



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara



Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo da eficácia *in vitro* e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética

Danieli Camilo Marcato

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara- SP

2019

Faculdade de Ciências Farmacêuticas Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo da eficácia *in vitro* e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética

Danieli Camilo Marcato

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara- SP

2019

M313e

Marcato, Danieli Camilo.

Estudo da eficácia *in vitro* e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética / Danieli Camilo Marcato. – Araraquara, 2019.

97 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. Ácido ferúlico. 2. Emulsão. 3. *Skin care*. 4. Cosméticos. 5. Antienvelhecimento. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da eficácia in vitro e citotoxicidade do ácido ferúlico e sua incorporação em emulsão cosmética

AUTORA: DANIELI CAMILO MARCATO

ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:



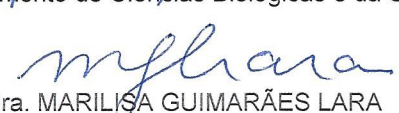
Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA

Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Profa. Dra. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO

Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara-UNIARA



Profa. Dra. MARILISA GUIMARÃES LARA

Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP - Ribeirão Preto

Araraquara, 07 de junho de 2019

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabalho a todas as pessoas que me incentivam a sempre
buscar conhecimento. “

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio ao presente trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pela oportunidade de me aceitar como aluna, incentivo, confiança e ensinamentos compartilhados.

Aos professores Prof.a Dra. Vera Lucia Borges Isaac, Prof.a Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof.a Dra. Herida Regina Nunes Salgado, Prof.a Dra. Regina Cicarelli e Prof. Dr. Édison Pecoraro que contribuíram para esta pesquisa.

À Dra. Caroline Magnani Spagnol pela ajuda fundamental e conhecimentos compartilhados na execução deste trabalho.

À Lígia Fernandes de Souza pela ajuda fundamental no trabalho com métodos cromatográficos.

À Alessandra Custódio, por estar presente desde a etapa de seleção.

À Amanda Manzini, aluna de iniciação científica, pela ajuda fundamental neste trabalho e por contribuir pelo meu crescimento pessoal e acadêmico.

Ao Wagner Soares Ramos, pelas ideias compartilhadas e pela troca de conhecimento que me ajudou muito na evolução deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, que sempre estavam dispostos a me ajudar, em especial: Fernanda Colombo, Gabriel, Mariane, Bia, Any e Lia.

À técnica de laboratório Ilza Yogui, pela ajuda e colaboração;

As minhas amigas do mestrado Elida, Laura, Gabriela Prado e Bruna Figueiredo pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

À Jéssica Tambor, pela parceria e amizade, desde as etapas de seleção.

A todos meus amigos, em especial: Janaína, Mari, Rafa e Thiago por sempre me ajudarem e estarem presentes nas etapas dessa pesquisa.

À minha prima Natalia Guerreiro, pela inspiração, ajuda e apoio ao longo do trabalho.

Aos meus irmãos Jéssica, Edú e Amanda pelo amor incondicional e pelo apoio.

Aos meus pais, Laís e Geraldo, por tudo que fizeram por mim até hoje. Vocês são fundamentais nas minhas conquistas.

EPÍGRAFE

“Eu fui ensinada que o caminho do progresso não é
rápido, nem fácil” – Marie Curie

RESUMO

O mercado brasileiro de cosméticos está entre os mais importantes do mundo. Neste mercado, os produtos antienvelhecimento apresentam forte tendência de crescimento e dentre esses produtos se destacam os antioxidantes, tais como os compostos fenólicos que estão amplamente distribuídos no reino vegetal e em micro-organismos. Os ácidos cinâmicos fazem parte desses compostos, sendo o ácido ferúlico um dos seus representantes. Segundo a literatura, este ácido apresenta potencial antioxidante e propriedades anticancerígenas, anti-inflamatórias e antimicrobianas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia *in vitro* e a citotoxicidade do AF para sua incorporação em uma emulsão cosmética. Foram realizados estudos da atividade antioxidante através de duas metodologias analíticas (DPPH e ABTS), da avaliação da atividade antimicrobiana, da atividade inibidora da tirosinase (despigmentante), além da avaliação do potencial citotóxico, utilizando duas linhagens de células (HaCat e HDFa), do desenvolvimento de emulsões, da validação de uma metodologia analítica para quantificação do ácido ferúlico por CLAE. Também foi realizado estudo de estabilidade acelerada e ensaios de liberação, permeação e retenção *in vitro*. O ácido ferúlico apresentou um $IC_{50} = 12,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o radical DPPH e de $2,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o radical ABTS. Já no ensaio despigmentante, o ácido ferúlico apresentou um $IC_{50} = 2,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Na avaliação da atividade antimicrobiana foram necessárias concentrações variando de $0,75$ a 2 mg.mL^{-1} , do ácido ferúlico para inibir o crescimento das bactérias testadas neste trabalho. Nos estudos de citotoxicidade, verificou-se que o ácido ferúlico não apresentou toxicidade significativa nas concentrações utilizadas para HDFa e para HaCat apresentou um $IC_{50} = 1092 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O método analítico desenvolvido foi validado assegurando todos os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez estabelecidos. A emulsão foi submetida a diversas condições de estresse e se manteve estável ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade acelerada. No estudo de permeação, grande parte do ativo permeado encontrou-se no estrato córneo e a concentração quantificada na derme e epiderme foi baixa, o que demonstra resultados favoráveis para um produto cosmético. Com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que o ácido ferúlico apresenta multifuncionalidade e grande potencial para o mercado de cosméticos *skin care*.

Palavras-chave: Ácido ferúlico; Emulsão; *Skin care*; Antienvelhecimento; Cosméticos.

ABSTRACT

The Brazilian cosmetic market is among the most important in the world. In this market, anti-aging products have strong growth trend and among these products stand antioxidants such as phenolic compounds that are widely distributed in the plant kingdom and micro-organisms. Cinnamic acids are part of these compounds, ferulic acid being one of their representatives. According to the literature, this acid has antioxidant potential and anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial properties. The objective of this work has been to evaluate the *in vitro* efficacy and the cytotoxicity of FA for its incorporation in a cosmetic emulsion. Studies of antioxidant activity through two analytical methodologies (DPPH and ABTS), tyrosinase inhibitory activity (depigmentation), antimicrobial activity, cytotoxic potential evaluation using two cell lines (Hacat and HDFa), validation of an analytical methodology for the quantification of ferulic acid by HPLC and release, permeation and retention *in vitro*. Ferulic acid showed an $IC_{50} = 12,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for DPPH radical and an $IC_{50} = 2,84 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for ABTS radical. In the evaluation of the antimicrobial activity, concentrations varying from 0,75 to 2,0 mg.mL^{-1} of the ferulic acid were required to inhibit the growth of the bacteria tested in this study. Already in the depigmenting assay, ferulic acid presented an $IC_{50} = 2,89 \mu\text{g.mL}^{-1}$. From the cytotoxicity studies, it has been verified that the ferulic acid is not cytotoxic in the concentrations used for HDFa and for HaCat it has an $IC_{50} = 1092 \mu\text{g.mL}^{-1}$. The analytical method developed was validated, assuring all the parameters of linearity, specificity, precision, accuracy and robustness have been established. The emulsion has been subjected to various stress conditions and remained stable throughout the 90 days of the accelerated stability study. In the permeation study, much of the active permeate has been found in the stratum corneum and the quantified concentration in the dermis and epidermis was low, which shows favorable results for a cosmetic product. With the results obtained in this work, it can be suggested that ferulic acid presents multifunctionality and great potential for the *skin care* cosmetics market.

Keywords: Ferulic acid; Emulsion; *Skin care*; Anti-aging; Cosmetics.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA: Ácido ascórbico;
- ABTS: Radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid;
- AF: Ácido ferúlico;
- AMH: Ágar Mueller-Hinton;
- APCI: Ionização química à pressão atmosférica;
- ATCC: *American Type Culture Collection*;
- BHT: 2,6-di-t-butil-4-metilfenol;
- CBM: Concentração bactericida mínima;
- CCH: Células de carcinoma hepatocelular;
- CIM: Concentração inibitória mínima;
- CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência;
- DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose*;
- DMSO: Dimetilsulfóxido;
- DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila;
- DPR: Desvio padrão relativo;
- EDTA: Ácido etilenodiaminotetraacético;
- EM: Espectrometria de massas;
- ESBL: β -lactamase de Espectro Estendido;
- FM: Fase móvel;
- GO: Glioxal;
- HaCat: *Human immortalized keratinocytes*;
- HDFa: *Human Dermal Fibroblasts adult*;
- Hep G2: *Liver Hepatocellular Carcinoma*;
- HPLC: High performance liquid chromatography;
- HPPC: Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos;
- IC: Inclinação da curva analítica;
- IC₅₀: Concentração capaz de provocar morte celular em 50%;
- INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*;
- LD: Limite de detecção;

LQ: Limite de quantificação;

MGO: Metilglioxal;

MTT: *(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)*;

PBS: *Phosphate Buffered Saline*;

PTFE: Politetrafluoretileno;

ROS: Espécies reativas de oxigênio;

Rt: Tempo de retenção;

TSB: Caldo soja tripcaseína;

UV: Ultravioleta;

VIS: Visível.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1. Características físico-químicas do AF	22
Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação do AF.	27
Quadro 1. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.....	31
Tabela 3. Composição percentual da emulsão proposta.....	40
Tabela 4. Solubilidade do AF em diferentes solventes a 25 °C.....	49
Tabela 5. Componentes das emulsões propostas e suas funções.....	62
Tabela 6. Valores das áreas referentes ao pico de AF para obtenção da curva analítica.	64
Tabela 7. Valores das áreas referentes ao pico de AF no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.....	68
Tabela 8. Teste F da precisão interanalista do método de CLAE.....	69
Tabela 9. Valores obtidos no teste de recuperação do AF na emulsão utilizando o método por CLAE.	69
Tabela 10. Dados obtidos para a análise de robustez do método analítico estabelecido.	70
Tabela 11. Informações para o cálculo dos limites de detecção e quantificação teóricos.	70
Tabela 12. Limite de quantificação calculado experimentalmente.	71
Tabela 13. Valores do coeficiente de correlação linear em cada modelo matemático. .	79
Tabela 14. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AF.	80
Tabela 15. Retenção da pele com a emulsão contendo AF.	81
Tabela 16. Resumo das atividades realizadas no trabalho.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos ácidos benzoicos. Ácido salicílico: $R^1=OH$; Ácido Gentísico: $R^1=R^4=OH$; Ácido p-hidroxibenzoico: $R^3=OH$; Ácido protocatequínico: $R^2=R^3=OH$; Ácido vanílico: $R^2=OCH_3$, $R^3=OH$; Ácido gálico: $R^2=R^3=R^4=OH$; Ácido siríngico: $R^2=R^4=OCH_3$, $R^3=OH$	20
Figura 2. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico: $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$; Ácido o-cumárico: $R^1 = OH$; Ácido m-cumárico: $R^2 = OH$; Ácido p-cumárico: $R^3 = OH$; Ácido Caféico: $R^2 = R^3 = OH$; Ácido Ferúlico: $R^2 = OCH_3$ e $R^3 = OH$; Ácido Sinápico: $R^2 = R^4 = OCH_3$ e $R^3 = OH$	21
Figura 3. Ácido ferúlico	21
Figura 4. Estrutura química do AF e sua estabilização por ressonância.	22
Figura 5. Esquema representativo da organização e distribuição dos controles e amostra do AF para microplaca na avaliação da atividade antimicrobiana.	35
Figura 6. Esquema representativo da organização e distribuição dos controles e amostras do AF na microplaca para avaliação do potencial citotóxico.....	38
Figura 7. Célula de Franz contendo amostra para realização do estudo de permeação.	47
Figura 8. Preparação para o estudo de tape stripping, na qual é possível notar em a) a pele com o molde de alumínio, em b) aplicação da emulsão sobre a pele e em c) o sistema pronto para incubação.....	48
Figura 9. Procedimento de tape stripping, no qual é possível notar em a) remoção da tampa de alumínio, b) a aplicação da fita e em c) a remoção da fita.	48
Figura 10. Microplaca do ensaio de inibição do radical DPPH com AF.	50
Figura 11. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição do radical DPPH em microplaca.	50
Figura 12. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição do radical DPPH em microplaca.	51
Figura 13. Tubos de ensaio do ensaio de inibição do radical ABTS com AF. Destaque para a amostra de menor concentração e para a amostra de maior concentração.....	52
Figura 14. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição do radical ABTS em tubos de ensaio.....	52
Figura 15. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição do radical ABTS em tubos de ensaio.....	53
Figura 16. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para <i>E. coli</i>	54

Figura 17. Esquema representativo da determinação da CBM para <i>E. coli</i> , no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.	54
Figura 18. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para <i>S. aureus</i>	55
Figura 19. Esquema representativo da determinação CBM para <i>S. aureus</i> , no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.	55
Figura 20. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para <i>P. aeruginosa</i>	56
Figura 21. Esquema representativo da determinação de CBM para <i>P. aeruginosa</i> , no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.	56
Figura 22. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para <i>S. epidermidis</i>	57
Figura 23. Esquema representativo da determinação de CBM para <i>S. epidermidis</i> , no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.	57
Figura 24. Representação esquemática das etapas da melanogênese.	58
Figura 25. Microplaca do ensaio de determinação da atividade inibidora de tirosinase com AF.	59
Figura 26. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição da tirosinase.	59
Figura 27. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição da tirosinase.	60
Figura 28. Curvas de viabilidade celular para linhagem HaCat após 24h de tratamento com AF.	61
Figura 29. Curvas de viabilidade celular para linhagem HDFa após 24h de tratamento com o AF.	61
Figura 30. a) Emulsão base e b) Emulsão contendo 1% do AF.	63
Figura 31. Curva analítica do AF obtida por CLAE.	64

Figura 32. Cromatograma obtido por CLAE para solução da emulsão base diluída na fase móvel utilizando coluna C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 μ m, Phenomenex), vazão 0,65 mL.min ⁻¹ e λ =320 nm.	65
Figura 33. - Cromatograma obtido por CLAE para solução de AF (50 μ g.mL ⁻¹) em fase móvel utilizando coluna C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 μ m, Phenomenex), vazão 0,65 mL/min e λ =320 nm.	65
Figura 34. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução da emulsão base, em a) HCl 0,001 M, b) NaOH 0,001 M, c) água Mili-Q e d) luz ultravioleta, a 80oC, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.	66
Figura 35. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AF (50 μ g.mL ⁻¹), em a) HCl 0,001 M, b) NaOH 0,001 M, c) água Mili-Q e d) luz ultravioleta, a 80°C, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.	66
Figura 36. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AF (50 μ g.mL ⁻¹), em H ₂ O ₂ 3%, a 80oC, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.	67
Figura 37. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução da emulsão base, em H ₂ O ₂ 3%, a 80°C, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.	67
Figura 38. Curva da analítica acrescida das concentrações próximas ao limite de quantificação.....	72
Figura 39. Avaliação microscópica das a) emulsão base e b) da emulsão contendo 1% do AF em tempo 0 dias.....	73
Figura 40. Avaliação microscópica da emulsão com luz polarizada com a) 10x de aumento.	73
Figura 41. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 15 dias de análise.	74
Figura 42. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 30 dias de análise.	74
Figura 43. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 60 dias de análise.	75
Figura 44. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 90 dias de análise.	75
Figura 45. Avaliação microscópica da emulsão no ciclo congelamento/descongelamento.	75

Figura 46. Gráfico dos valores de pH da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.	76
Figura 47. Gráfico dos valores de viscosidade da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.	77
Figura 48. Gráfico das concentrações experimentais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.	78
Figura 49. Perfil de liberação do AF de acordo com o Modelo de Higuchi.....	79
Figura 50. Perfil de permeação (média $\pm$ desvio padrão) do AF através da epiderme..	80
Figura 51. Concentração da retenção cutânea do AF no Estrato córneo e na Epiderme/derme.....	82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS.....	20
2.2 ÁCIDO FERÚLICO	21
2.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	22
2.2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	23
2.2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	26
2.2.4 CITOTOXICIDADE	28
3. OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	31
4.1.1 EQUIPAMENTOS.....	31
4.2 MÉTODOS	32
4.2.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO AF	32
4.2.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE	33
4.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	34
4.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE TIROSINASE.....	37
4.2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO.....	37
4.2.6 PREPARO DAS EMULSÕES	39
4.2.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR CLAE	40
4.2.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO CONTENDO AF	44
4.2.9. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA IN VITRO	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO AF	48
5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE.....	49
5.2.1 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH.....	49
5.2.2 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS	51
5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	53
5.3.1 <i>Escherichia coli</i>	53
5.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	54
5.3.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	56
5.3.4 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	57

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE TIROSINASE	58
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO	60
5.6 PREPARO DAS EMULSÕES	61
5.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUANTITATIVO	63
POR CLAE	63
5.7.1 LINEARIDADE	64
5.7.2 SELETIVIDADE	65
5.7.3 PRECISÃO	68
5.7.4 EXATIDÃO	69
5.7.5 ROBUSTEZ	70
5.7.6 LIMITE DE DETECÇÃO	70
5.7.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	71
5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO CONTENDO AF	72
5.8.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO	72
5.8.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA	72
5.8.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA	75
5.8.4 DETERMINAÇÃO DO pH	76
5.8.5 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE	76
5.8.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AF	77
5.9 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA <i>IN VITRO</i>	78
6. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86

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. No último ano, a Indústria Brasileira de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (HPPC) apontou um crescimento real de 2,75%. Esse crescimento se deve a vários fatores, dentre eles o aumento da expectativa de vida, que trouxeram a necessidade de manter uma aparência mais jovial (ABIHPEC, 2018).

Considerando o panorama atual, do ponto de vista da cosmetologia, vislumbram-se novas perspectivas de crescimento para o setor, como uma oportunidade de negócios às preparações que envolvam o cuidado da pele, conhecidos como preparações *skin care*. No Brasil, esta expectativa ganha contornos mais relevantes ao considerar que se trata de um setor com altíssimas perspectivas a ser desenvolvido. Dados recentes informam que o Brasil é o 2º maior mercado em proteção solar, desodorantes, produtos masculinos e perfumes; 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 depilatórios; e apenas o 8º mercado para os produtos para pele (ABIHPEC, 2018).

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

O mercado de *skin care*, por sua vez, é muito segmentado incluindo, dentre outros produtos, os cremes faciais com função antienvelhecimento, os cremes hidratantes faciais, as preparações destinadas à limpeza, as preparações auxiliares no tratamento da acne, os tonificantes, as preparações clareadoras da pele, as preparações para os cuidados dos lábios, as máscaras faciais, entre outros (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2013). Apesar desta segmentação, percebe-se que há, ainda, um espaço de crescimento neste específico segmento de mercado.

Este crescimento pode ser justificado se baseando nas seguintes características, atitudes e comportamentos: o clima tropical brasileiro faz com que as pessoas sintam a necessidade de hidratarem a pele do corpo e fundamentalmente a da face; há uma

frequente prescrição de produtos cosméticos por dermatologistas; os produtos para tratamento da pele estão atingindo cada vez mais as gerações dos anos 80, 90 e 2000; a conscientização dos danos causados pelo sol tem reforçado a necessidade de cuidados específicos; a longevidade com o caráter saudável tem incrementado o segmento das preparações antienvelhecimento; e, finalmente, pode-se afirmar, de acordo com as prospecções, que os produtos para tratamento facial devem manter crescimento estimado de 9,3% ao ano (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2013).

Outro aspecto que está em constante crescimento é o apelo “natural” em produtos cosméticos, ou seja, a busca por produtos com ingredientes de origem vegetal no segmento de produtos para HPPC aumenta ano a ano (ABIHPEC; SEBRAE, 2018).

Os conceitos de sustentabilidade e consciência, incluindo o consumo de produtos com composições mais naturais possíveis, têm se apresentado como uma forte tendência nos últimos anos. Estas tendências vêm influenciado o consumo consciente e vêm afetando sobremaneira o consumidor que, diante dos apelos do natural, saudável, nutritivo e sustentável tem permitido o crescimento de vendas neste setor. Estima-se que a demanda por este tipo de preparação e apelo possa atingir, nos próximos anos, 2% do mercado global de *personal care*. No Brasil, apesar das definições não serem muito claras em relação ao que seja um produto natural, existe clara percepção de mercado que o tema é bastante relevante a ponto de estar consolidado em fabricantes importantes deste setor (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2013; ABIHPEC; SEBRAE, 2018; BOTEAGA, 2018).

Outro conceito que vem ao encontro destas 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 produtos que ofereçam mais de um benefício é uma realidade para o setor cosmético em nível global. 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 apresentar estas multifunções (WIECHERS, 2003).

Neste contexto, o consumo de produtos cosméticos com base em ativos eficazes para a pele tem crescido amplamente nos últimos anos, levando a indústria cosmética a investir fortemente no desenvolvimento de produtos e técnicas de produção inovadoras.

Porém, mais do que isto, é necessário conhecer o comportamento dos materiais ativos quando incorporados aos sistemas de veiculação que, adicionalmente, devem apresentar um sensorial agradável para boa aceitação do usuário, eficácia pertinente e aceitável grau de segurança. Nesta perspectiva, o mercado de HPPC está se preparando para atender este público, que, em 2050, chegará a 65 milhões de pessoas no Brasil (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2013).

A pesquisa e o desenvolvimento de produtos antienvelhecimento são crescentes a cada ano. Isto se deve à imensa demanda que produtos desta categoria geram ao mercado que, conseqüentemente, requer inovação. Os ativos antienvelhecimento podem ser divididos em 5 grandes categorias: antioxidantes, renovadores celulares, ativos *pro-lifting*, ativos dermo-relax, neurocosméticos e fatores de crescimento (VANZIN; CAMARGO, 2011). Dentre estas categorias, destacam-se os antioxidantes, os quais são encarregados pela proteção frente à ação oxidativa produzida pelos radicais livres no organismo, os quais podem danificar as membranas das células e acelerar o processo de envelhecimento (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007; HALLIWELL et al., 1995; PÓVOA, 1995; YOUNGSON, ROBERT, 1995).

