442, 2014.

VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J. C. M.; STRIK, J. J.T. W. A. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food Chem. Toxicol.**, Bilthoven, v. 24, n.10/11, p. 1067-1070,1986.

VARIYA, B. C. *et al.* Acute and 28-days repeated dose sub-acute toxicity study of gallic acid in albino mice. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, Gujarat, v. 101, p. 71-78, 2019.

VARMA, S. R. *et al.* Protective effects of on dermal fibroblasts and human

keratinocytes. **PloS One**, Bangalore, v. 11, n. 1, 20 p., 2016.

WALTERS, K. A.; ROBERTS, M. S. Dermatologic, Cosmeceutic and Cosmetic Development: **Therap. New Approaches**. 1ª Edição, 2007

WANG, A. S.; DREESEN, O. Biomarkers of cellular senescence and skin aging. **Front Genet.**, Singapura, v. 9, art n. 247, 2018.

WANG, Y. L. *et al.* Combined application of gallate ester and alpha-tocopherol in oil-in-water emulsion: their distribution and antioxidant efficiency. **J. Disper. Sci. Tech.**, China, v. 41, n. 6, p. 909-917, 2020.

WITKOWSKI, J. A.; PARISH, L.C. You've come a long way baby: a history of cosmetic lead toxicity. **Clin. Dermatol.**, Philadelphia, v. 19, p. 367-370, 2001.

WOJDA, I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **Insect Sci**, Lublin, v. 24, n. 3, p. 342-357, 2016.

XIU-QUIN, L. *et al.* Analysis of synthetic antioxidants and preservatives in edible vegetable oil by HPLC/TOF-MS. **Food Chem.**, Beijing, v. 113, p. 692–700, 2009

YANG, D. J. *et al.* Gallic acid promotes wound healing in normal and hyperglucidic conditions. **Molecules**, Wonju, v. 21, n. 7, art. n. 899, 2016.

YANG, X. *et al.* Developmental toxicity of synthetic phenolic antioxidants to the early life stage of zebrafish. **Sci. Total, Environ.**, Beijing, v. 643, p. 559-568, 2018.

YANG, X. *et al.* Synthetic phenolic antioxidants cause perturbation in steroidogenesis in vitro and invivo. **Environ. Sci. Technol.**, Beijing, v. 52, n. 2 p. 850-858, 2018.

ZANG, S.; DUAN, E. Fighting against skin aging. **Cell Transplantation**, Beijing, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2018.

ZEHIROGLU, C.; OZTURK SARIKAYA, S. B. The importance of antioxidants and place in today's scientific and technological studies. **J. Food Sci. Tech.**, Turquia, v. 56, p. 4747-4774, 2019.

ZI, Y. *et al.* Antioxidant action and protective and reparative effects of lentinan on oxidative damage in HaCaT cells. **J. Cosmetic Dermat.**, Beijing, v. 17, n. 6, p. 1108-1114, 2018.