O antioxidante de origem vegetal utilizado com frequência no setor cosmético é o ácido ascórbico. Este ácido é solúvel em água e atua como um bom antioxidante devido ao seu potencial redox. Além do mais, este ativo apresenta outras propriedades como ação despigmentante e estimulante da síntese de colágeno. No entanto, seu uso é limitado devido à sua instabilidade química, pois em contato com a luz, sofre degradação (CHORILLI; LEONARDI; SALGADO, 2007; DUARTE-ALMEIDA; GENOVESE; LAJOLO, 2006; MAIA, 2002). Sendo assim, a busca por antioxidantes estáveis é muito importante.

Considerando o exposto e os aspectos comerciais atuais que envolvem a necessidade de maior conhecimento sobre os ativos antienvelhecimento e multifuncionais, o presente trabalho estudou o comportamento de um conhecido antioxidante de origem vegetal, o ácido ferúlico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

O grupo dos compostos fenólicos é constituído por algumas substâncias denominadas de ácidos fenólicos. Essas substâncias são caracterizadas por apresentarem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de metoxila e/ou hidroxila na molécula (SOARES, 2002). Segundo Simões e colaboradores (2010), os compostos fenólicos se encontram amplamente distribuídos no reino vegetal e nos microrganismos.

A ocorrência desses compostos no reino vegetal permite outra classificação, na qual são divididos em dois grupos: compostos fenólicos amplamente distribuídos e compostos fenólicos de distribuição restrita. O primeiro grupo abrange os derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides e derivados de polimerização (taninos e ligninas). O segundo grupo abrange as demais substâncias (SIMÕES et al., 2010).

Os ácidos fenólicos podem ser separados em grupos: ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos. Os ácidos benzoicos (Figura 1) possuem sete átomos de carbono e são os mais simples encontrados na natureza, tais como ácido salicílico, ácido gentísico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido protocatequínico; ácido vanílico, ácido gálico e ácido siríngico (SOARES, 2002).

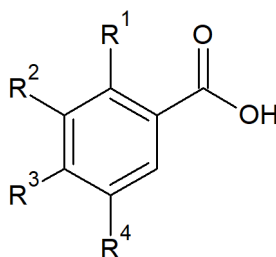


Figura 1. Estrutura química dos ácidos benzoicos. Ácido salicílico: $R^1=OH$; Ácido Gentísico: $R^1=R^4=OH$; Ácido p-hidroxibenzoico: $R^3=OH$; Ácido protocatequínico: $R^2=R^3=OH$; Ácido vanílico: $R^2=OCH_3$, $R^3=OH$; Ácido gálico: $R^2=R^3=R^4=OH$; Ácido siríngico: $R^2=R^4=OCH_3$, $R^3=OH$.

Fonte: SOARES, 2002.

Os ácidos cinâmicos (Figura 2) possuem nove átomos de carbono, sendo, os mais frequentemente encontrados no reino vegetal. Dentre eles os ácido o-cumárico, ácido m-cumárico, ácido p-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido sinápico (SOARES, 2002). Segundo Simões e colaboradores (2010), esses ácidos, devido à ligação dupla, podem existir sob duas fórmulas isoméricas, entretanto os mais vistos na natureza possuem conformação *trans*, devido à sua maior estabilidade.

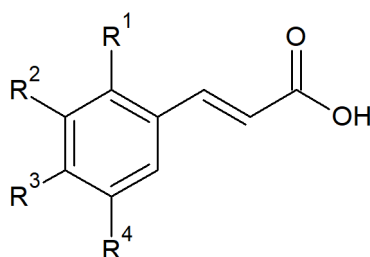


Figura 2. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico: $R^1 = R^2 = R^3 = R^4 = H$; Ácido o-cumárico: $R^1 = OH$; Ácido m-cumárico: $R^2 = OH$; Ácido p-cumárico: $R^3 = OH$; Ácido Caféico: $R^2 = R^3 = OH$; Ácido Ferúlico: $R^2 = OCH_3$ e $R^3 = OH$; Ácido Sinápico: $R^2 = R^4 = OCH_3$ e $R^3 = OH$.
Fonte: SOARES, 2002.

2.2 ÁCIDO FERÚLICO

Dentre os ácidos cinâmicos, destaca-se o ácido ferúlico (AF) (Figura 3) (BARBEROUSSE et al., 2008). O AF é o ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico e seus outros nomes incluem ácido 3-metil éter cafeico, ácido coniferico e ácido 3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-propenóico (GRAF, 1992).

O AF está presente em concentrações relativamente altas em várias plantas, ligado a polímeros das paredes celulares de *Poaceae* e plantas forrageiras, dentro de monocotiledôneas e dicotiledôneas (BARBEROUSSE et al., 2008; MATHEW; ABRAHAM, 2004). De acordo com Graf (1992), o AF foi isolado pela primeira vez em 1866, por Hlasiwetz e Barth e, em 1925, foi realizada sua primeira síntese.

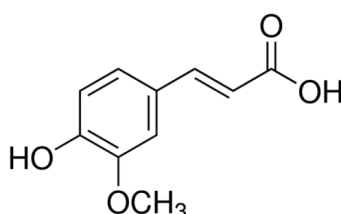


Figura 3. Ácido ferúlico
Fonte: Elaborado pela autora.

O AF apresenta propriedades antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana. Este ácido previne os efeitos prejudiciais da radiação tanto como um absorvedor de UV quanto captador de radicais livres em preparações cosméticas e biomédicas (CHOWDHURY et al., 2016; OUIMET et al., 2013). Segundo Hsieh; Yen; Chen (2005 apud BROINIZI et al., 2007, p. 906) o AF apresenta uma propriedade de sequestrar radicais livres em baixas concentrações. Porém, a eficácia do AF, segundo Ouimet e colaboradores (2013), é reduzida por um mecanismo de descarboxilação, o

qual promove a decomposição por temperatura, pelo ar e por luz induzida. As características físico-químicas do AF são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas do AF

Nome genérico	Ácido Ferúlico (CAS 1135-24-6)
Nome IUPAC	4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid
Fórmula química	C ₁₀ H ₁₀ O ₄
Composição percentual	C 61.85%, H 5.19%, O 32.96%
Massa molecular	194.19 g/mol
Densidade	1,14 g/cm ³
Ponto de fusão	169–173 ° C
Pka	4,56
log P	1.64 ± 0.36
Categoria	Antioxidante.

Fonte: ACD/ChemSketch; PubChem; MOTA, 2008.

2.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Muitos compostos fenólicos possuem atividade antioxidante e desta forma, inibem ou reduzem os efeitos de radicais livres e compostos oxidantes. Isto é um efeito da habilidade que um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila (OH) presente em sua estrutura aromática tem em ser cedido a um radical livre, tal como sua capacidade de suportar um elétron desemparelhado, equilibrando-o na densidade eletrônica da molécula (GIADA; MANCINI, 2006; MAGNANI et al., 2014; SOARES et al., 2005).

O potencial antioxidante do AF geralmente pode ser atribuído às suas características estruturais, como mostrado na Figura 4. Sua atividade antioxidante é explicada pela formação de um radical fenoxi estabilizado por ressonância, devido ao seu núcleo fenólico e a uma cadeia lateral insaturada. A estabilização da ressonância é responsável pelo efetivo potencial antioxidante do AF (CHOWDHURY et al., 2016; SRINIVASAN et al., 2007; SARI, 2018).

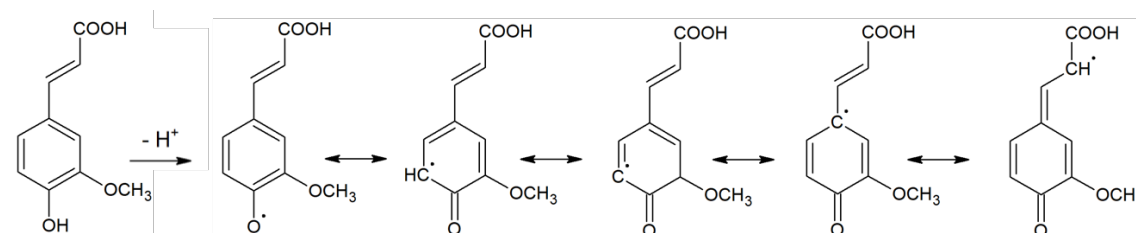


Figura 4. Estrutura química do AF e sua estabilização por ressonância.

Fonte: Srinivasan et al., 2007.

A estabilidade do radical fenoxi e o aumento da eficiência antioxidante do AF são resultado de um grupo OH na posição orto em relação grupo metoxi (doador de elétrons) (CUVELIER et al., 1992; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

O AF tem a capacidade de absorver radiação UV devido ao alto grau de insaturação conjugada. A absorção de radiação envolve a formação de um radical fenoxi, levando à isomerização *cis-trans*. Em altas concentrações, o AF também pode proteger outros compostos sensíveis à luz contra o dano oxidativo, pois diminui a quantidade de radiação UV que incide sobre as moléculas dissolvidas (CHOWDHURY et al., 2016).

De acordo com Brand-Williams e colaboradores (1995), o AF tem uma maior portencial de redução da molécula do radical DPPH em comparação com outros compostos fenólicos, como o ácido cumárico, a vanilina e o ácido vanílico (BOURNE et al., 1997; CASTELLUCCIO et al., 1997).

Estudos comparativos entre o AF e seus derivados, comprovaram que o AF possui maior potencial antioxidante do que seus derivados (KIKUZAKI et al., 2002; NAZARÉ et al., 2014).

Em um estudo qualitativo comparativo do comportamento cinético da inibição da oxidação entre os ácidos benzóico e cinâmico, observou-se que o AF aumentou o intervalo de indução da oxidação duas vezes mais em relação ao controle (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1992; RAMALHO; JORGE, 2006). Isso também foi verificado em outros estudos cinéticos, utilizando triacilgliceróis e ésteres metílicos de óleo de girassol, em que os ácidos fenólicos atuaram mais efetivamente na fase de iniciação da oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006; YANISHLIEVA; MARINOVA, 1995).

O AF pode ser um ativo em protetores solares e loções para a pele indicados para fotoproteção, com base em sua propriedade antioxidante. O seu elevado potencial antioxidante e sua capacidade de absorver radiação UV pode proporcionar fotoproteção aos materiais biológicos sensíveis aos raios UV (EGAWA et al., 1990; GRAF, 1992).

2.2.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O AF também é um componente do própolis. Através da determinação da composição deste, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi possível

identificar alguns marcadores como a vanilina, o ácido cumárico e o AF. A atividade antimicrobiana do extrato de própolis foi avaliada em estudos experimentais *in vitro*, e as concentrações mínimas de compostos fenólicos que inibiram os microrganismos foram determinadas. Os resultados demonstraram que os compostos fenólicos presentes no extrato de própolis apresentam atividade antimicrobiana efetiva (RAMANAUSKIENĖ; INKĖNIENĖ, 2011).

Extratos metanólicos de *Ligusticum mutellina* foram obtidos e analisados por CLAE. O ácido clorogênico foi o ácido fenólico predominantemente encontrado. Adicionalmente, foram identificados os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, cafeico e p-cumárico e o AF. Os extratos apresentaram alta atividade antioxidante e atividade antibacteriana e antifúngica moderada (CIM = 1,25-2,5 mg.mL⁻¹). *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp.* foram os mais sensíveis aos extratos (SIENIAWSKA et al., 2013).

A atividade do AF em concentração de 1000 µg.mL⁻¹ foi avaliada em termos de prevenção e controle de biofilmes formados por *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, foram testados os efeitos do AF em termos de suscetibilidade de células planctônicas e na adesão e motilidade bacteriana. A concentração bactericida mínima para *P. aeruginosa* foi de 500 µg.mL⁻¹, enquanto que para *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. aureus* foi de 2500 µg.mL⁻¹, 5000 µg.mL⁻¹ e 5000 µg.mL⁻¹, respectivamente. O AF foi capaz de causar inibição total da motilidade de *L. monocytogenes* e *E. coli*. A propagação de colônias de *S. aureus* foi completamente inibida pelo AF. Além disso, o AF promoveu reduções na atividade do biofilme maiores que 70% para todos os biofilmes testados (BORGES et al., 2012).

Borges e colaboradores (2013) demonstraram que o AF apresentou atividade contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *P. aeruginosa*, com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 100 e 1250 µg.mL⁻¹. Os autores também verificaram que o AF alterou irreversivelmente a carga, a permeabilidade e as propriedades físico-químicas das membranas bacterianas, incluindo para a formação de poros e rupturas.

Em outro estudo derivados do AF foram sintetizados e os compostos produzidos foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana contra diferentes cepas bacterianas e fúngicas gram-negativas e gram-positivas. Os resultados do experimento

antimicrobiano indicaram que todos os compostos produzidos apresentaram atividade antimicrobiana, com intensidade variável (KHATKAR, 2015).

Em outro estudo, os efeitos do AF foram testados em *Cronobacter sakazakii*, um patógeno oportunista transmitido via alimentos e que afeta principalmente recém-nascidos, lactentes e adultos imunocomprometidos. As concentrações inibitórias mínimas de AF contra as cepas de *C. sakazakii* variaram de 2,5 a 5,0 mg.mL⁻¹ (SHI et al., 2016).

A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos extraídos de três frutas tropicais foi testada contra 12 patógenos comuns em ambientes clínicos, incluindo oito cepas padrão (*Bacillus cereus*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Monilia albican*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* e *P. aeruginosa*) e 4 estirpes resistentes a múltiplos fármacos (*S. aureus* resistente à metilicina, *P. aeruginosa* resistente a carbapenem, *E. coli* produtora de β -lactamase (ESBL) de largo espectro e *Acinetobacter baumannii* resistente a fármacos). Os resultados foram promissores, uma vez que o extrato das três frutas tropicais ricas em compostos fenólicos apresentou alta atividade contra as bactérias testadas no experimento (FU et al., 2016).

Cota-Arriola e colaboradores (2017) prepararam matrizes de quitosana com AF e analisaram a relação entre a adição de AF no crescimento de *Aspergillus parasiticus*, uma espécie fúngica presente em cereais e altamente toxigênica para humanos e animais. Os resultados demonstraram que a incorporação de AF nas microcápsulas de quitosana aumentou significativamente sua atividade fungistática no crescimento, germinação de esporos e morfologia de *A. parasiticus*.

Considerando as informações descritas na literatura, observa-se que o AF apresenta potencial para aplicação como um composto antimicrobiano contra microrganismos diversos.

2.2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

A Tabela 2 apresenta uma revisão de literatura sobre os métodos analíticos utilizados para quantificar o AF. De acordo com a tabela, é possível notar que a Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é o método analítico comumente utilizado para analisar o AF. No entanto, sua aplicação técnica apresenta algumas desvantagens. Envolve o uso de colunas analíticas e equipamentos caros, precisa de um grande volume de solventes na fase móvel e está associado a um alto custo de manutenção (MARCO et al., 2017). Entretanto é uma técnica de separação muito utilizada (TÓTOLI; SALGADO, 2018).

Além disso, observando os solventes utilizados e listados na Tabela 2, é possível observar alguns solventes tóxicos como metanol, ácido trifluoroacético e acetonitrila, que acaba sendo prejudicial ao meio ambiente. A utilização de solventes considerados verdes são opções melhores, pois são menos prejudiciais ao meio ambiente, apresentam menor risco à saúde do operador e, muitas vezes, estão associados a baixos custos (GAŁUSZKA et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2017).

Como pode ser observado na Tabela 2, diferentes vazões, comprimentos de onda e colunas foram usados para análise de AF. Ajustes de pH para a fase móvel foram realizados utilizando diferentes solventes como hidróxido de sódio e ácido acético glacial.

Tabela 2. Métodos analíticos descritos na literatura para a determinação do AF.

Método	Condições	Sistema de Detecção	Referência
CLAE	Coluna C18 (10 mm × 240 mm × 5 µM). Fase móvel: ácido acético a 0,01% contendo 28% de metanol. pH 3,0. Vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ .	UV (310 nm)	KROON et al. (1997)
	Coluna C18 (15 cm × 4.6 mm × 5 µm). Fase móvel: citrato de sódio 0,01 M contendo 13% de metanol. pH 5,4. Vazão: 1,0 mL.min ⁻¹ . Rt: 10,0 min.	UV (280 nm)	ZUPFER et al. (1998).
	Coluna ODS- Hypersil (10 mm × 4.6 mm × 5 µm). Fase móvel: uma mistura de 12% de metanol e um tampão de citrato de sódio. pH ajustado a 2,6 com solução de hidróxido de sódio. Vazão: 1.0 mL.min ⁻¹ .	UV/Vis (320 e 418 nm)	PUSSAYANAWIN et al. (1988).
	Coluna C8 (4,6 × 250 mm). Fase móvel: ácido trifluoroacético a 0,1% e acetonitrila aquoso a 80% suplementada com ácido trifluoroacético. Vazão: 1.0 mL.min ⁻¹ .	UV (254 nm)	MUHEIM; LERCH (1999)
	Coluna Develosil ODS-HG-5 (RP-18, 250 × 20 mm). Fase móvel: metanol contendo 1 mM de ácido trifluoroacético (TFA). Vazão: 7.0 mL.min ⁻¹ . Rt: 64 min.	UV (320 nm)	ANDREASEN et al. (2000)
	Coluna C18 Hypersil (200 × 4.6 mm × 5 µm). Fase móvel: uma mistura de acetonitrila-água (16:84 v/v) contendo 1% de ácido acético glacial. Vazão: 0.8 mL.min ⁻¹ .	UV (320 nm)	LI; BI (2003).
	Coluna HC-C18 (150 mm × 4.6 mm × 5 µm) com coluna guarda C18. Fase móvel: uma mistura de metanol-água contendo 0,5% (v / v) de ácido acético glacial. Vazão: 0.8 mL.min ⁻¹ . Rt: 8 min.	UV (281 nm)	LI et al. (2007)
	Coluna C18 BDS-Hypersil (250 mm × 4.6 mm × 6 µm). Fase móvel: 80% (v/v) de acetonitrila/água. Vazão: 1.0 mL.min ⁻¹ . Rt: 3.37 min.	UV (323 nm)	FLORES et al. (2016)
CLAE-CV	Coluna C18 Kinetex TM (100 mm × 4.6 mm × 2.6 µm) com coluna guarda C18 (4.0 mm × 3.0 mm). Fase móvel: 0,06% de ácido acético e acetonitrila. pH ajustado para 6,0 com hidróxido de sódio ou ácido glacial acético. Vazão: 1.0 mL.min ⁻¹ .	CV (-1.0 V to 1.2 V)	NATALEA et al. (2015)
CL-EM-EM	Coluna C18 (250 mm × 4.6 mm × 5 µm) com coluna guarda C18 (5 µm, 7.5 mm × 4.6 mm) Fase móvel: ácido acético a 1,0% em água e acetonitrila. Vazão: 1.0 mL.min ⁻¹ .	UV/DAD (320 nm) APCI-EM (íon positive e negative)	LU et al. (2005).
UPLC	Coluna C18 (100 mm × 2.1 mm × 1.7 µm). Fase móvel: Uma mistura de 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila. Vazão: 0.4 mL.min ⁻¹ .	EM quadrupolo triplo com ESI	HUANG (2014)

Fonte: Elaborado pela autora.

2.2.4 CITOTOXICIDADE

Além dos benefícios oferecidos pelo AF, também é importante conhecer a citotoxicidade do composto. Muitos autores têm investigado os efeitos do AF em células humanas. Ogiwara e colaboradores (2002) estudaram a atividade citotóxica do eugenol e do AF contra células macrófagos de camundongo e verificaram que a citotoxicidade do AF era aproximadamente 10 vezes menor que a do eugenol. O número de mols de radicais peróxidos aprisionados por mols de AF e eugenol foi investigado, usando os métodos do período de indução do sistema de polimerização com metacrilato de metila. O AF apresentou um número maior de mols de radicais peróxidos aprisionados do que o eugenol, semelhante ao 2,6-di-t-butil-4-metilfenol (BHT). Estes resultados sugerem que o AF pode ser útil para prevenir o dano celular causado pela molécula de oxigênio (O_2).

Peng e colaboradores (2013) estudaram a citotoxicidade do AF (2 mM) contra uma linhagem de células de câncer de bexiga (células T24), cultivadas em sistemas 2D e 3D. Sua toxicidade no sistema 3D foi muito maior do que na cultura 2D. Os resultados permitiram aos pesquisadores incentivar o uso do AF como auxiliar no tratamento desse tipo de câncer.

Nanofibras contendo AF mostraram citotoxicidade contra células de carcinoma hepatocelular (CCH) (células HepG2) no ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). O CCH é reconhecido mundialmente como um dos principais tipos de câncer. No entanto, a resistência inerente das células cancerígenas aos tratamentos quimioterapêuticos e ao aumento do nível de proteína multirresistente a drogas são alguns dos principais obstáculos no tratamento do CCH. O AF é um dos fenólicos fitoquímicos conhecido com atividade anticancerígena contra câncer de mama, câncer de cólon, câncer de pele e câncer pulmonar. Os dados revelaram que as nanofibras poliméricas sem AF não inibiram o crescimento celular. Por outro lado, taxas de inibição do crescimento celular de 51,9% e 71,3% ($p < 0,01$) foram registradas para nanofibras encapsuladas com o AF e o AF isolado, respectivamente (VASHISTH et al., 2015).

Um grupo de pesquisadores investigou os efeitos protetores do AF e polifenóis relacionados contra a citotoxicidade causada pelo glioxal (GO) ou metilglioxal (MGO) em hepatócitos isolados de ratos. GO e MGO são substâncias que produzem espécies reativas de oxigênio e carbonila no corpo humano, levando ao estresse oxidativo e

danos aos ácidos nucléicos e proteínas. Seus efeitos podem contribuir para complicações associadas ao diabetes mellitus, doença cardiovascular e doenças de Alzheimer e Parkinson. Descobriu-se que os polifenóis testados diminuíram, significativamente, a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a citotoxicidade induzida por GO ou MGO nesses modelos (MARUF et al., 2015).

Estudo realizados por Choi e colaboradores (2018) mostraram que o AF ($\sim 300 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não causou nenhuma toxicidade significativa nas plaquetas, leucócitos e eritrócitos. A citotoxicidade *in vitro* foi também estudada utilizando a linha celular CCK-8 e confirmou-se que o AF era não citotóxico nas condições testadas (NILE et al., 2016).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo avaliar a eficácia *in vitro* e a citotoxicidade do AF para sua incorporação em uma emulsão cosmética.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a solubilidade do AF em vários solventes;
- Avaliar a atividade antioxidante do AF *in vitro*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do AF *in vitro*;
- Avaliar atividade inibidora da tirosinase pelo AF *in vitro*;
- Avaliar o potencial citotóxico do AF *in vitro*;
- Desenvolvimento de uma emulsão contendo AF e de uma emulsão base;
- Validar metodologia para a caracterização do AF com cromatografia líquida de alta eficiência;
- Avaliar a estabilidade acelerada de uma emulsão contendo AF;
- Obter o perfil de liberação, permeação e retenção *in vitro* do ácido ferúlico a partir da emulsão.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Ácido acético (J.T. Baker[®]), ácido ascórbico (Sigma-Aldrich[®]), ácido ferúlico (Attivos Magistrais), água destilada, água ultrapura obtida por sistema Milli-Q[®], álcool isopropílico (Merck[®]), antibióticos (penicilina 100 U.mL⁻¹; estreptomicina 0,1 mg mL⁻¹) (Sigma-Aldrich[®]), azetreonam, caldo soja tripcaseína (TSB), cefazolina, *cetearyl alcohol* (and) *sodium cetearyl sulfate* (Lanette N[®]), coluna cromatográfica C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 µm, Phenomenex[®]), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich[®]), *disodium* EDTA, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (DMEM, Cultilab[®]), etanol anidro 99,8% (Synth e Neon), etanol grau HPLC (panreac[®] e JT Baker[®]), filtro de PTFE 0,45 µm, *human immortalized keratinocytes* – HaCat, *human Dermal Fibroblasts*, adult – HDFa, cepa *E. coli* ATCC 10536, cepa *S. aureus* ATCC 6538, cepa *S. epidermidis* ATCC 1222, cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853, ethylhexyl stearate, fita adesiva (Scotch - 3M), garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm² (TPP e Kasvi), glyceryl stearate, L-dopa (Sigma-Aldrich[®]), meio de cultura DMEM (Cultilab), metanol (Synth[®] e panreac[®]), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich[®]), persulfato de potássio, *phenoxyethanol*, *phosphate buffer saline* (PBS), placa de agar Müeller-Hinton (AMH), placas estéreis de 96 orifícios para cultura celular (Falcom[®]), *propylene glycol*, resazurina, radical *1,1-difenil-2-picrilhidrazila* (DPPH) (Sigma-Aldrich[®]), radical *2,2'azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid* (ABTS) (Sigma-Aldrich[®]), solução de ácido clorídrico 0,001 M, solução de hidróxido de sódio 0,001 M, solução de peróxido de hidrogênio 3%, soro fetal bovino (Cultilab[®]), tampão fosfato pH 7,4, tampão fosfato pH 6,8, tirosinase, tripsina (Sigma-Aldrich[®]), tubos de 15 mL estéreis (Falcom[®]), tubos de ensaio de vidro.

4.1.1 EQUIPAMENTOS

Agitador de tubos (Phoenix AP56), agitador magnético (Marconi MA 085 L), Autoclave vertical (Phoenix[®]), balança analítica (Owa labor[®]), balança analítica (Shimadzu AY220), balança semi-analítica (Gehaka BG2000), câmara de Newbauer (BOECO Germany), centrífuga (BOECO Germany U-32R), centrífuga (Centribio), Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca AGILENT, modelo 1100 Series com detector UV-Vis e injetor automático (Agilent Technologies[®]), espectrofotômetro

(BMG LABTECH – Spectrostar Nano), estufa de circulação de ar (Fanem 315 SE), estufa de cultivo CO₂ (Shel Lab), Fluxo laminar (VECO®), freezer -80°C (SANYO MDF-U56VC), microscópio Carl Zeiss Microimaging GmbH, Microscópio invertido OLYMPUS CK2, microscópio com luz polarizada Leica DM 2500M, Microscópio óptico (LABOMED Lx 400), pHmetro Gehaka PG1800, Pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), refrigerador Consul (Facilite Frost Free), refrigerador Electrolux (Air Flow System DC 46), ultrassom (Unique Ultrasonic Clear), viscosímetro Brookfield RV-DVIII com sistema Helipath.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO AF

O ensaio da determinação da solubilidade do AF foi realizado segundo a Farmacopéia Brasileira (2010). Neste ensaio optou-se por utilizar os seguintes solventes: água purificada, etanol, metanol, solução de etanol: água (40:60) e dimetilsulfóxido (DMSO). Com exceção da água, todos os solventes utilizados eram grau PA. As análises foram efetuadas em tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, utilizando micropipetas e agitador Phoenix modelo AT:56.

Em cada tubo de ensaio, foram adicionados 10 mg de AF. Posteriormente foram incorporadas alíquotas crescentes de solvente a estes tubos, sob agitação para averiguar dissolução do produto. Este ensaio foi realizado a 25°C. O Quadro 1 apresenta os significados dos termos descritos. “A expressão partes indica a dissolução de 1 g de um sólido no número de mililitros do solvente estabelecido no número de partes.” (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010, p. 25)

Quadro 1. Termos descritivos de solubilidade e seus significados.

Termo descritivo	Volumes aproximados de solvente
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10 000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10 000 partes

Fonte: Farmacopéia Brasileira, 2010, p.25

4.2.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

4.2.2.1 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

Uma das formas de avaliar o potencial antioxidante é através da inibição do radical DPPH (2-difenil-1-picril-hidrazil). A metodologia utilizada foi demonstrada por Mensor (2001), Chiari (2012) e colaboradores, com adaptações para realização em microplaca e com a utilização de solventes verdes.

Em placas de 96 orifícios foram adicionados 85 µL da solução de AF em diferentes concentrações (0 a 14,16 µg.mL⁻¹) e 215 µL de solução etanólica de DPPH a 0,004%. Após 30 minutos, os valores de absorbância foram analisados em leitor de placas no comprimento de onda de 515 nm.

O padrão comparativo utilizado foi o ácido ascórbico (AA), em diferentes concentrações (0 a 6,99 µg.mL⁻¹), e o procedimento foi realizado da mesma forma que para o AF.

Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH, através da Equação 1 (MOLYNEUX, 2004):

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{max}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Na qual,

% Inibição = porcentagem de inibição do radical DPPH;

A_{amostra} = absorbância do radical DPPH na presença de amostra em 515 nm;

A_{controle} = absorbância do radical DPPH na ausência de amostra em 515 nm.

Os valores de porcentagem de inibição possibilitaram a obtenção da curva analítica e, através desta, foi calculada a quantidade de substância necessária para inibir 50% do radical DPPH (IC₅₀).

4.2.2.2 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS

Para a avaliação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) foi utilizado o método proposto por Almeida e colaboradores (2013).

Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de 7 mM de ABTS (0,384 mg diluídos em 10 mL de água) e uma solução estoque de 140 mM de persulfato de potássio (378,4 mg em 10 mL de água).

Para o preparo 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. Passado este tempo, diluiu-se uma alíquota desta mistura em etanol, afim de obter absorbância de aproximadamente $0,7 \pm 0,05$.

Em seguida, transferiu-se 3 mL dessa solução a 11 tubos de ensaio. Nos mesmos tubos, foi acrescentada a solução estoque de AF em concentrações crescentes (0 a 4,95 µg.mL⁻¹).

O padrão comparativo utilizado foi o AA, em diferentes concentrações, e o procedimento foi realizado da mesma forma que para o AF.

Posteriormente, foram determinadas as absorbâncias a 734 nm e, com estas medidas, foi calculada a porcentagem de inibição do radical livre através da equação 2 (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{max}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Na qual,

%Inibição = porcentagem de inibição do radical ABTS;

A_{amostra} = absorbância do radical ABTS na presença de amostra em 734 nm;

A_{max} = absorbância do radical ABTS na ausência de amostra em 734 nm.

Os valores de porcentagem de inibição possibilitaram a obtenção da curva analítica e, através desta, foi calculada a quantidade de substância necessária para inibir 50% do radical ABTS (IC₅₀).

4.2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.2.3.1 PADRONIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

As cepas padrão utilizadas foram: *E. coli*, ATCC 10536; *S. aureus*, ATCC 6538; *S. epidermidis*, ATCC 1222 e *P. aeruginosa*, ATCC 27853.

Nesta metodologia, a partir de uma cultura de 24 horas em caldo soja triplicaseína (TSB), as suspensões foram padronizadas, com a adição de caldo TSB até atingir turvação igual à 25% de transmitância averiguada por leitura espectrofotométrica a 580

nm para confirmação da concentração de microrganismos (aproximadamente $1,0 \cdot 10^8$ UFC/mL). Em seguida, foi efetuada uma diluição 1:100 em TSB e obteve uma suspensão de $1,0 \cdot 10^6$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos experimentos (CLSI, 2006a).

4.2.3.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

4.2.3.2.1 REALIZAÇÃO DO TESTE

A determinação da Concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias aeróbicas foi realizada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) segundo a metodologia da norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) e seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006a).

Os orifícios das microplacas (96 orifícios) foram preenchidos com 100 μ L de água destilada estéril. Posteriormente foram acrescentados 100 μ L de caldo TSB às linhas A (Controle do meio) e B (Controle negativo), 100 μ L da solução de etanol: água na proporção 70:30 à linha C (Controle do solvente), 100 μ L da solução de antibiótico à linha D (Controle positivo) e 100 μ L das soluções de AF às linhas E, F, G, H (Amostra), nas quais foi realizada a diluição seriada partindo de 12 ou 24 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Em seguida, foram distribuídos 100 μ L das suspensões dos microrganismos em cada orifício das microplacas, com exceção da linha A (Figura 5).

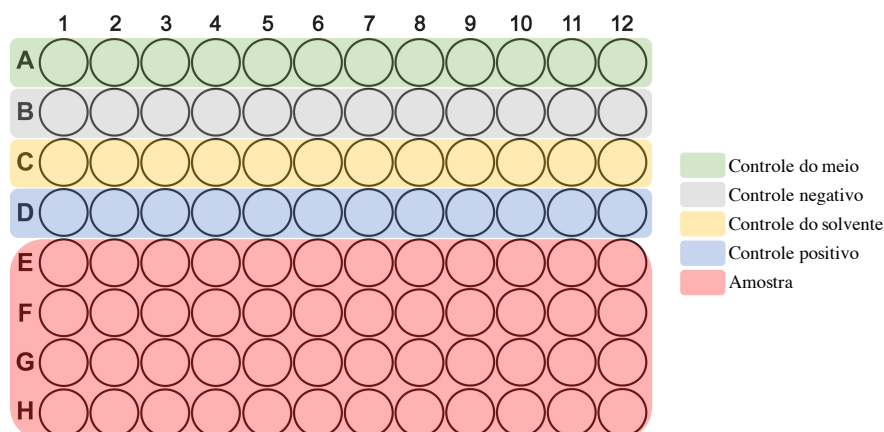


Figura 5. Esquema representativo da organização e distribuição dos controles e amostra do AF para microplaca na avaliação da atividade antimicrobiana.

Fonte: Elaborado pela autora.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em duplicata.

4.2.3.2.2 LEITURA ESPECTROFOTOMÉTRICA

Posteriormente à incubação, as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 530 nm, em espectrofotômetro com leitor de microplacas BMG LABTECH-Spectrostar Nano.

A ausência de turvação no meio evidencia a inibição do crescimento microbiano, na qual a CIM foi a menor concentração de AF capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HAWSER, 1999; HÖRNER et al., 2008).

A determinação da viabilidade microbiana para cada microrganismo foi realizada a partir da leitura espectrofotométrica. Essa foi calculada através da porcentagem de inibição do crescimento microbiano, em diferentes concentrações das substâncias, para cada microrganismo de acordo com a Equação 3:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_{amostra}}{A_{max}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Na qual,

%Inibição = porcentagem do crescimento microbiano;

$A_{amostra}$ = média das absorbâncias por concentração de substância testada subtraída do valor da absorbância obtida para cada concentração de substância sem a adição do inóculo;

A_{max} = a média das absorbâncias do controle de crescimento microbiano (sem a substância testada) (GUDIÑA et al., 2010).

O resultado final representa a porcentagem de células microbianas que a substância testada foi capaz de inibir.

4.2.3.3 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

Em placa de agar Müller-Hinton (AMH), com auxílio de hastes de madeira estéreis, a mistura de cada orifício da microplaca foi replicada. Em seguida, as placas foram incubadas a 37° C, por 24 horas. Após incubação as placas foram analisadas avaliando-se o crescimento ou não das bactérias estabelecidas.

As determinações da Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram efetuadas após leitura espectrofotométrica.

4.2.3.4. LEITURA COM REVELADOR

Foram realizadas leituras com o revelador resazurina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Em cada orifício das microplacas, foi adicionado $30 \mu\text{L}$ deste revelador. Em seguida, ao longo de 2 horas, a formação da coloração azul indicou a ausência de crescimento e a formação de coloração rosa indicou presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

4.2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE TIROSINASE

Foi utilizada a metodologia segundo Khazaeli e colaboradores (2009), na qual em microplacas de 96 orifícios foram adicionados $80 \mu\text{L}$ da solução de AF em diferentes concentrações (0 a $22,2 \text{ mg.mL}^{-1}$), $45 \mu\text{L}$ de solução de L-dopa ($4,5 \text{ mM}$) e $25 \mu\text{L}$ de solução de tirosinase ($80 \text{ unidades.mL}^{-1}$). O solvente utilizado em todas as soluções foi o tampão fosfato pH 6,8. Os valores de absorbância foram determinados após 10 minutos, em leitor de placas, utilizando comprimento de onda de 490 nm (KHAZAEI et al., 2009).

O padrão comparativo utilizado foi o AA, em diferentes concentrações (0 a $0,53 \text{ mg.mL}^{-1}$) e o procedimento foi realizado da mesma forma que para o AF.

A partir das absorbâncias, foi calculada a porcentagem de inibição da atividade da tirosinase utilizando a Equação 4:

$$\% \text{ Inibição} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Na qual,

%Inibição = porcentagem de inibição da atividade da tirosinase;

A_{amostra} = absorbância na presença de amostra em 490 nm ;

A_{controle} = absorbância na ausência de amostra em 490 nm .

Os valores de porcentagem de inibição possibilitaram a obtenção da curva analítica e, através desta, foi calculada a quantidade de substância necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase (IC_{50}).

4.2.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat) e fibroblastos (HDFa) para verificar a

viabilidade celular. Estes foram cultivados em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e 1% solução de antibiótico (penicilina 100 U.mL⁻¹; estreptomicina 0,1 mg.mL⁻¹). As culturas foram mantidas a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ em atmosfera de 5% de CO₂.

Após atingir confluência de células, as garrafas contendo as células foram tripsinizadas e os conteúdos foram centrifugados por três minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em meio de cultura. Em seguida, foi realizada a contagem das células em câmara de Neubauer, estabelecendo-se concentração padronizada para os experimentos foi de 5.10^5 células.mL⁻¹.

A suspensão de células foi plaqueada em microplaca de 96 orifícios, na qual foram transferidos 100 µL da suspensão de células para cada orifício. Em seguida, a microplaca foi incubada em estufa a $37 \pm 2^\circ \text{C}$, na presença de 5% de CO₂, por 24 horas, para posterior tratamento. Antes de realizar o tratamento, as microplacas foram observadas em microscópio invertido OLYMPUS CK2 para garantir que não havia contaminação.

Posteriormente, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (DMSO a 10%), controle negativo (DMEM com soro), e diferentes concentrações de AF (0,093 a 3 mg.mL⁻¹), solubilizado com 5% de etanol em DMEM com soro, durante 24 horas. Para controle do solvente, foi realizado o teste de citotoxicidade com etanol, nas mesmas concentrações de etanol utilizadas para o preparo das amostras. A organização da distribuição dos controles e amostras do AF está demonstrada na Figura 6.

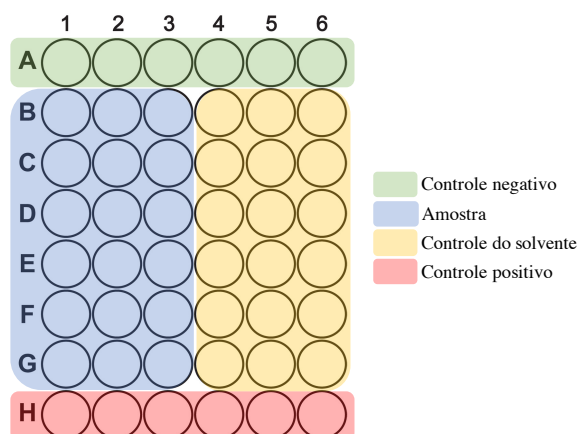


Figura 6. Esquema representativo da organização e distribuição dos controles e amostras do AF na microplaca para avaliação do potencial citotóxico.

Fonte: Elaborado pela autora.

Após o tratamento, o meio de cultura foi retirado, as microplacas foram lavadas cuidadosamente com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) e 100 µL de MTT (1 mg.mL⁻¹ de em PBS) e adicionadas em cada orifício. As células na microplaca foram incubadas a 37 ± 2° C, ao abrigo da luz, até se notar a presença de cristais violeta de formazana (3 a 5 horas) (BRUGGISSER et al., 2002).

Posteriormente, foi retirada a solução de corante MTT das microplacas e foram adicionados 100 µL de álcool isopropílico em cada orifício, para solubilização dos cristais. Em seguida, foi realizada uma leve agitação, a verificação da solubilização dos cristais de formazana e as absorbâncias foram avaliadas em leitor de placas ($\lambda = 595$ nm).

Com as absorbâncias obtidas, foi calculada a porcentagem de células mortas em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang e colaboradores (2004), através da Equação 5.

$$\% \text{ Células não - viáveis} = \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}}\right) \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Na qual,

A_{amostra} = absorbância da amostra em 595 nm;

A_{controle} = absorbância do controle negativo em 595 nm.

Foi realizado o cálculo para a células não-viáveis pelo AF e pelo controle de etanol. Posteriormente, a porcentagem de células mortas pelo solvente, foi subtraída da porcentagem de células mortas pelo AF e porcentagem de células viáveis foi calculada pela Equação 6:

$$\% \text{ Células viáveis} = 100 - \% \text{ células mortas} \quad \text{Equação 6}$$

Para as diferentes linhagens de células foi calculado o IC₅₀. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em três experimentos independentes.

4.2.6 PREPARO DAS EMULSÕES

A Tabela 3 apresenta os constituintes da emulsão inicialmente proposta para este estudo, na ausência (A) e na presença (B) de AF.

Tabela 3. Composição percentual da emulsão proposta.

Matéria prima	INCI name	A	B
Álcool Cetoestearílico/ Cetilesteáril sulfato de sódio	Cetearyl Alcohol (and) Sodium Cetearyl Sulfate	8,0	8,0
Monoestearato de Glicerila	Glyceryl Stearate	1,0	1,0
Estearato de Octila	Ethylhexyl Stearate	3,0	3,0
Propilenoglicol	Propylene Glycol	3,0	3,0
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	0,5	0,5
EDTA Na₂	Disodium EDTA	0,02	0,02
Ácido Ferúlico	Ferulic Acid	-	1,0
Água purificada	Aqua	qsp 100	qsp 100

Fonte: Elaborado pela autora.

As emulsões A e B foram preparadas em sistema de uma única fase. Em um béquer de vidro, adicionou-se a água purificada, estearato de octila e o EDTANa₂. Homogeneizou-se, manualmente, até completa solubilização e a mistura foi submetida a aquecimento em banho maria até atingir a temperatura de 75° C.

Após atingir esta temperatura, foram adicionados à mistura o álcool cetoestearílico/cetilesteril sulfato de sódio, o monoestearato de glicerila e, apenas para a emulsão B, o AF devidamente solubilizado em propilenoglicol. A mistura foi mantida em banho maria até completa fusão e homogeneização dos componentes, com agitação manual.

Em seguida, o béquer foi retirado do “banho maria” e foi levado ao agitador mecânico para completa homogeneização e formação da emulsão. Após resfriamento, em torno de 40-45° C, adicionou-se o fenoxietanol e homogeneizou-se adequadamente.

Esta foi armazenada em frasco de plástico, hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e do calor.

A emulsão A foi chamada de emulsão base nos ensaios subsequentes.

4.2.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR CLAE

Para a quantificação do AF no estudo de estabilidade e nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, e com o objetivo de propor um método *eco-*

friendly, foi necessário validar uma metodologia analítica utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Os parâmetros avaliados para a validação da metodologia foram: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

O equipamento utilizado foi um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca AGILENT, modelo 1100 Series com detector UV-Vis e injetor automático. A fase móvel (FM) foi composta por etanol (grau HPLC) e solução aquosa de ácido acético (grau HPLC) 2% (v/v) na proporção de 70:30, sendo que a coluna cromatográfica foi C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 μ m, Phenomenex) e as condições cromatográficas foram: fluxo 0,65 mL.min⁻¹, injeção de 5 μ L e comprimento de onda de 320 nm.

4.2.7.1 LINEARIDADE

Para avaliação da linearidade foram preparados seis padrões de AF em diferentes concentrações finais. Para isso, foram pesados, em balança analítica, 10 mg de AF e transferidos para um balão volumétrico de 50 mL, no qual o volume foi completado com etanol, obtendo-se uma solução com concentração de 200 μ g.mL⁻¹ (solução estoque). Aliquotas de 1000 a 3500 μ L desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com as concentrações finais de 20, 30, 40, 50, 60 e 70 μ g.mL⁻¹. Estas foram denominadas Padrão 1, Padrão 2, Padrão 3, Padrão 4, Padrão 5 e Padrão 6, respectivamente. As amostras foram filtradas em filtro de politetrafluoretileno (PTFE), com membrana de 0,45 μ m e injetadas no cromatógrafo (SPAGNOL, 2014).

As análises foram realizadas em triplicata. Foi avaliada a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração, levando em consideração que o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) foi 0,99 (BRASIL, 2017).

4.2.7.2 SELETIVIDADE

Para a avaliação da seletividade foram utilizadas três alíquotas de padrão do AF na concentração de 50 μ g.mL⁻¹ e três alíquotas da amostra de solução da emulsão base diluída na fase móvel. Esta foi preparada com 1g de base para 100 mL de etanol

(solução estoque), em seguida uma alíquota foi diluída em 15 mL de fase móvel, pois esta seria a quantidade necessária de emulsão para conter $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de AF.

As amostras foram filtradas em filtro de PTFE, com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ e injetadas no cromatógrafo.

Também foi realizado um estudo de degradação, com objetivo de submeter o analito a condições de estresse, que forçam a gerar produtos de degradação, verificando assim a interferência destes produtos na análise, mas não os identificando por CLAE (SPAGNOL, 2015).

Esta análise foi realizada submetendo-se o padrão de AF na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e a emulsão base em água, solução de hidróxido de sódio $0,001 \text{ M}$, solução de ácido clorídrico $0,001 \text{ M}$, solução de peróxido de hidrogênio 3% e luz ultravioleta (254 nm), por um período de oito horas. Desse modo, foi possível aferir a presença de picos de degradação que possam interferir na análise (SPAGNOL, 2014).

4.2.7.3 PRECISÃO

Na avaliação da repetibilidade, seis réplicas da solução de AF com concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista. O desvio padrão relativo (DPR) entre essas análises foi calculado (SPAGNOL, 2014).

Na avaliação da reprodutibilidade, foi realizada a análise, entre diferentes operadores, utilizando seis réplicas preparadas por cada operador. O desvio padrão relativo foi calculado. Todas amostras foram filtradas em filtro de PTFE, com membrana de $0,45 \mu\text{m}$.

4.2.7.4 EXATIDÃO

O ensaio de recuperação foi utilizado para determinar a exatidão, através do método de adição de padrão (SPAGNOL, 2014). O teste de recuperação foi executado adicionando três níveis de concentração, 80% (R1), 100% (R2) e 120% (R3), em relação à concentração padronizada da solução de AF. As amostras foram filtradas em filtro de PTFE, com membrana de $0,45 \mu\text{m}$ (SPAGNOL, 2014).

O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 40, 50 e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração.

4.2.7.5 ROBUSTEZ

Neste trabalho, a robustez foi avaliada por meio de alterações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. Foi injetado o padrão de 50 µg.mL⁻¹ no cromatógrafo e as seguintes variáveis foram modificadas:

- ✓ Comprimento de onda: 318, 320 e 322 nm;
- ✓ Vazão: 0,61 mL.min⁻¹, 0,65 mL.min⁻¹ e 0,69 mL.min⁻¹;
- ✓ Proporção da FM: 73:27, 70:30 e 33:67 (etanol: solução aquosa de ácido acético 2% (v/v));
- ✓ Fabricante do etanol: PanReac® e JT Baker®.

4.2.7.6 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada como um valor exato, sob as condições experimentais estabelecidas. Esse pode ser determinado na prática como a menor concentração do analito que pode ser detectada (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

O LD teórico é calculado a partir da Equação 7 (BRASIL, 2017):

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad \text{Equação 7}$$

Em que,

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = a inclinação da curva de calibração.

O LD do AF também foi determinado experimentalmente, a partir de uma solução de 50 µg.mL⁻¹, da qual alíquotas foram diluídas em balão volumétrico de 10 mL.

4.2.7.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de quantificação (LQ) corresponde à quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e precisão sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

O LQ teórico pode ser calculado pela Equação 8:

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad \text{Equação 8}$$

Em que,

DP_a = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação.

IC = a inclinação da curva de calibração.

O LQ do AF também foi determinado experimentalmente, a partir de uma solução de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, da qual alíquotas foram diluídas em balão volumétrico de 10 mL.

4.2.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO CONTENDO AF

Após o preparo da emulsão, foram separadas alíquotas submetidas a diferentes temperaturas: 5°C , 25°C (temperatura ambiente), 40°C e ciclos de congelamento/descongelamento ($-5^\circ \text{C}/25^\circ \text{C}$). O estudo de estabilidade acelerada foi conduzido conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004) e Isaac e colaboradores (2008).

Este estudo é conduzido por 90 dias. Este tipo de ensaio preconiza a avaliação das características físicas (valor de pH e viscosidade) e as características organolépticas (aspecto, cor, odor), separação de fases e do teor, tendo-se como amostra de referência as avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação da fórmula).

4.2.8.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

O teste de centrifugação avaliou a estabilidade da formulação, quanto à separação de fases e coalescência, conforme recomenda o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, série qualidade 1, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A centrifugação foi a 3.000 rpm durante 15 min com 5 g de amostra para todas as amostras (CADWALLAGER, 1989; BRASIL, 2004).

4.2.8.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

A avaliação microscópica foi realizada, utilizando microscópio Carl Zeiss MicroImaging GmbH, com a finalidade de observar o comportamento da emulsão nas

condições testadas. Para análise com luz polarizada, foi utilizado o microscópio Leica DM 2500M.

4.2.8.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

A avaliação macroscópica foi realizada para averiguar alterações na coloração, aspecto e odor, além da observação de possível separação de fases e/ou coalescência, considerando como referência as avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação) (BRASIL, 2004).

4.2.8.4 DETERMINAÇÃO DO pH

Após dispersão das amostras a 10% (m/m) (NEWBURGER, 1977), o pH foi determinado em pHmetro, Gehaka PG1800, conforme protocolo proposto (BRASIL, 2004). Os valores de pH foram determinados em triplicata, preriodicamente, durante 90 dias, nas amostras submetidas às temperaturas 5°C, 25°C (temperatura ambiente), 40°C, e ciclos de congelamento/descongelamento (BRASIL, 2004).

4.2.8.5 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

A viscosidade foi determinada para cada amostra, em triplicata, utilizando um viscosímetro Brookfield RVT com sistema Helipath, utilizando-se SPDL 93, rotação de 10 RPM, durante 1 minuto.

4.2.8.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AF

A concentração de AF nas emulsões ao longo do tempo foi avaliada através do método validado por CLAE. Para isso 0,0125 g do creme foi solubilizado em 25 mL de solução etanol:solução de ácido acético 2% (70:30), a fim de obter a concentração teórica de AF igual a 50 µg.mL⁻¹ e após dois minutos em ultrassom para facilitar a solubilização, foi realizada a leitura em cromatógrafo a 320 nm.

4.2.9. ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

4.2.9.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A avaliação da liberação do AF a partir da emulsão, realizada pela aluna de iniciação científica Amanda Manzini Carneiro, seguiu a metodologia proposta por

Marquele et al. (2006) e OECD (2004). Os ensaios de liberação foram efetuados utilizando células de Franz com área de difusão de 1,77 cm² e membrana de celulose (Sigma-Aldrich).

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 12 mL de tampão fosfato pH 5,5 com etanol (50:50). Amostras de 500 mg da emulsão contendo ácido ferúlico na concentração de 1% foram dispostas sobre a membrana.

Amostras de 200 µL foram coletadas após 1h30, 3h, 4h30, 6h, 18h, 19h30, 21h, 22h30 e 24 h. O mesmo volume de tampão fresco 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-maria (SPAGNOL, 2014). A concentração de ácido ferúlico nas amostras foi determinada por CLAE.

4.2.9.2 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Valência, Espanha, pela aluna de iniciação científica Amanda Manzini Carneiro. No ensaio foram utilizadas amostras de pele humana abdominal obtidas de correções cirúrgicas por aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universitat de Valencia, Espanha, sob o Protocolo H1462978691586. O consentimento foi previamente obtido pelos pacientes, os quais tiveram sua identidade resguardada para os pesquisadores. O excesso de gordura e tecidos conjuntivos foram removidos e as amostras foram armazenadas em um congelador a -26°C por no máximo três meses.

Membranas epidérmicas foram preparadas pela técnica *heat-separation*. Após a pele ter sido imersa em água a 60°C durante 45s, a epiderme foi cuidadosamente separada da derme subjacente (MELERO et al., 2009).

Os estudos de permeação *in vitro* foram conduzidos usando células de difusão estática de Franz FDC (tipo 4G-O1-00-20, Perme engrenagem, Riegelsville, PA, EUA) com uma área disponível de difusão de 1,77 cm² e 6 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 estrato lado 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 da célula de difusão.

Utilizou-se como fase receptora uma solução tamponante composta de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol, na proporção 50:50, garantindo *sink conditions*.

Posteriormente, amostras de 500 mg da emulsão foram dispostas sobre a membrana. O ativo teve sua solubilidade testada na solução receptora para garantir *sink conditions*. Em seguida as células foram cobertas com parafilme para evitar a evaporação (Figura 7).

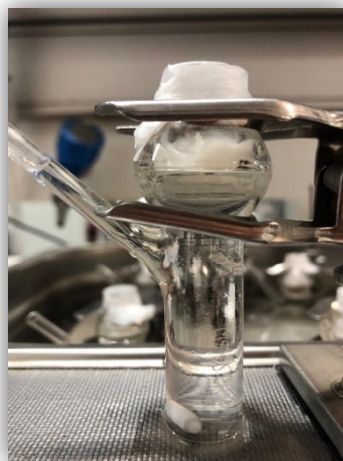


Figura 7. Célula de Franz contendo amostra para realização do estudo de permeação.

Fonte: Fotografia obtida por Amanda Manzini Carneiro

As amostras foram retiradas em intervalos específicos de tempo (1h30, 3h, 4h30, 6h, 18h, 19h30, 21h, 22h30 e 24 h) do compartimento receptor, seguida por reposição com solução tamponante de fosfato de sódio pH 5,5 com etanol (50:50).

A concentração de ácido ferúlico nas amostras foi determinada por CLAE.

4.2.9.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO *IN VITRO*

4.2.9.3.1 PREPARAÇÃO DA PELE

O ensaio foi realizado no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade de Valência, Espanha, pela aluna de iniciação científica Amanda Manzini Carneiro, utilizando amostras de pele humana abdominal obtidas de correções cirúrgicas por aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universitat de Valencia, Espanha, sob o Protocolo H1462978691586. O excesso de gordura e os tecidos conjuntivos foram removidos e as amostras armazenadas em freezer a -26°C por menos de três meses.

A pele foi então colocada em uma lâmina de vidro com o lado de fora voltado para cima e um molde de alumínio foi colocado sobre ele, deixando a área de aplicação

descoberta. Aplicou-se a formulação (0,1g) contendo o AF livre na área delimitada pelo molde de alumínio (Figura 8). Depois disso, o sistema foi incubado a 32 ° C durante duas horas.



Figura 8. Preparação para o estudo de *tape stripping*, na qual é possível notar em **a)** a pele com o molde de alumínio, em **b)** aplicação da emulsão sobre a pele e em **c)** o sistema pronto para incubação.

Fonte: Fotografia obtida por Amanda Manzini Carneiro

4.2.9.2.2 TÉCNICA *TAPE STRIPPING*

O método consiste na aplicação de 20 fitas adesivas na superfície da pele e posterior remoção mecânica da mesma, a fim de remover o estrato córneo da pele (Figura 9). Qualquer variabilidade é evitada através da execução de replicações usando peles do mesmo doador. Cada tira de fita contém uma quantidade de corneócitos e a quantidade correspondente da formulação penetrada. O AF é então extraído das tiras pelo uso de uma solução extrativa metanol : água acidificada (70:30, v/v) sob agitação por um período de 24 horas e subsequentemente quantificada por CLAE. Os dados obtidos representam o gradiente de concentração através da membrana, que representa a difusão do ativo.

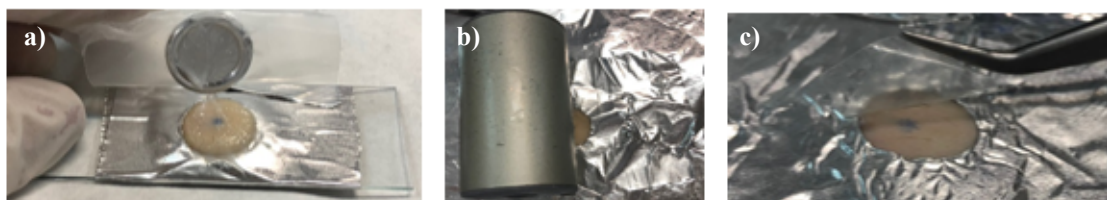


Figura 9. Procedimento de *tape stripping*, no qual é possível notar em **a)** remoção da tampa de alumínio, **b)** a aplicação da fita e em **c)** a remoção da fita.

Fonte: Fotografia obtida por Amanda Manzini Carneiro

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE DO AF

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), estudos de solubilidade complementam e fortalecem os demais ensaios, de modo a proporcionar “um valor definitivo caso a substância não apresente a solubilidade mínima requerida” (Farmacopéia Brasileira, 2010, p.25).

A Tabela 4 apresenta os resultados de solubilidade obtidos para o AF segundo os termos descritivos de solubilidade mostrados no Quadro 1 apresentado na metodologia. Foram utilizados 10 mg de AF em cada teste com objetivo de reduzir o consumo de amostra e solventes.

Tabela 4. Solubilidade do AF em diferentes solventes a 25 °C.

Solvente	Termo descritivo	Volumes aproximados de solvente
Água	Praticamente insolúvel	Mais de 10000 partes
Etanol	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Metanol	Solúvel	De 10 a 30 partes
Etanol: Água (40:60)	Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Dimetilsulfóxido	Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os parâmetros avaliados, por meio dos resultados obtidos para o AF, foi possível inferir que este é solúvel em metanol, facilmente solúvel em etanol e dimetilsulfóxido, pouco solúvel na solução de etanol: água (40:60) e praticamente insolúvel em água purificada.

Foram encontradas informações sobre a solubilidade apenas no Merck Index (2013), segundo o qual o AF apresenta baixa solubilidade em água e alta solubilidade em etanol. Desse modo, nos testes posteriores, não foi utilizado água como solvente para o AF.

A avaliação da solubilidade também foi importante para a escolha dos solventes utilizados na metodologia analítica.

5.2 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE

5.2.1 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH

A captura do radical DPPH por antioxidantes é a base do método de inibição desse radical. Quando este é estabilizado, ocorre a mudança da coloração de violeta para amarelo claro (ALMEIDA, 2013). A Figura 10 apresenta a microplaca onde o ensaio foi realizado e pode-se observar a mudança de coloração, mostrando que houve a reação.

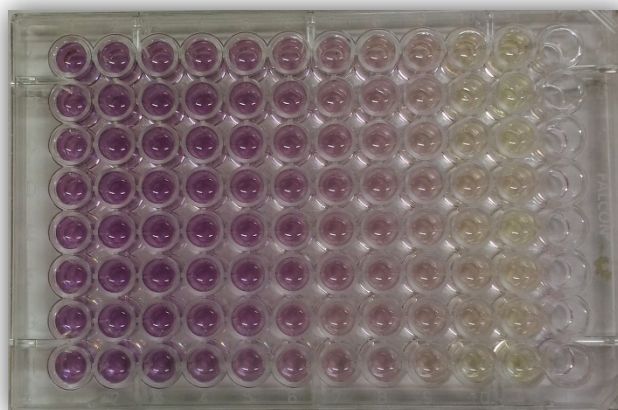


Figura 10. Microplaca do ensaio de inibição do radical DPPH com AF.

Fonte: Fotografia realizada pela autora.

O padrão de AA apresentou um IC_{50} de $3,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Já o AF necessitou de $12,21 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para inibir a mesma quantidade do radical DPPH. As Figuras 11 e 12 apresentam as curvas analíticas obtidas para o padrão escolhido e para o AF, respectivamente.

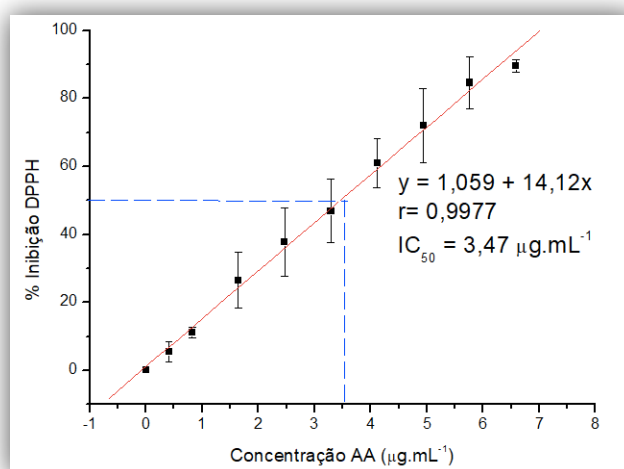


Figura 11. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição do radical DPPH em microplaca.

Fonte: Elaborado pela autora.

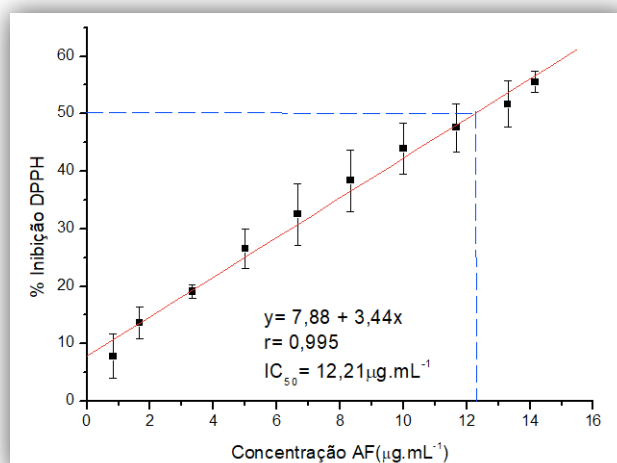


Figura 12. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição do radical DPPH em microplaca.

Fonte: Elaborado pela autora.

Comparando o IC_{50} do padrão com o IC_{50} do AF foi possível inferir que o AF apresenta atividade antioxidante, porém é necessária concentração superior deste ácido para inibir a mesma quantidade do radical DPPH em relação ao padrão estabelecido, o ácido ascórbico.

Apesar disso, o AF se mostra estável na presença de luz, o que não acontece com o AA (MAIA, 2002).

5.2.2 MÉTODO DE INIBIÇÃO DO RADICAL ABTS

O radical ABTS é formado através de uma reação com persulfato de potássio. Foi realizada a tentativa de miniaturizar a técnica, mas esta não foi reprodutível em microplaca. Sendo assim, não foram feitas adaptações (Almeida et al., 2013).

O método de inibição do radical ABTS apresenta vantagens em relação ao método de inibição do radical DPPH, pois pode ser utilizado em uma ampla faixa de pH e é solúvel em água, ao contrário do radical DPPH que é apenas solúvel em solventes orgânicos. Outra vantagem é que a reação é mais rápida comparada ao método de inibição do radical DPPH (ALMEIDA, 2013; AWIKA et al., 2003; BRAND-WILLIAMS et al., 1995; LEMANSKA et al., 2001; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2008; TYRAKOWSKA et al., 1999).

A Figura 13 apresenta os tubos de ensaio onde o teste foi realizado. Observou-se a diferença das colorações dos meios reacionais, onde o radical apresentou coloração

verde-água que diminuiu de tonalidade quando foi reduzido. Em maior inibição do radical, o meio reacional apresentou coloração tendendo a incolor.

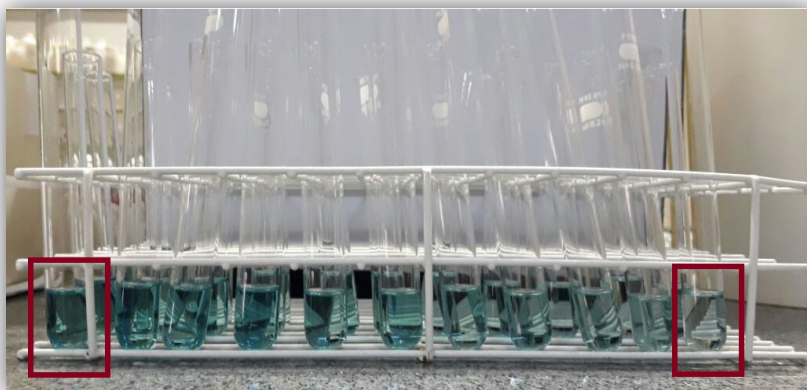


Figura 13. Tubos de ensaio do ensaio de inibição do radical ABTS com AF. Destaque para a amostra de menor concentração e para a amostra de maior concentração.

Fonte: Fotografia realizada pela autora.

A partir da curva analítica (Figura 14) obtida foi possível determinar $IC_{50} = 2,55$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o AA. Já para o AF, o valor de IC_{50} foi de $2,84$ $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 15).

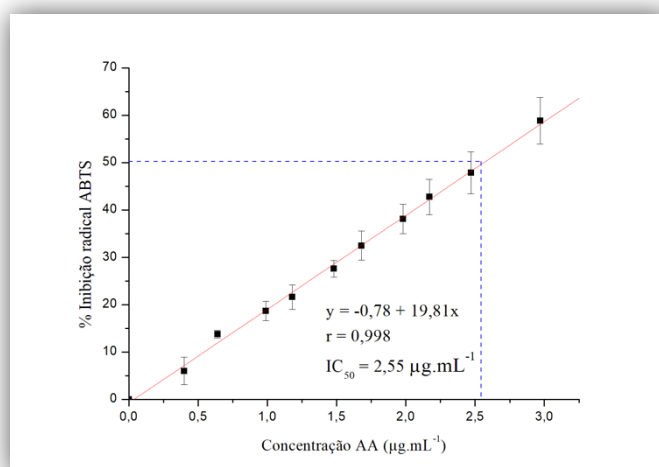


Figura 14. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição do radical ABTS em tubos de ensaio

Fonte: Elaborado pela autora.

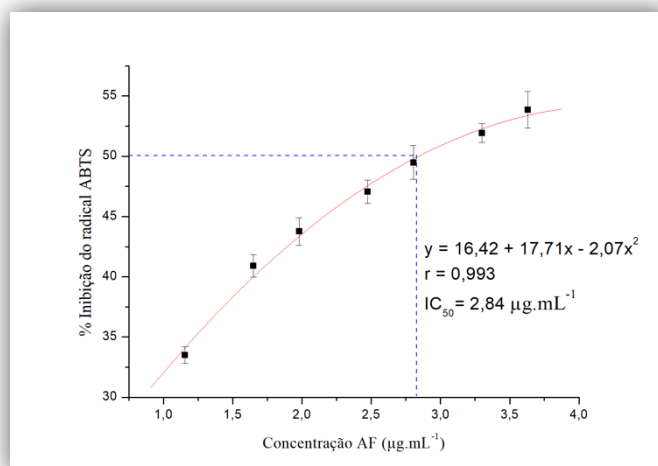


Figura 15. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição do radical ABTS em tubos de ensaio.

Fonte: Elaborado pela autora.

Comparando o IC₅₀ do padrão com o IC₅₀ do AF foi possível inferir que o AF apresenta atividade antioxidante e a concentração de ambos é próxima para inibir a mesma quantidade do radical ABTS.

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram realizadas avaliações com cepas padrão *E. coli*, ATCC 10536; *S. aureus*, ATCC 6538; *S. epidermidis*, ATCC 1222 e *P. aeruginosa*, ATCC 27853. A resazurina foi escolhida, pois é um corante óxido-redutor, no qual o mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resorufina (cor rósea) (FUKUSHIMA et al., 2003; PALOMINO et al., 2002). Entretanto, nas análises ocorreram dúvidas na coloração e a leitura espectrofotométrica complementou esta análise.

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). No ensaio, a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

5.3.1 *Escherichia coli*

A solução estoque de AF utilizada foi de 12 mg.mL⁻¹, tendo como solvente uma mistura de etanol e água na proporção de 70:30. O antibiótico, usado como controle positivo de morte, foi o Azetreonam com concentração de 400 µg.mL⁻¹.

Ao observar a microplaca (Figura 16), nota-se que o antibiótico utilizado, linha D, inibiu a bactéria em todos os orifícios. Observando a inibição da amostra, nota-se que a terceira fileira, linhas E a H, com amostra apresentou uma coloração incerta e o controle do solvente, linha C, inibiu no primeiro orifício.

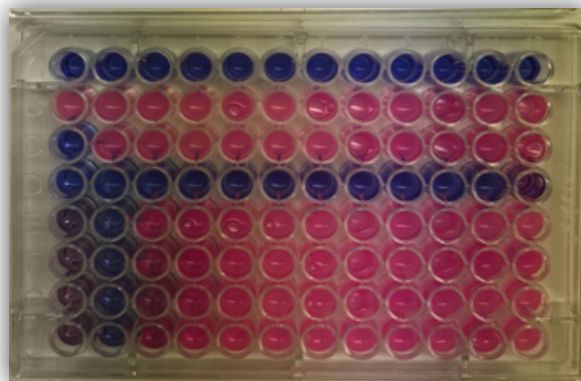


Figura 16. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para *E. coli*.
Fonte: Fotografia realizada pela autora.

A porcentagem de inibição foi obtida através da Equação 3, apresentada na metodologia, e ocorreu 96,23% de inibição na segunda coluna de amostra. Desse modo a CIM foi de 1,5 mg.mL⁻¹. Após o replaqueamento (Figura 17), foi observado que a CBM foi de 3,0 mg.mL⁻¹.

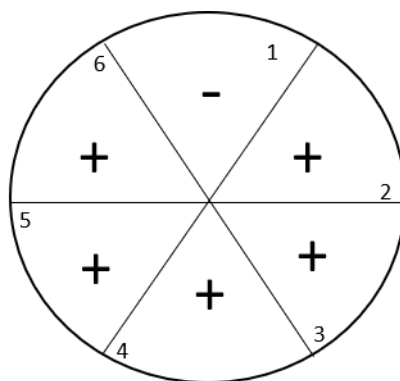


Figura 17. Esquema representativo da determinação da CBM para *E. coli*, no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.2 *Staphylococcus aureus*

A solução estoque de AF utilizada foi de 24 mg.mL⁻¹, tendo como solvente uma mistura de etanol e água na proporção de 70:30. O antibiótico, usado como controle positivo de morte, foi o Cefazolina com concentração de 500 µg.mL⁻¹.

Ao observar a microplaca (Figura 18), nota-se que o antibiótico utilizado, linha D, inibiu a bactéria em todos os orifícios. O controle do solvente, linha C, inibiu no primeiro e no segundo orifício. Sendo assim, também foi realizado o controle do solvente na CBM.

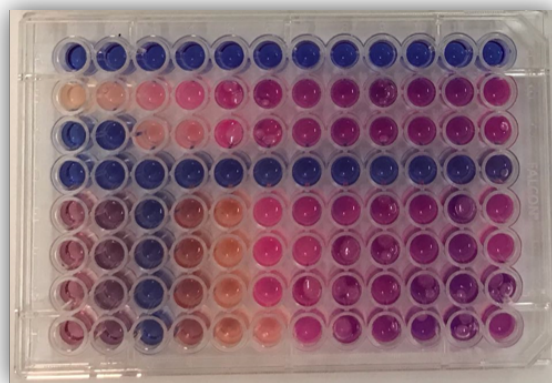


Figura 18. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para *S. aureus*.
Fonte: Fotografia realizada pela autora.

Observando a inibição da amostra, linhas E a H, nota-se que as quarta e quinta fileiras com amostra apresentou uma coloração que incerta. Com o auxílio da leitura espectrofotométrica e a Equação 3, apresentada na metodologia, determinou-se que a CIM foi de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo que no segundo orifício inibiu 96,23 %. CBM foi de $3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 19).

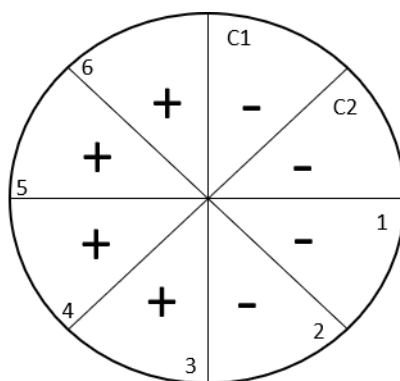


Figura 19. Esquema representativo da determinação CBM para *S. aureus*, no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

A solução estoque de AF utilizada foi de 24 mg.mL^{-1} , tendo como solvente uma mistura de etanol e água na proporção de 70:30. O antibiótico, usado como controle positivo de morte, foi o Cefazolina com concentração de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ao observar a microplaca (Figura 20), nota-se que o antibiótico utilizado, linha D, não inibiu a bactéria em todos os orifícios, foram realizados testes com outros antibióticos e o comportamento se manteve. O controle do solvente, linha C, inibiu no primeiro e no segundo orifício. Sendo assim, também foi realizado o controle do solvente na CBM.

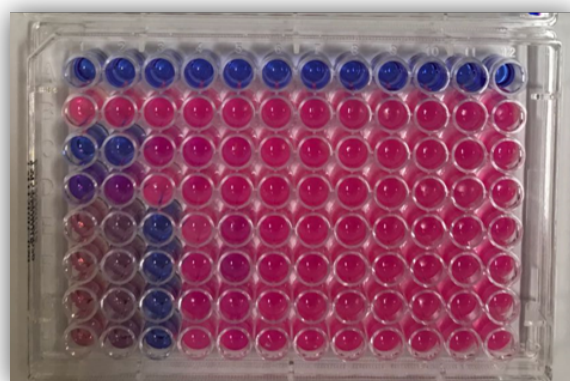


Figura 20. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para *P. aeruginosa*.

Fonte: Fotografia realizada pela autora.

Observando a inibição da amostra, linhas E a H, e com o auxílio da leitura espectrofotométrica, determinou-se que a CIM foi de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo que no terceiro orifício inibiu 91,42%. A CBM foi de $3,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 21).

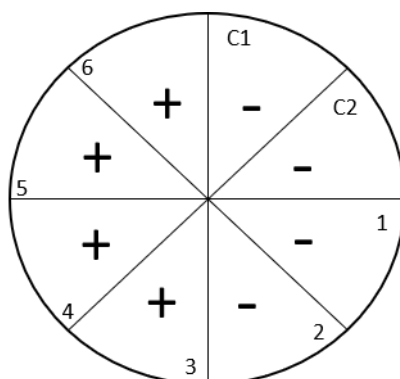


Figura 21. Esquema representativo da determinação de CBM para *P. aeruginosa*, no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: Elaborado pela autora.

5.3.4 *Staphylococcus epidermidis*

A solução estoque de AF utilizada foi 24 mg.mL^{-1} , tendo como solvente uma mistura de etanol e água na proporção de 70:30. O antibiótico, usado como controle positivo de morte, foi o Cefazolina com concentração de $500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ao observar a placa (Figura 22), nota-se que o antibiótico utilizado, linha D, inibiu parcialmente a bactéria nos orifícios. Foram realizados testes com outros antibióticos e o comportamento se manteve. O controle do solvente, linha C, inibiu até o quarto orifício. Sendo assim, também foi realizado o controle do solvente na CBM.

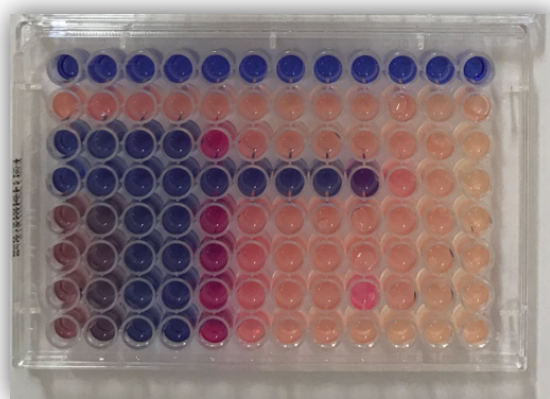


Figura 22. Microplaca da leitura com revelador resazurina para determinação da CIM para *S. epidermidis*.

Fonte: Fotografia realizada pela autora.

Observando a inibição da amostra, linhas E a H, e com o auxílio da leitura espectrofotométrica, não foi possível determinar a CIM, pois o solvente inibiu nos mesmos orifícios que o ativo. A CBM foi de $0,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Figura 23).

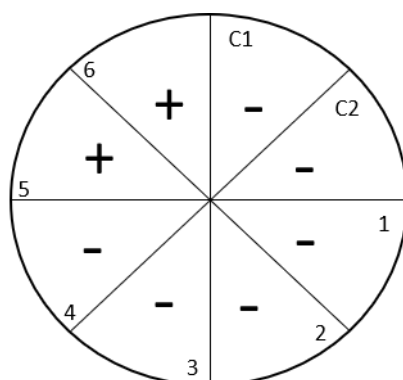


Figura 23. Esquema representativo da determinação de CBM para *S. epidermidis*, no qual o sinal positivo indica crescimento bacteriano e o sinal negativo indica ausência de crescimento bacteriano.

Fonte: Elaborado pela autora.

Diante das informações descritas, é possível notar que foram necessárias pequenas concentrações, variando de 0,75 a 3,0 mg.mL⁻¹, do AF para inibir o crescimento das bactérias testadas neste trabalho.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBIDORA DE TIROSINASE

Este ensaio tem como fundamento a inibição da atividade da tirosinase, implicando na diminuição da transformação de L-dopa em dopaquinona por reações catalisadas pela enzima (KHAZAEI et al., 2009).

A tirosinase é uma cobreenzima que está presente em vários reinos biológicos, incluindo animais, plantas e fungos. Esta enzima é chave na síntese de melanina, intervém em vários intermediários das fases de formação do pigmento e também desempenha um papel importante na prevenção de lesões cutâneas induzidas por radiação UV (GARCIA-JIMENEZ et al., 2016; KHAZAEI et al., 2009).

Entretanto, a forte ativação da tirosinase gera um acúmulo excessivo de melanina, que pode levar à distúrbios da hiperpigmentação, como melasma e sardas (OYAMA, 2016). Em vista disto, muitos ativos com capacidade de inibir a tirosinase para controlar os efeitos negativos da sua atividade tem sido estudados (SPAGNOL, 2014).

A tirosinase é uma enzima catalizadora de duas reações: Tirosina em l-dopa e l-dopa em dopaquinona, como pode ser observado na Figura 24. O método utilizado avaliou a inibição pela diminuição da transformação de l-dopa em dopaquinona.

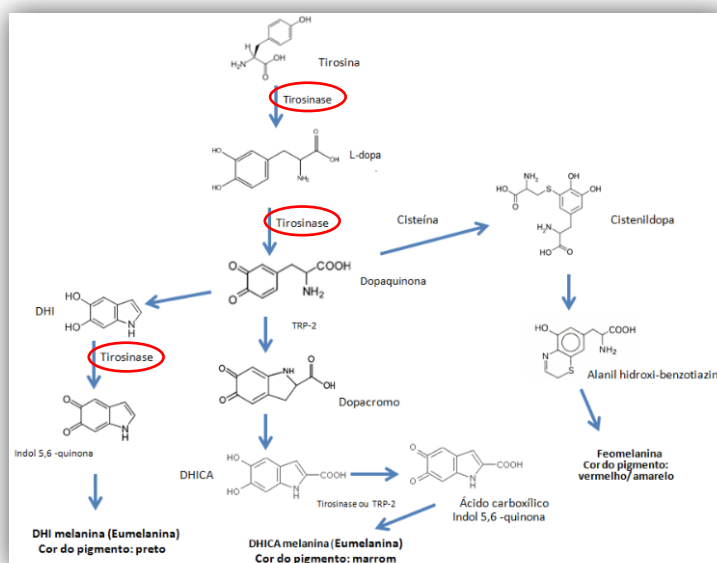


Figura 24. Representação esquemática das etapas da melanogênese.
Fonte: Almeida, 2013.

A Figura 25 apresenta o perfil de inibição da tirosinase promovida pelo AF determinado no ensaio, com a coloração variando de laranja escuro a praticamente incolor, o que indica a capacidade de despigmentação, por inibição da referida enzima.

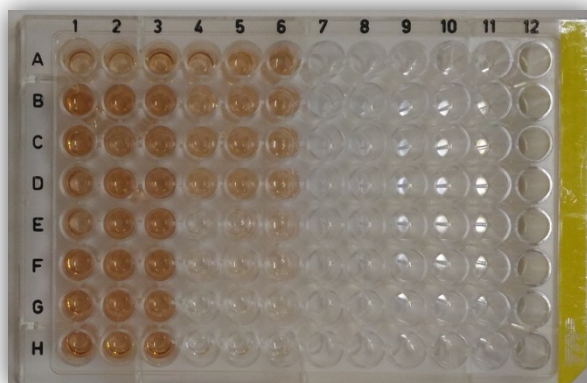


Figura 25. Microplaca do ensaio de determinação da atividade inibidora de tirosinase com AF.
Fonte: Fotografia realizada pela autora.

As Figuras 26 e 27 apresentam as curvas analíticas obtidas neste ensaio. O padrão de AA apresentou um IC_{50} de $0,058 \text{ mg.mL}^{-1}$ e o AF necessitou de $2,89 \text{ mg.mL}^{-1}$ para inibir a mesma concentração de tirosinase.

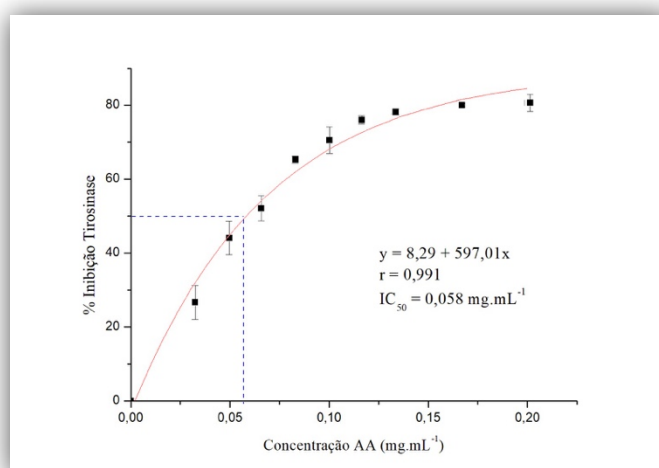


Figura 26. Curva analítica da atividade antioxidante do AA pelo método de inibição da tirosinase.
Fonte: Elaborado pela autora.

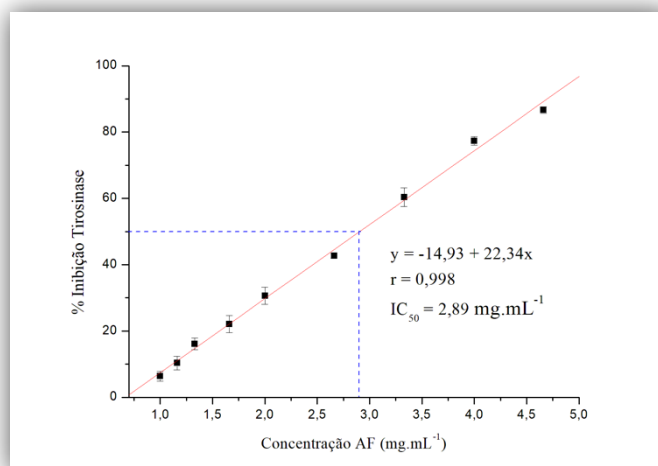


Figura 27. Curva analítica da atividade antioxidante do AF pelo método de inibição da tirosinase.
Fonte: Elaborado pela autora.

Comparando o IC_{50} do AA com o IC_{50} do AF foi possível sugerir que o AF apresenta atividade inibitória de tirosinase, porém é necessária concentração superior deste ácido para inibir a mesma quantidade em relação ao padrão comparativo. No entanto, o AF apresenta a vantagem de não degradar a presença de luz e pode oferecer mais de um benefício em um produto cosmético.

5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO

A avaliação do potencial citotóxico tem como fundamento a determinação da capacidade de células vivas em reduzirem o 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), formando cristais de formazana que são insolúveis e possuem coloração violeta (MOSMANN, 1983).

Este ensaio foi realizado para o AF utilizando as linhagens celulares HaCat queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes e HDFa, fibroblastos humanos adultos.

No ensaio com HaCat (Figura 28), foi obtido um IC_{50} de 1092 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Isto é promissor visto que a concentração de AF necessária para inibir 50 % das células HaCat foi cerca de 100 vezes maior que a concentração necessária para inibir 50% de radicais DPPH (12,21 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e cerca de 400 vezes maior que ABTS (2,84 mg.mL^{-1}) respectivamente.

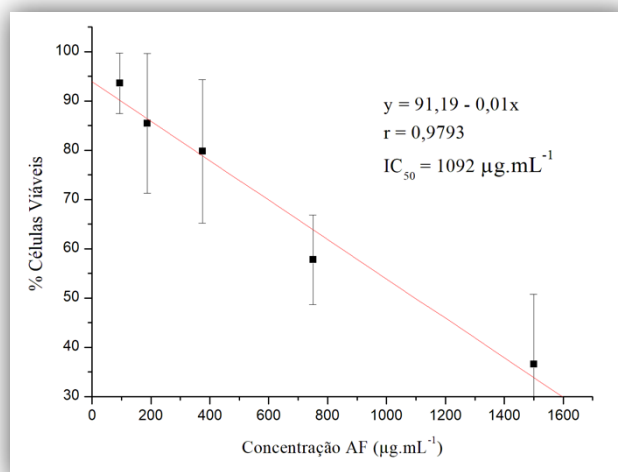


Figura 28. Curvas de viabilidade celular para linhagem HaCat após 24h de tratamento com AF.
Fonte: Elaborado pela autora.

No ensaio com HDFa (Figura 29), a concentração máxima do AF testada (3000 µg.mL⁻¹) não atingiu 50% de morte celular, podendo-se afirmar que o AF não exibiu toxicidade significativa nas condições testadas.

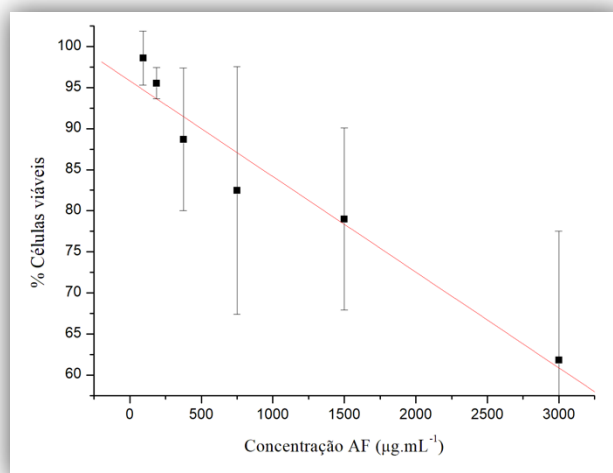


Figura 29. Curvas de viabilidade celular para linhagem HDFa após 24h de tratamento com o AF.
Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 PREPARO DAS EMULSÕES

Os componentes das emulsões foram escolhidos com o objetivo de propor uma emulsão com baixo custo, utilizando matérias primas de fácil acesso e que garantissem um sensorial agradável. A Tabela 5 apresenta a função de cada componente das emulsões.

Tabela 5. Componentes das emulsões propostas e suas funções.

Matéria prima	INCI name	Função
Álcool Cetoestearílico/ Cetilestearil sulfato de sódio	Cetearyl Alcohol (and) Sodium Cetearyl Sulfate	Base autoemulsionante aniônica/ Agente de consistência/ tensoativo
Monoestearato de Glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência
Estearato de Octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante
Fenoxietanol	Phenoxyethanol	Conservante antimicrobiano
EDTA Na₂	Disodium EDTA	Sequestrante antioxidante
Ácido Ferúlico	Ferulic Acid	Ativo
Água purificada	Aqua	Veículo

Fonte: Elaborado pela autora.

O componente em maior composição percentual na formulação proposta é a água. Esse componente deve ser isento de íons e microrganismos, desse modo, foi utilizada água purificada. Esta atua como o veículo, sendo responsável pela dissolução de diversas matérias primas como, por exemplo, o EDTA Na₂, conservantes antimicrobianos e agentes corretivos de pH (CORRÊA, 2012).

A base autoemulsionante aniônica, conhecida comercialmente como Lanette N[®], possui em sua composição um agente de consistência, o álcool cetoestearílico, e um tensoativo, o cetilestearil sulfato de sódio. Este último, por possuir grupos hidrofílicos e lipofílicos em sua estrutura, reduz a tensão superficial e/ou interfacial do sistema, provomendo a estabilidade entre as diferentes fases da emulsão. Já o agente de consistência, é capaz de aumentar a viscosidade do sistema emulsionado, sendo que, nas emulsões propostas, associou-se ao álcool cetoestearílico o monoestearato de glicerila que possui esta mesma finalidade (BENSON, 2019; CORRÊA, 2012).

O estearato de octila e o propilenoglicol possuem a função de emoliência e umectancia, respectivamente. O emoliente é uma matéria prima oleosa que fornece espalhabilidade para a emulsão, concedendo suavidade para a pele (CORRÊA, 2012). Já o umectante é uma matéria prima higroscópica, que auxilia na solubilização de ativos lipossolúveis, como o AF, e possui a função de reter água, equilibrando a troca aquosa entre a emulsão e o ar (BENSON, 2019; CORRÊA, 2012).

O conservante antimicrobiano, fenoxietanol, possui a função de prevenir o crescimento e proliferação de microrganismos na formulação, tanto no processo de

manipulação da emulsão, quanto no uso pelo consumidor (BENSON, 2019). Já o sequestrante antioxidante, EDTA Na₂, possui a função de sequestrar de impurezas e preservar o produto (CORRÊA, 2012).

A emulsão base e a emulsão contendo o AF (emulsão B), desenvolvidas neste trabalho, apresentaram aparência branca, sensorial agradável, alta espalhabilidade, alta emoliência e secagem rápida. A emulsão contendo o AF apresentou odor característico deste ativo. A Figura 30 apresenta as fotografias das emulsões desenvolvidas no presente trabalho.

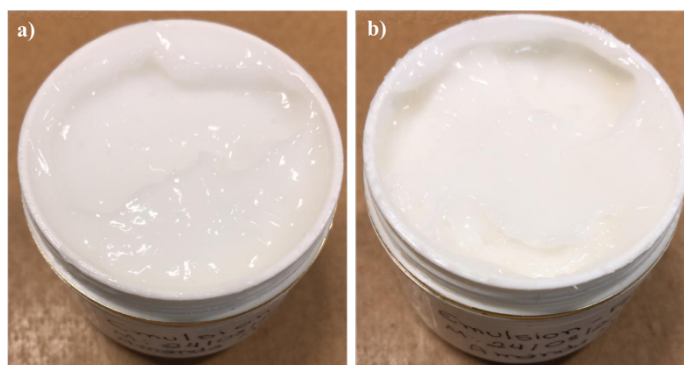


Figura 30. a) Emulsão base e b) Emulsão contendo 1% do AF.

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

5.7 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO QUANTITATIVO POR CLAE

Validar um método analítico significa afirmar que um processo é aceitável para a finalidade a que ele se destina. As condições da validação de um método analítico englobam estudos da linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez e limite de detecção e quantificação (HARRIS, 2012). O desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação qualitativa e quantitativa é muito relevante, principalmente para monitorar a qualidade dos produtos comercializados (MARCO et al., 2017).

Ao observar os solventes utilizados e relativos à revisão da literatura, listados na Tabela 2, notou-se a presença de alguns solventes tóxicos. Sendo assim, neste trabalho, foi proposta a validação de um método utilizando etanol e água, pois são menos prejudiciais ao meio ambiente, apresentam menor risco à saúde do operador e, muitas vezes, estão associados a baixos custos (GAŁUSZKA et al., 2012; ZIMMERMANN et al., 2017).

5.7.1 LINEARIDADE

A linearidade é a capacidade de um método analítico em demonstrar que a resposta obtida está em função da concentração do analito, dentro de um intervalo de concentração especificado (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

O AF apresentou um tempo de retenção de 2,5 min e o tempo total de corrida foi de 6 min. A Tabela 6 apresenta os valores das áreas obtidas, média e desvio padrão relativo para a curva analítica de AF.

Tabela 6. Valores das áreas referentes ao pico de AF para obtenção da curva analítica.

Concentração final ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	DPR (%)	Média DPR
20	837,600	860,400	865,600	854,5333	14,893	1,7429	1,1528
30	1280,400	1254,500	1298,700	1277,8667	22,209	1,7379	
40	1780,800	1816,300	1766,000	1787,7000	25,850	1,4460	
50	2199,400	2187,700	2169,500	2185,5333	15,067	0,6894	
60	2694,400	2650,400	2640,500	2661,7667	28,692	1,0779	
70	3150,700	3138,100	3149,700	3146,1667	7,004	0,2226	

DPR – Desvio padrão relativo.

Fonte: elaborado pela autora.

A partir dos valores apresentados na Tabela 6, foi possível construir a curva analítica de média das áreas por concentração final (Figura 31). A equação da reta é $y = 45,736x - 72,53845$ com $r = 0,99924$. Sendo assim, a correlação linear entre os dados analisados foi satisfatória, pois r está próximo de 1.

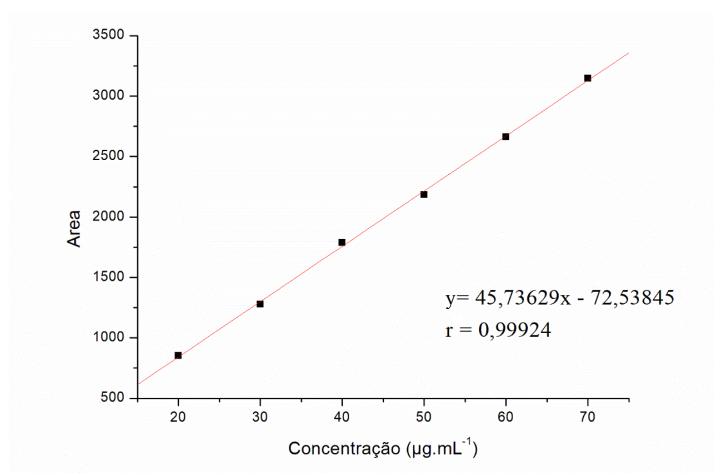


Figura 31. Curva analítica do AF obtida por CLAE.

Fonte: elaborado pela autora

5.7.2 SELETIVIDADE

A Seletividade corresponde à capacidade de um método determinar um analito na presença de outros componentes suscetíveis a interferir na determinação, como impurezas e produtos de degradação (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

Nesta análise, primeiramente foi injetada a amostra da solução de emulsão base e um padrão de AF 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao injetar a base, não foram encontrados picos, ao longo dos 6 min de corrida, portanto, não havendo interferência na análise. As Figuras 32 e 33 mostram os cromatogramas da emulsão base e do padrão de AF, respectivamente.

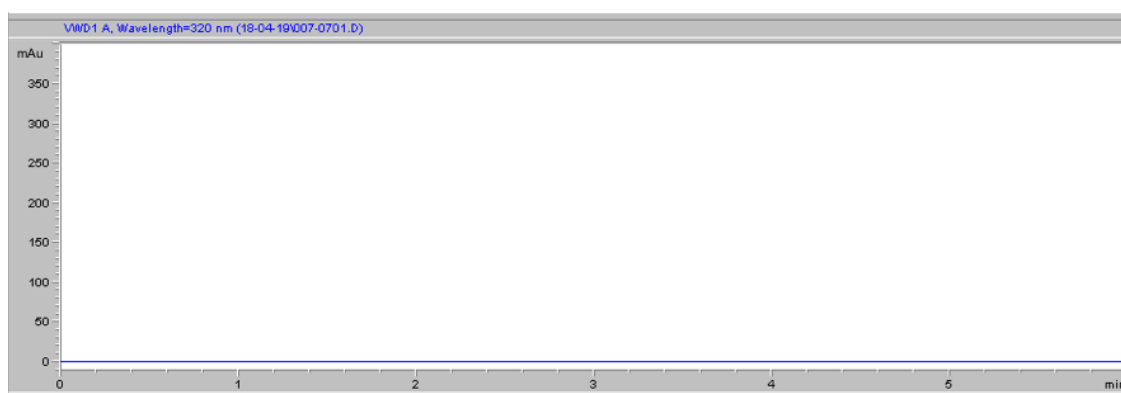


Figura 32. Cromatograma obtido por CLAE para solução da emulsão base diluída na fase móvel utilizando coluna C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 μm , Phenomenex), vazão 0,65 mL.min^{-1} e $\lambda=320$ nm.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

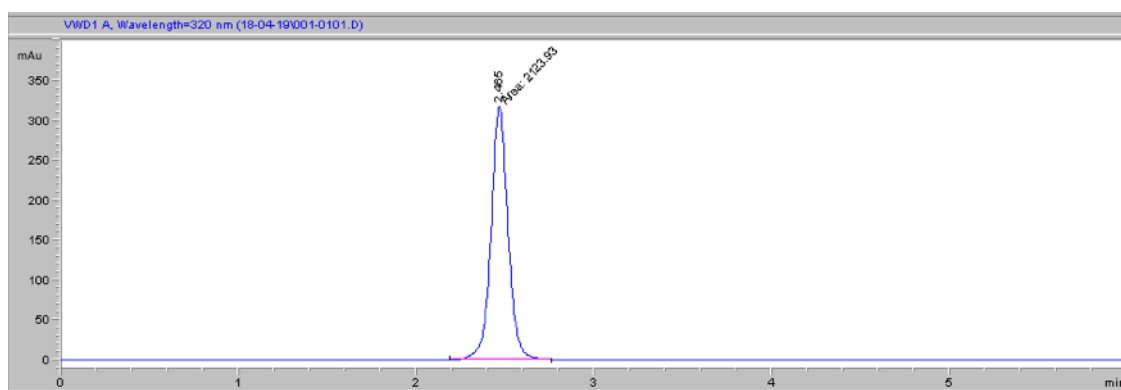


Figura 33. - Cromatograma obtido por CLAE para solução de AF (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em fase móvel utilizando coluna C18 GEMINI-NX (4,6 x 150 mm, 5 μm , Phenomenex), vazão 0,65 mL/min e $\lambda=320$ nm.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

Também foi realizado o estudo de degradação do AF, para verificar a influência de produtos de degradação no pico do ativo. Para isto, o padrão de AF na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e a emulsão base foram expostos a degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica, em temperatura de 80 °C.

As amostras foram expostas às condições específicas nos tempos 0, 2, 4 e 8 horas. Após o período de exposição, estas soluções foram imediatamente injetadas no CLAE e, deste modo, foram obtidos os cromatogramas que podem ser observados nas Figuras 34 a 37.

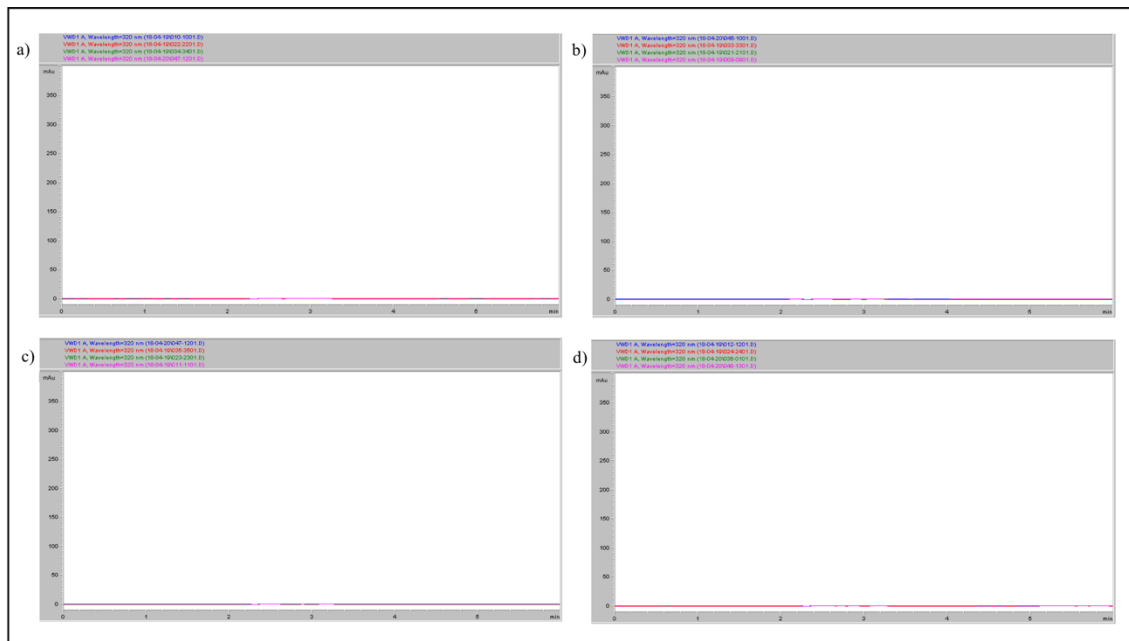


Figura 34. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução da emulsão base, em **a)** HCl 0,001 M, **b)** NaOH 0,001 M, **c)** água Mili-Q e **d)** luz ultravioleta, a 80°C, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

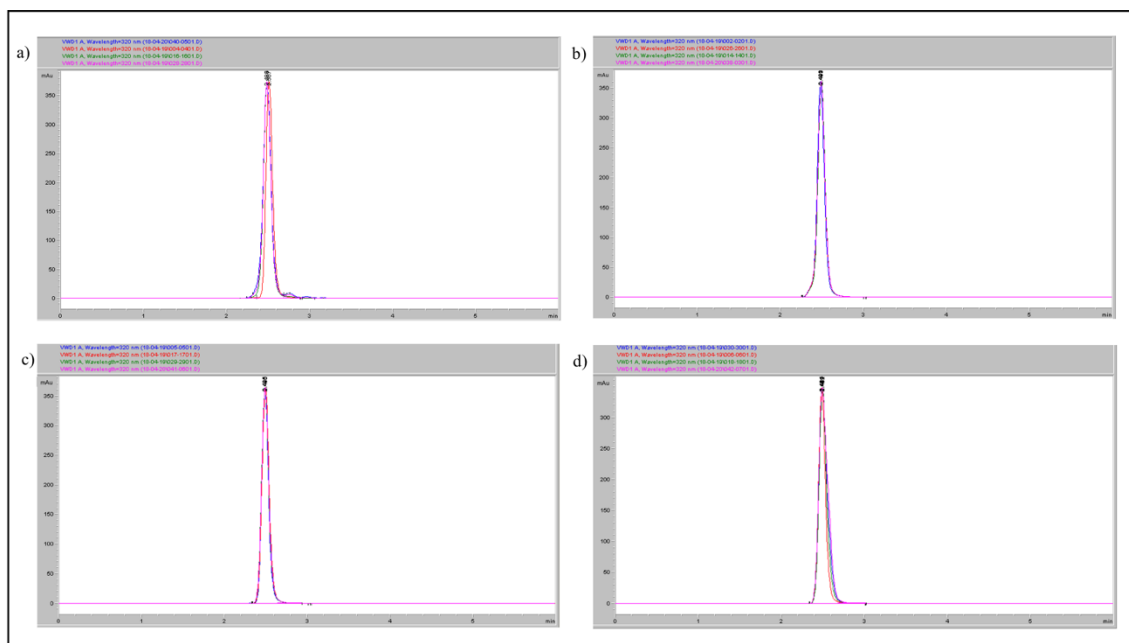


Figura 35. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AF ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em **a)** HCl 0,001 M, **b)** NaOH 0,001 M, **c)** água Mili-Q e **d)** luz ultravioleta, a 80°C, nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

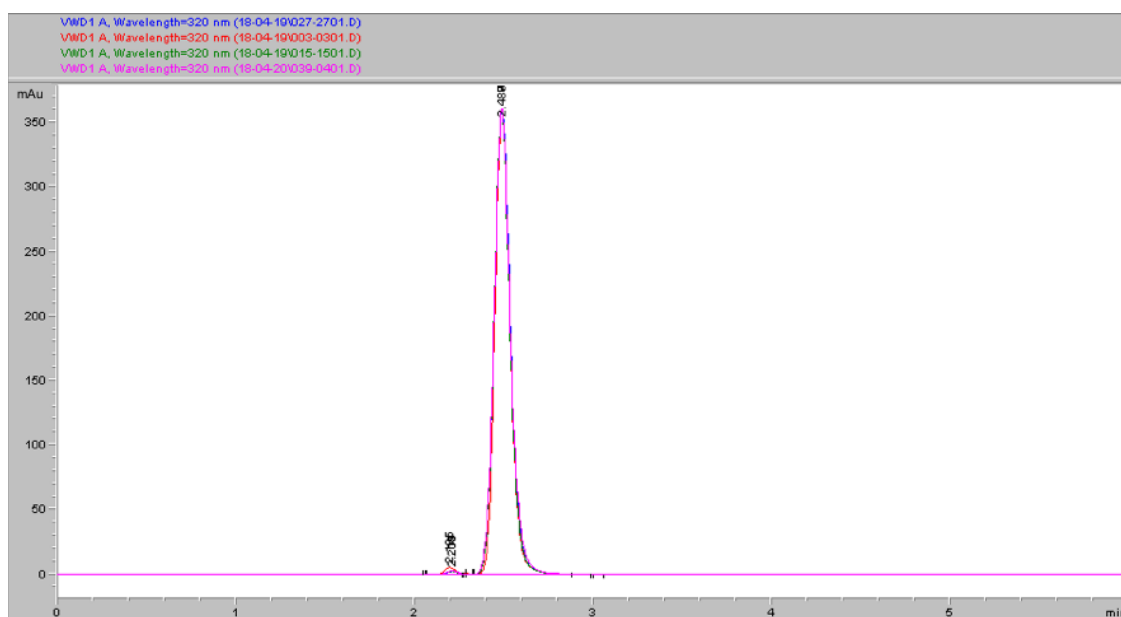


Figura 36. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de AF ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), em H_2O_2 3%, a 80°C , nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

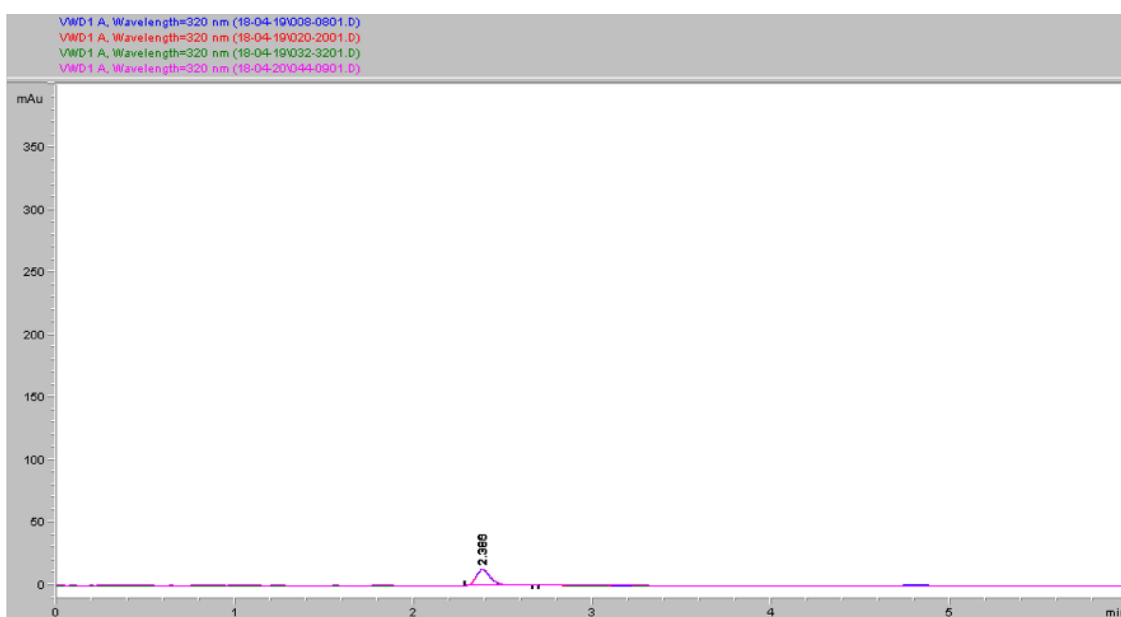


Figura 37. Cromatogramas obtidos por CLAE para solução da emulsão base, em H_2O_2 3%, a 80°C , nos tempos: 0, 2, 4 e 8 horas.

Fonte: Cromatograma obtido pela autora.

Como pode ser observado na Figura 32, a análise da emulsão base, nas condições estabelecidas, não apresentou qualquer valor quantificável que possa interferir nas análises para o AF. Dessa forma, pode-se inferir que não existem interferentes na análise do AF, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão (Figura 33).

Também foi observada a presença de um pequeno pico na degradação oxidativa (Figuras 36 e 37) para ambas as amostras, mas este não interferiu nas análises.

É importante destacar que na análise com luz ultravioleta (UV), Figura 35 d), não houve degradação do AF. Sendo assim, o ativo não degrada na presença de luz UV.

5.7.3 PRECISÃO

A precisão é a expressão da conformidade entre resultados analíticos de uma série de medidas de uma mesma amostra. Essa pode ser determinada em condições de: repetibilidade (precisão intra-corrida), na qual deve ocorrer concordância entre os resultados, com o mesmo analista e mesma instrumentação, em um curto período de tempo; e condições reprodutibilidade (precisão inter-corridas), na qual de ocorrer concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes, com dois analistas distintos, em um mesmo laboratório. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

A precisão intra-corrida apresentou um desvio padrão de 1,04 % (Tabela 7), demonstrando assim concordância entre os resultados com o mesmo analista e mesma instrumentação, em um curto período de tempo.

A precisão inter-corridas apresentou um desvio padrão relativo de 1,15 % (Tabela 7) para o segundo analista. Foi realizado o teste de F entre os dois analistas (Tabela 8). O $F_{cal} 1,32 < F_{tab} 4,28$ e $P_{valor} > 0,05$, demonstrou assim que não houve diferença significativa entre os valores de áreas encontrados pelos diferentes analistas.

Tabela 7. Valores das áreas referentes ao pico de AF no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.

50 µg.mL ⁻¹	Áreas							Média	DPR (%)
	1	2	3	4	5	6	7		
Analista 1	2155,5	2238,0	2205,1	2160,0	2170,0	2146,0	2199,4	2182,00	1,04
Analista 2	2163,3	2214,6	2240,2	2199,4	2201,0	2239,7	2178,7	2205,27	1,15

DPR – Desvio padrão relativo.

Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 8. Teste F da precisão interanalista do método de CLAE

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Média	2182	2205,271429
Variância	1099,77	835,452381
Observações	7	7
gl	6	6
F	1,316376642	
P(F<=f) uni-caudal	0,373537391	
F crítico uni-caudal	4,283865714	

Fonte: elaborado pela autora.

5.7.4 EXATIDÃO

A exatidão de um método analítico expressa a concordância entre os resultados obtidos e o valor aceito como verdadeiro ou aceito como referência (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

Foi realizado o ensaio de recuperação, através da adição de padrão, em três níveis de concentrações 80% (R1), 100% (R2) e 120% (R3), 40, 50 e 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. A Tabela 9 mostra os valores obtidos no teste de recuperação para o AF presente na emulsão.

Tabela 9. Valores obtidos no teste de recuperação do AF na emulsão utilizando o método por CLAE.

	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)	DPR (%)
R1	40	40,67782246	101,6945562	101,4676223	0,005650749
R2	50	50,41217892	100,8243578		
R3	60	61,13037181	101,883953		

DPR – Desvio padrão relativo.

Fonte: elaborado pela autora.

De acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que o método é exato, uma vez que a recuperação média do AF presente na emulsão foi de 101,47% e apresentou um desvio padrão relativo de 0,006% menor que 5%, mostrando assim proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados (BRASIL, 2003).

5.7.5 ROBUSTEZ

É a medida da capacidade de um método de resistir a pequenas variações, deliberadamente introduzidas nos parâmetros do método (BRASIL, 2017; LANÇAS, 2016).

A robustez foi avaliada por meio de alterações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. Foi injetada a solução padrão de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no cromatógrafo e as seguintes variáveis foram alteradas: comprimento de onda, vazão, proporção da FM e fabricante do etanol grau CLAE utilizado. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos.

Tabela 10. Dados obtidos para a análise de robustez do método analítico estabelecido.

Condição	Faixa investigada	AF (%)	DPR(%)
Comprimento de onda (nm)	318	96,14	2,1563
	320	100,00	
	322	99,60	
Vazão (mL.min^{-1})	0,61	100,71	2,0280
	0,65	100,00	
	0,69	96,93	
Proporção FM (Etanol: Solução ácido acético 2%)	73:27	98,67	0,9943
	70:30	100,00	
	33:67	98,08	
Fabricante do etanol	PanReac®	100,00	2,3374
	JT Baker®	103,36	

DPR – Desvio padrão relativo.

Fonte: Elaborado pela autora.

Os valores obtidos apresentaram valores de desvio padrão relativo menores que 5% (BRASIL, 2003). Isso demonstra que o método é robusto, visto que as pequenas alterações nas condições cromatográficas não provocaram variações significativas nos resultados obtidos.

5.7.6 LIMITE DE DETECÇÃO

O LD teórico foi calculado de acordo com a Equação 5, apresentada na metodologia, através dos valores apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Informações para o cálculo dos limites de detecção e quantificação teóricos.

	Intercepção com eixo y	Inclinação Curva Analítica (IC)
Curva 1	-95,66286	46,36029
Curva 2	-200,14283	42,77424
Curva 3	-151,73244	43,29739
Média	-149,1793767	44,14397333
DPa	52,28675389	1,937128327

DPa= Desvio Padrão

Fonte: elaborado pela autora.

O valor de LD calculado foi de $3,55 \mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, o LD também foi obtido experimentalmente, fazendo diluições de uma solução estoque de AF $50\mu\text{g.mL}^{-1}$. Segundo Lanças (2016), o LD experimental é três vezes maior que o ruído do sistema, desse modo o valor obtido foi de $0,075 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Sendo assim, experimentalmente, o método é capaz de detectar em uma concentração menor que teoricamente.

5.7.7 LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

O LQ teórico foi calculado de acordo com a Equação 6, apresentada na metodologia, através dos valores apresentados na Tabela 11. O valor de LQ calculado foi de $11,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

O LQ também foi obtido experimentalmente, injetando baixas concentrações da solução padrão de AF, até se encontrar a menor concentração de AF que o método era capaz de quantificar. O valor experimental foi de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Tabela 12 apresenta a área, média e desvio padrão relativo para a triplicata do LQ determinado experimentalmente.

Tabela 12. Limite de quantificação calculado experimentalmente.

Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Área	Média	DPR(%)
0,5	20,4	20,467	0,28
0,5	20,5		
0,5	20,5		

DPR – Desvio padrão relativo.

Fonte: elaborado pela autora.

Na Figura 38, encontra-se a curva analítica obtida na linearidade, acrescida das concentrações utilizadas para encontrar o LQ experimentalmente: 0,5, 1, 2,5, 5, 10 e $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

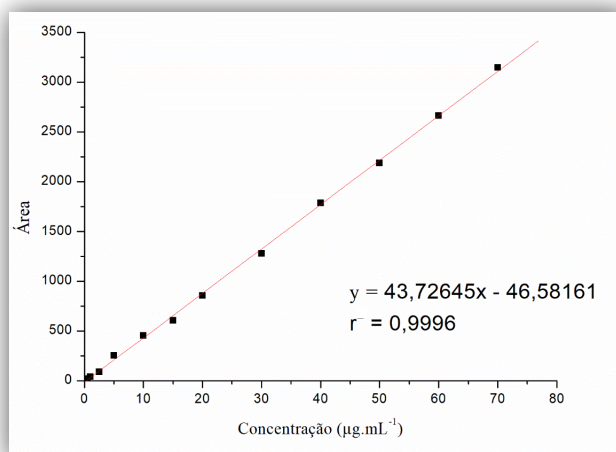


Figura 38. Curva da analítica acrescida das concentrações próximas ao limite de quantificação.

Fonte: elaborado pela autora

Observa-se que o coeficiente de correlação (r) da curva obtida foi acima de 0,99. Pode-se observar também, na Figura 38, que o valor obtido do coeficiente de correlação ficou muito próximo ao obtido na análise de linearidade demonstrada na Figura 31, indicando que as concentrações que foram incluídas ainda respondem linearmente na obtenção das áreas.

Neste ensaio, foi possível concluir que experimentalmente, o método é capaz quantificar em uma concentração menor do que o cálculo teórico.

5.8 ESTUDO DE ESTABILIDADE DA EMULSÃO CONTENDO AF

5.8.1 TESTE DE CENTRIFUGAÇÃO

O teste de centrifugação na amostra serve para simular um aumento na força de gravidade. Assim é possível aumentar a mobilidade das partículas e antecipar possíveis instabilidades (BRASIL, 2004).

As amostras, em todas as condições de temperatura, foram submetidas ao teste de centrifugação, no entanto, em nenhuma delas ocorreu separação das fases, indicando assim que não houve instabilidade em relação a este parâmetro.

5.8.2 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Foi realizada avaliação microscópica, com aumento de 40x, com a finalidade de observar o comportamento da emulsão nas condições testadas. Uma pequena quantidade das formulações foi colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas com auxílio de microscópio. Inicialmente a análise foi realizada para a

emulsão base (Figura 39 a) e para a emulsão contendo 1% do AF tempo 0 da estabilidade (Figura 39 b).

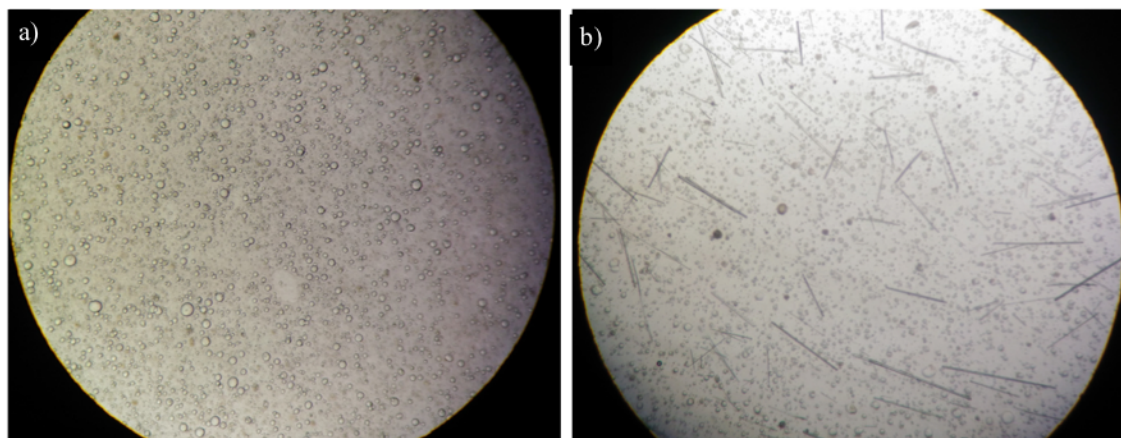


Figura 39. Avaliação microscópica das a) emulsão base e b) da emulsão contendo 1% do AF em tempo 0 dias.

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

É possível notar na Figura 39 b) que na emulsão há presença do ativo AF na forma de cristais em agulha, algo que não era esperado a princípio. Também foi realizada a avaliação no microscópio com luz polarizada para a amostra da emulsão no tempo 0. Nesta análise (Figura 40) foi possível observar que os cristais apresentam tamanhos variados 62,5 μm , 75 μm , 125 μm e 162,5 μm .

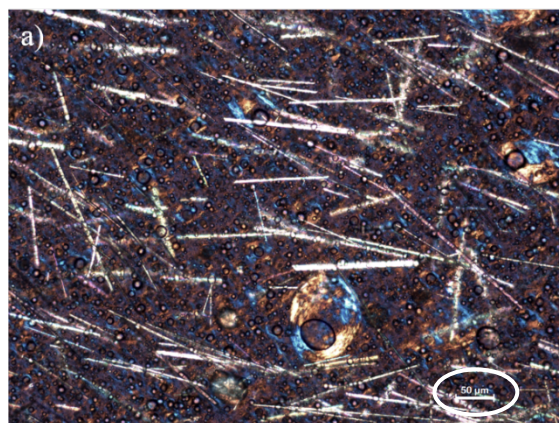


Figura 40. Avaliação microscópica da emulsão com luz polarizada com a) 10x de aumento.

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

A primeira questão levantada, sobre a formação dos cristais, foi o modo de inclusão do AF durante o preparo da emulsão. Então foi preparada uma nova emulsão, em duas fases (aquosa e graxa), adicionando o AF na fase graxa e depois vertendo a

fase aquosa sobre essa. Entretanto, o comportamento do ativo em cristais em agulha se manteve.

Uma segunda questão levantada foi a de que o AF não teve adequada solubilidade na emulsão. Com isso, foram realizados testes de solubilidade do AF em diferentes solventes e possíveis componentes para a emulsão. Empregou-se neste teste o estearato de octila, o miristato de isopropila, o triglicerídeos do ácido cáprico/ caprílico, o caprilil carbonato, o estearato de butila, o palmitato de isopropila e o etoxidiglicol. Este último foi selecionado devido a sua alta capacidade solvente para uma vasta gama de fármacos e ativos farmacêuticos.

Porém, as emulsões preparadas com os diversos solventes testados anteriormente apresentaram os cristais do mesmo modo que a primeira emulsão.

Sendo assim, o estudo de estabilidade foi realizado para a primeira emulsão com o objetivo de observar a influência que estes poderiam exercer sobre a estabilidade acelerada ao longo dos 90 dias de estudo.

As Figuras 41 a 45 apresentam as imagens da avaliação em microscópio após 15 dias, 30 dias, 60 dias, 90 dias e ciclo congelamento/descongelamento, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas nas diferentes temperaturas testadas, 5°C, 25° C, 40° C e -5° C/25° C.

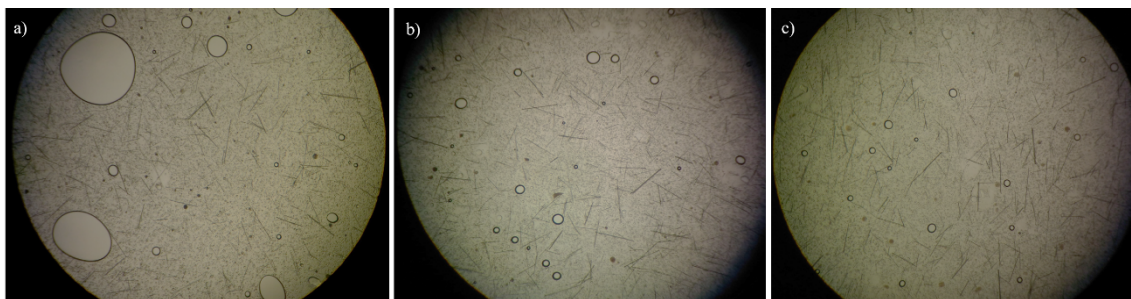


Figura 41. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 15 dias de análise.

Fonte: Fotografia obtida pela autora.



Figura 42. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 30 dias de análise.

Fonte: Fotografia obtida pela autora.

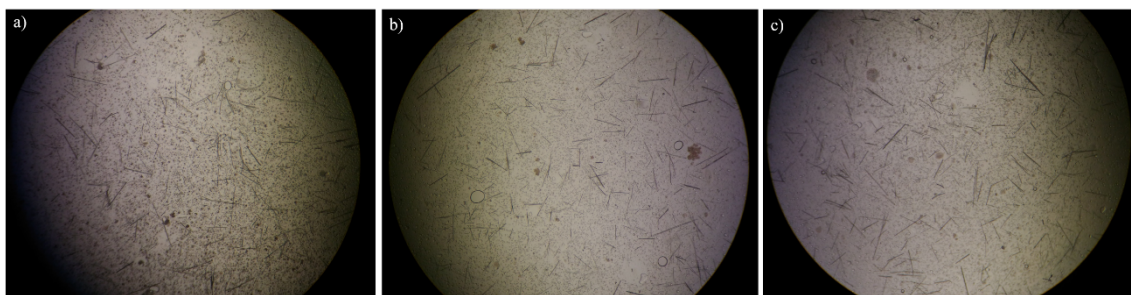


Figura 43. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 60 dias de análise.
Fonte: Fotografia obtida pela autora.

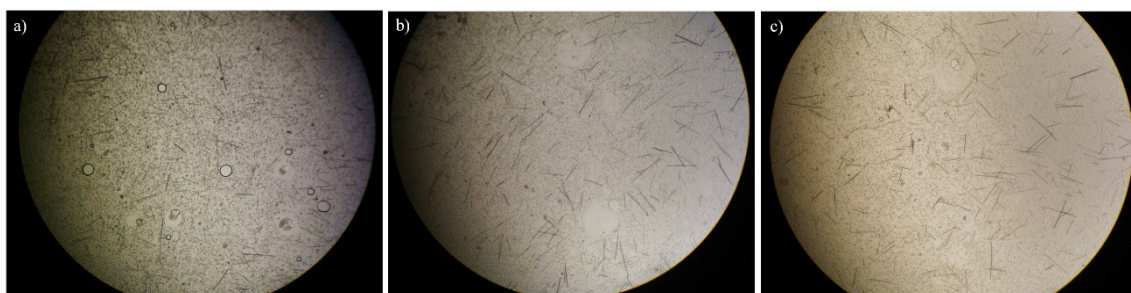


Figura 44. Avaliação microscópica da emulsão em a) 5° C, b) 25° C e c) 40° C após 90 dias de análise.
Fonte: Fotografia obtida pela autora.

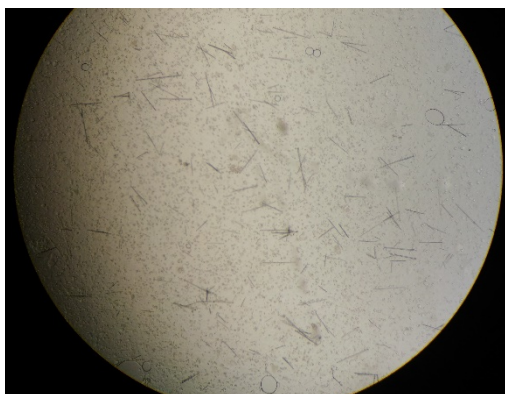


Figura 45. Avaliação microscópica da emulsão no ciclo congelamento/descongelamento.
Fonte: Fotografia obtida pela autora.

5.8.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Todas as amostras foram avaliadas macroscopicamente periodicamente durante os 90 dias do teste de estabilidade acelerada. A formulação testada se manteve inalterada nas diferentes temperaturas testadas ao longo dos 90 dias.

5.8.4 DETERMINAÇÃO DO pH

Ao longo dos 90 dias de estudo e no ciclo congelamento/descongelamento, foram observadas pequenas variações não significativas de pH da emulsão contendo 1% de AF, conforme pode ser observado na Figura 46.

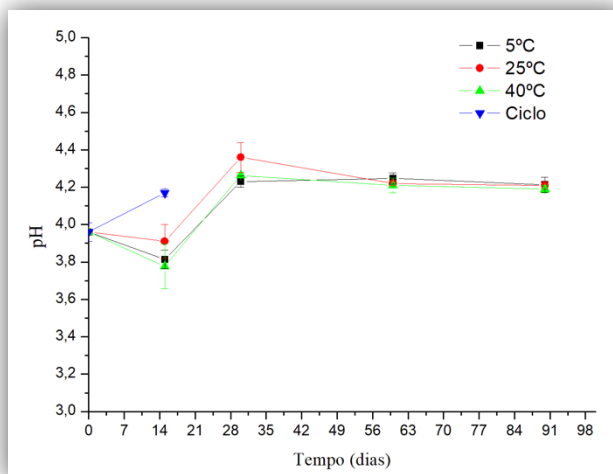


Figura 46. Gráfico dos valores de pH da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota-se que nas condições de estresse o pH aumentou 0,3 em relação ao tempo 0. Também foi medido o pH da emulsão base e o valor foi de 7,30. Isto indica que houve uma diferença significativa em relação ao pH da emulsão e da sua base ($7,30 \pm 3,1$), mas essa diferença era esperada devido a incorporação de um ácido na formulação.

5.8.5 DETERMINAÇÃO DA VISCOSIDADE

A Figura 47 mostra o comportamento da viscosidade das amostras e os desvios padrões ao longo dos 90 dias de estudo e no ciclo congelamento/descongelamento.

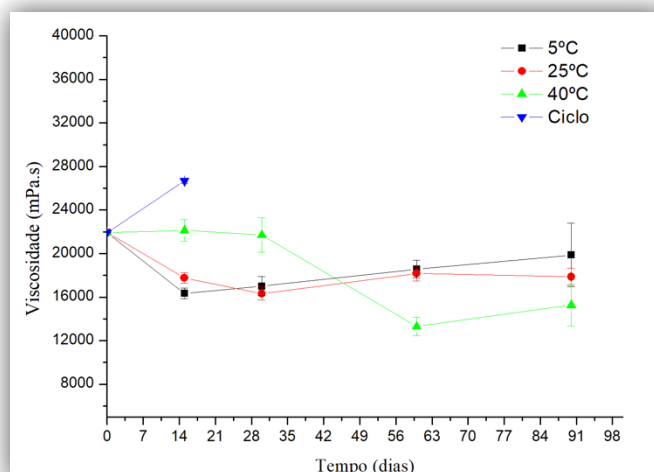


Figura 47. Gráfico dos valores de viscosidade da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.

Fonte: Elaborado pela autora.

É possível notar que no ciclo de congelamento/descongelamento, houve um aumento na viscosidade. Já as condições de temperatura de 5° C e 25° C apresentaram comportamentos parecidos de viscosidade, onde inicialmente houve uma queda e depois a viscosidade voltou a aumentar.

A condição na qual as amostras ficaram na temperatura de 40° C apresentou uma queda na viscosidade após 60 dias de estresse.

5.8.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE AF

No estudo de estabilidade, também foi avaliado o teor de AF ao longo dos 90 dias. A Figura 48 apresenta as concentrações das amostras ao longo do estudo de estabilidade com os desvios padrões. Para análise do teor de ativo, em cada tempo estabelecido, foram pesados 0,25g da emulsão contendo 1% de AF, o que corresponde a 500 µg de AF que foram diluídos em 50 mL de etanol, desse modo a concentração teórica de AF nesta solução foi correspondente a 50 µg.mL⁻¹.

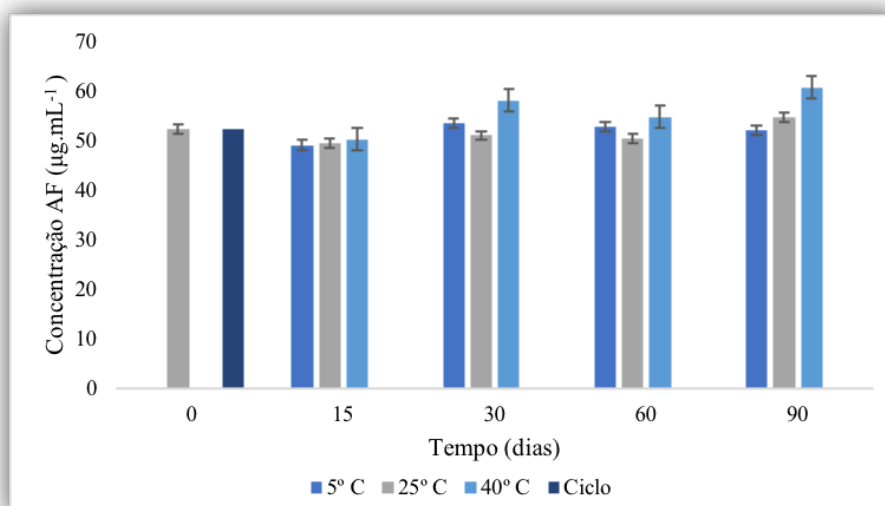


Figura 48. Gráfico das concentrações experimentais ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) da emulsão com o AF nas condições de 5° C, 25° C, 40° C e 3 ciclos de congelamento/descongelamento durante 90 dias de análise.

Fonte: Elaborado pela autora.

É possível observar que a amostra submetida a condição de estresse de 40° C teve um aumento significativo na concentração, isso pode ser em decorrência da evaporação de água durante o estudo por conta da elevada temperatura. As demais condições apresentaram variações menos significativas.

5.9 ESTUDOS DE LIBERAÇÃO, PERMEAÇÃO E RETENÇÃO CUTÂNEA *IN VITRO*

5.9.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO *IN VITRO* DO AF

Para a realização dos estudos de liberação do AF, incorporado na emulsão, a fase receptora foi coletada das células de Franz e, em seguida, submetida à análise de quantificação por CLAE. A partir dos resultados obtidos, a concentração do AF foi calculada.

Foram aplicados três modelos matemáticos para a avaliação do perfil cinético de liberação do ativo das formulações: zero ordem, primeira ordem e modelo de Higuchi.

Segundo Spagnol (2014), o modelo de zero ordem descreve a relação entre a quantidade de ativo liberado *versus* o tempo. O modelo de primeira ordem representa o logaritmo da concentração de ativo liberado *versus* o tempo e o modelo de Higuchi descreve a quantidade de ativo liberado *versus* a raiz quadrada do tempo.

O modelo mais satisfatório foi o que apresentou o coeficiente de correlação (r) mais próximo de 1, o que indica melhor linearidade. Os valores do coeficiente de correlação linear em cada modelo matemático estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13. Valores do coeficiente de correlação linear em cada modelo matemático.

	r
Zero ordem	0,9773
Primeira ordem	0,9131
Modelo de Higuchi	0,9978

Fonte: Elaborado pela autora.

A variação do r entre 0 e 1, segundo Bolina (2013), indica o quanto o modelo consegue explicar os valores obtidos. Desse modo, quanto maior o r , mais explicativo é o modelo, melhor o ajuste do mesmo à amostra. De acordo com a Tabela 13 e a Figura 49, a formulação contendo o AF segue o modelo de liberação de Higuchi, que, segundo Monteiro e colaboradores (2007), descreve a liberação de ativos por um processo de difusão.

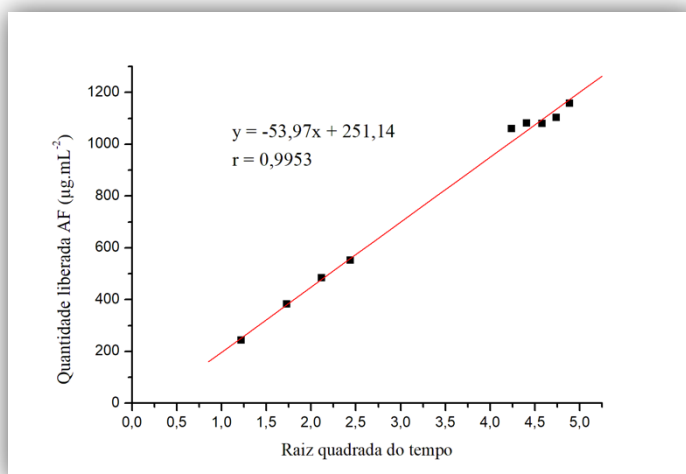


Figura 49. Perfil de liberação do AF de acordo com o Modelo de Higuchi.

Fonte: Elaborado pela autora.

Modelos para a liberação de fármacos hidrossolúveis e pouco solúveis incorporados em matrizes semi-sólidas e/ou sólidas foram desenvolvidos teoricamente por Takeru Higuchi (HIGUCHI, 1961; HIGUCHI, 1963). De modo geral, podemos resumir o modelo de Higuchi à Equação 9:

$$f_t = K_H t^{1/2} \quad \text{Equação 9}$$

Sendo K_H a constante de liberação de Higuchi, que “descreve assim, a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo” (KASBAUM, 2010, p.53).

5.9.2 AVALIAÇÃO DA PERMEAÇÃO *IN VITRO* DO AF

Este tipo de avaliação pode ser realizada para produtos cosméticos destinados a atingir a camada córnea, a epiderme e, de preferência, a derme, mas não é desejável que os produtos cosméticos alcancem os vasos sanguíneos em concentrações significativas para causar efeitos sistêmicos (SPAGNOL, 2018).

Os estudos *in vitro*, são úteis para avaliar parâmetros físico-químicos tais como o coeficiente de partição, o fluxo e coeficiente de difusão dos fármacos (BARRY, 1983). Os valores de fluxo do AF através da epiderme (J) e o tempo de latência (Tl), os quais foram obtidos através da inclinação da reta do gráfico apresentado na Figura 50, estão apresentados na tabela 14. Para sistemas de liberação imediata calcula-se o coeficiente de permeabilidade (Kp) e devido o veículo utilizado ser uma emulsão, não foi calculado.

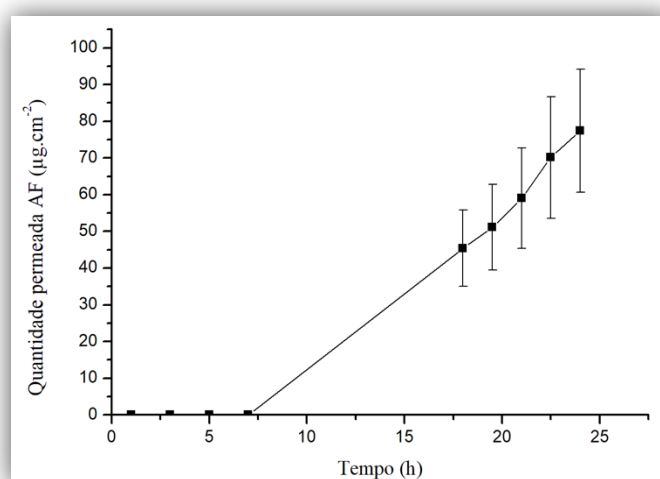


Figura 50. Perfil de permeação (média ± desvio padrão) do AF através da epiderme.

Fonte: Elaborado pela autora.

Tabela 14. Parâmetros cinéticos de permeação epidérmica do AF.

	J (µg.cm ⁻² .h ⁻¹)	Tl (h)
AF	2,30 ± 0,51	5,41 ± 0,31

J: Fluxo do permeante através da epiderme; Tl: tempo de latência;

Fonte: Elaborado pela autora.

A técnica de separação de calor usada para preparar as peles usadas neste experimento fornece separação entre as camadas da epiderme e da derme, uma vez que o calor rompe as ligações que os mantêm unidos e é por isso que eles podem ser facilmente separados. Supõe-se que, quando a substância atravessa o estrato córneo, ele pode se espalhar para as camadas viáveis mais profundas e, em seguida, para o sangue. Desse modo, quando uma concentração é atingida em todas as camadas da pele, ela para de permear.

De acordo com a Figura 50, nota-se que até as primeiras 6h de experimento não houve permeação do AF e as quantidades obtidas a partir de 18h são baixas. Estes resultados confirmam que o AF na concentração de 1% no sistema emulsionado apresentou um valor de permeação bem abaixo da concentração tóxica para as células e capaz de exercer atividade antioxidante.

5.9.3 AVALIAÇÃO DA RETENÇÃO *IN VITRO*

5.9.3.1 TAPE STRIPPING

Os resultados do experimento foram explorados considerando a quantidade do AF presente em cada tira. O experimento foi realizado em triplicata.

As concentrações do AF foram obtidas através de uma curva de linearidade do método analítico, na qual a solução receptora foi utilizada como solvente para o preparo das amostras.

A Tabela 15 apresenta as concentrações encontradas, na triplicata do ensaio, no estrato córneo (T₁-T₂₀) e na epiderme e derme.

Tabela 15. Retenção da pele com a emulsão contendo AF.

Tape		Concentração de AF ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)		
		Pele 1	Pele 2	Pele 3
Estrato córneo	T ₁	13,13	9,24	6,94
	T ₂	4,08	1,83	2,06
	T ₃₋₅	2,78	1,27	1,37
	T ₆₋₁₀	1,71	1,49	1,81
	T ₁₁₋₁₅	0,83	0,55	0,21
	T ₁₆₋₂₀	0,77	0,13	0,13
Epiderme e derme		3,37	3,15	5,85

T= tiras

Fonte: Elaborado pela autora.

As primeiras tiras (T₁) apresentaram maiores concentrações do AF pelo fato de na superfície haver um excesso de formulação, que é difícil de ser completamente removido sem danificar a pele. Desse modo, a partir das tiras T₂ valores reais são quantificados nas camadas, pois não há mais um excesso de formulação. É possível

notar que a concentração do ativo diminuiu de acordo com o aumento da profundidade do estrato córneo aumentou.

A Figura 51 apresenta a somatória das concentrações do AF encontradas no estrato córneo e na epiderme/derme. Nota-se que no Estrato córneo há uma concentração do ativo quatro vezes maior do que na Epiderme/Derme, onde se espera ação do ativo.

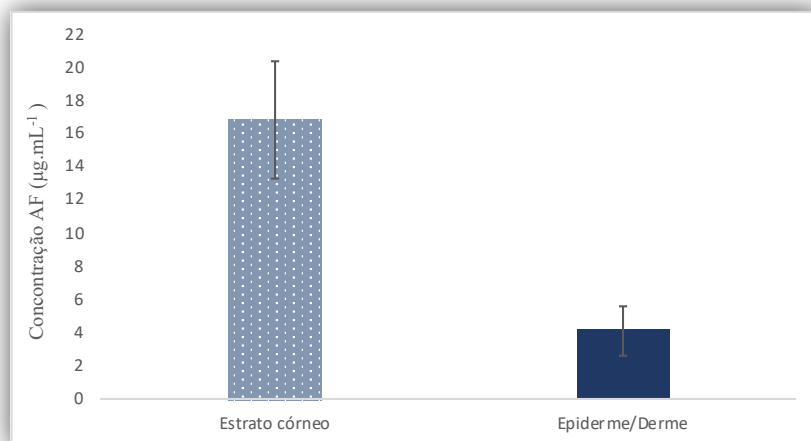


Figura 51. Concentração da retenção cutânea do AF no Estrato córneo e na Epiderme/derme.

Fonte: Elaborado pela autora.

Além das tiras e da pele, foram extraídas e quantificadas as concentrações de ativo presente em todo material que esteve em contato com a emulsão durante o experimento (algodão, luva, alumínio e etc.) e também, o próprio excesso de formulação retirado antes da aplicação da primeira fita. Os valores obtidos representaram cerca de 83% da concentração presente na amostra inicial.

A partir dos valores de concentração encontrados no *tape stripping* (Figura 51) é possível compará-los com os resultados anteriormente obtidos neste trabalho, conforme apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Resumo das atividades realizadas no trabalho.

		IC ₅₀	CIM
Atividade Antioxidante	Inibição radical DPPH	12,21 μg.mL ⁻¹	---
	Inibição radical ABTS	2,84 μg.mL ⁻¹	---
Atividade despigmentante	Inibição enzima tirosinase	2890 μg.mL ⁻¹	---
Atividade antimicrobiana	<i>E. coli</i>	---	1500 μg.mL ⁻¹
	<i>S. aureus</i>	---	1500 μg.mL ⁻¹
	<i>P. aeruginosa</i>	---	1500 μg.mL ⁻¹
	<i>S. epidermidis</i>	---	750 μg.mL ⁻¹
Potencial citotóxico	HaCat	1092 μg.mL ⁻¹	---
	HDFa	---	---

Fonte: Elaborado pela autora.

De acordo com os resultados obtidos e representados pela tabela 19, é possível notar que o AF possui potencial para atingir as atividades estudadas neste trabalho, sugerindo ser um promissor ativo multifuncional.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho realizou o estudo de um antioxidante derivado do grupo dos ácidos fenólicos, denominado ácido ferúlico (AF), com a finalidade de investigar sua multifuncionalidade para a aplicação em cosméticos destinados ao tratamento da pele.

O AF apresentou atividade antioxidante, podendo atuar em cosméticos antienvelhecimento, e também apresentou atividade despigmentante, podendo atuar em cosméticos para o clareamento de manchas da pele. Porém são necessárias concentrações superiores para manter as mesmas atividades que o ácido ascórbico (AA) que é muito utilizado no setor de cosméticos devido a sua multifuncionalidade. Em contrapartida, o AA possui instabilidade química na presença de luz sendo que no AF não foi observado tal instabilidade na presença de luz. Esta característica do AF traz uma grande vantagem na sua utilização mesmo que sejam necessárias maiores concentrações.

Em relação à atividade antimicrobiana, o AF possui grande potencialidade, pois foram necessárias pequenas concentrações para inibir o crescimento das bactérias *E.coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis* testadas neste trabalho, podendo auxiliar na conservação do produto cosmético.

Nos estudos de citotoxicidade *in vitro* realizados com as células HaCat e HDFa, verificou-se que o AF não possui toxicidade significativa nas concentrações utilizadas neste trabalho, podendo apresentar grande margem de segurança na aplicação em cosméticos.

Para a quantificação nos estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, foi desenvolvida uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a qual foi validada assegurando todos os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez estabelecidos.

As emulsões desenvolvidas neste trabalho apresentaram aparência branca, sensorial agradável, alta espalhabilidade, alta emoliência e secagem rápida. O estudo de estabilidade acelerada da emulsão contendo 1% de AF, conduzido por 90 dias com exposição às diversas condições de estresse, se manteve estável, apesar da presença de cristais na avaliação microscópica. Desse modo, este produto atende as exigências para comercialização.

De acordo com os dados obtidos pelo ensaio de liberação, pode-se concluir que a formulação usada é capaz de liberar o AF nela incorporado, permitindo que haja o

contato do mesmo com a pele e, assim, ocorra disponibilidade à penetração na superfície cutânea.

No estudo de *tape stripping*, observou-se a baixa permeação do ativo proposto, sendo possível observar que grande parte do ativo permeado se encontra no estrato córneo e que a concentração quantificada na derme e epiderme foi baixa.

Diante do exposto, é possível notar que o AF possui multifunções e, possivelmente, pode ser utilizado como ativo em produtos cosméticos com esta finalidade, contribuindo assim para o crescente mercado *skin care*, no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABDI. Agência brasileira de desenvolvimento industrial; ABIHPEC. Associação brasileira da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos; SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. **Caderno de tendências 2014-2015: Higiene Pessoal-Perfumaria-Cosméticos**. São Paulo, 2013. Cap. 5, 6, 7, p. 52-175. Disponível em: <https://www.abihpec.org.br/ABIHPEC_Caderno_de_Tendencias_2014_2015.pdf> Acesso em: 15 abr. 2019.
- ABIHPEC. **Aumenta procura por produtos para pele**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<https://www.abihpec.org.br/2014/05/abihpec-aumenta-procura-por-produtos-para-pele/>>. Acesso em: 15 abr. 2019.
- ABIHPEC. **Panorama do Setor de HPPC 2018**. São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://abihpec.org.br/publicacao/panorama-do-setor-2018/>>. Acesso em: 15 out. 2018.
- ALMEIDA, M. G. J. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- ALMEIDA, M. G. J.; CHIARI, B. G.; CORRÊA, M. A.; CHUNG, M. 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.
- ANDREASEN, M. F.; CHRISTENSEN, L. P.; MEYER, A. S.; HANSEN, A. Ferulic acid dehydrodimers in rye (*Secale cereale* L.). **J Cereal Sci.** v. 31, p. 303–307, 2000.
- AWIKA, J. M.; ROONEY, L. W.; WU, X.; PRIOR, R. L.; Cisneros-Zevallos, L. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum products. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p. 6657-6662, 2003.
- BARBEROUSSE, H.; ROISEUX, O.; ROBERT, C.; PAQUOT, M.; DEROANNE, C.; BLECKER, C. Analytical methodologies for quantification of ferulic acid and its oligomers. **J Sci Food Agric.** v. 88, p. 1494–1511, 2008.
- BARRY, B.W. Dermatological Formulations: Percutaneous absorption. England: Marcel Dekker, INC, p.1-233, 351-407, 1983.
- BENSON, H. A. E.; ROBERTS, M. S.; LEITE-SILVA, V. R.; WALTERS, K. A. **Cosmetic formulation: Principles and Practice**. Florida: CRC Press, 2019.

- BOLINA, C. C. **Estudo numérico-experimental para proposição de modelo biodinâmico do corpo humano submetido a vibrações**. 2013. 227 f. Tese (Doutorado em Estruturas e Construção Civil) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- BORGES, A.; FERREIRA, C.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. **Microb Drug Resist.** v. 19, n. 4, p. 256–265, 2013.
- BORGES, A.; SAAVEDRA, M. J.; SIMÕES, M. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. **Biofouling.** v. 28, n. 7, p. 755–767, 2012.
- BOTEGA, D. C. Z. **Desenvolvimento de organogéis para aplicação em emulsões a frio para produtos cosméticos**. 2018. 206 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2018
- BOURNE, L. C.; RICE-EVANS, C. A. The effect of the phenolic antioxidant ferulic acid on the oxidation of low density lipoprotein depends on the pro-oxidant used. **Free Radic Res.** v. 27, n. 3, p. 337–344, 1997.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Sci Technol.** v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, De 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm> Acesso em: 16 abr. 2019.
- BROINIZI, P. R. B. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciênc Tecnol Aliment.** v. 27, n. 4, p. 902–908, 2007.
- BRUGGINSSER, R. et. al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, p. 445-448, 2002.
- CADWALLAGER, D. E. Stability testing. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.104, n.11, p.87-102, 1989

- CASTELLUCCIO, C.; BOLWELL, G. P.; GERRISH, C.; RICE-EVANS, C. A. Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as antioxidant. **Biochem J.** v. 316, p. 691–694, 1996.
- CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; DE PAULI-CREDENDIO, P. A.; SYLOS, C. M.; VILEGAS, W.; CORRÊA, 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. 331336, 2012.
- CHOI, J. H.; PARK, J. K.; KIM, K. M.; LEE, H. J.; KIM, S. J. In vitro and in vivo antithrombotic and cytotoxicity effects of ferulic acid. **Biochem Mol Toxicol.** 2018;32:1–9.
- CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R.; SALGADO, H. R. N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev. Bras. Farm.** v. 88, n. 3, 2007.
- CHOWDHURY, S.; GHOSH, S.; RASHID, K.; SIL, P. C. Deciphering the role of ferulic acid against streptozotocin-induced cellular stress in the cardiac tissue of diabetic rats. **Food Chem Toxicol.** v. 97, p. 187–198, 2016.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards-6 th ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.
- CLSI. **Manual Clinical and Laboratory Standards Institute.** Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standards-6 th ed. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement M100-S16 (tab 2J). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.
- CORRÊA, M. A. **Cosmetologia: Ciência e Técnica.** São Paulo: Editora Medfarma, 2019.
- COTA-ARRIOLA, O.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; LIZARDI-MENDOZA, J.; ROBLES-SÁNCHEZ, R. M.; EZQUERRA-BRAUER, J. M.; RUÍZ-GARCÍA, J.; VEGA-ACOSTA, J. R.; CORTEZ-ROCHA, M. O. Preparation of chitosan matrices with ferulic acid: physicochemical characterization and relationship on the growth of *Aspergillus parasiticus*. **Cyta J Food.** v. 15, n. 1, p. 65–74, 2017.

- CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols; structure-activity relationship. **Biosci Biotechnol Biochem.** v. 56, n. 2, p. 324–235, 1992.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Antioxidants properties of phenolic compounds. **Visão Acadêmica.** v. 5, n. 1, p. 33–40, 2004.
- EGAWA, M.; ISHIDA, K.; MAEKAWA, M.; SATO, Y. Skin preparations containing antioxidants and ellagic acids. **Japan Kokai.** v. 89, p. 501–518, 1990.
- FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FLORES, N.; SIRÉS, I.; GARRIDO, J. A.; CENTELLAS, F.; RODRÍGUEZ, R. M.; CABOT, P. L.; BRILLAS, E. Degradation of trans-ferulic acid in acidic aqueous medium by anodic oxidation, electro-Fenton and photoelectro-Fenton. **J Hazard Mater.** v. 319, p. 3–12, 2016.
- FU, L.; LU, W. Q.; ZHOU, X. M. Phenolic compounds and in vitro antibacterial and antioxidant activities of three tropic fruits: persimmon, guava, and sweetsop. **Biomed Res Int.** v. 2016, p. 1–9, 2016.
- FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.
- GAŁUSZKA, A.; KONIECZKA, P.; MIGASZEWSKI, Z. M.; NAMIESNIK, J. Analytical eco-scale for assessing the greenness of analytical procedures. **Trends Analyt Chem.** v. 37, p. 61–62, 2012.
- GARCIA-JIMENEZ, A. TERUEL-PUCHE, J. A.; ORTIZ-RUIZ, C. V.; BERNA, J.; TUDELA, J.; GARCIA-CANOVAS, F. 4-n-Butylresorcinol, a Depigmenting Agent used in Cosmetics, Reacts with Tyrosinase. **UBMB Life.**, v. 68, n.8, p.663-672, 2016;
- GIADA, M. L. R.; MANCINI FILHO, J. Importância dos compostos fenólicos na dieta na promoção da saúde humana. **Publ. UEPG Ci Biol Saúde.** v. 12, n. 4, p. 7–15, 2006;
- GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radic Biol Med.** v. 13, p. 435–448, 1992.
- GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.
- HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci.**

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012. 900 p.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 411-413, 1999.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs in solid matrices. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 52, p. 1145-1149, 1963.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **J. Pharm. Sci.**, New York, v. 50, p. 874-875, 1961.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; IGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

HUANG, X.; SU, S.; CUI, W.; LIU, P.; DUAN, J.; GUO, J.; LI, Z.; SHANG, E.; QIAN, D.; HUANG, Z. Simultaneous determination of paeoniflorin, albiflorin, ferulic acid, tetrahydropalmatine, protopine, typhaneoside, senkyunolide I in Beagle dogs plasma by UPLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study after Oral Administration of Shaofu Zhuyu Decoction. **J Chromatogr B**. v. 962, p. 75–81, 2014.

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.

KASBAUM, F. E. **Desenvolvimento de comprimidos de liberação prolongada contendo dapsona para tratamento da hanseníase**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica, Goiás, 2010.

KHATKAR, A.; NANDA, A.; KUMAR, P.; NARASIMHAN, B. Synthesis and antimicrobial evaluation of ferulic acid derivatives. **Res Chem Intermed**. v. 41, n. 1, p. 299–309, 2015.

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

- KIKUZAKI, H.; HISAMORO, M.; HIROSE, K.; AKIYAMA, K.; TANIGUCHI, H. Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. **J Agric Food Chem.** v. 50, p. 2161–2168, 2002.
- KROON, P. A.; FAULDS, C. B.; RYDEN, P.; ROBERTSON, J. A.; WILLIAMSON, G. Release of covalently bound ferulic acid from fiber in the human colon. **J Agric Food Chem.** v. 45, p. 661–667, 1997.
- LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna: HPLC / CLAE**. 2. ed. Campinas: Átomo, 2016.
- LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFER, A. E. M. F.; RIETJENS, I. M. C. M. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biol. Med.**, v.31, p.869-881, 2001.
- LI, X.; LI, X.; WANG, L.; LI, Y.; XU, Y.; XUE, M. Simultaneous determination of danshensu, ferulic acid, cryptotanshinone and tanshinone IIA in rabbit plasma by HPLC and their pharmacokinetic application in danxiongfang. **J Pharm Biomed Anal.** v. 44, p. 1106–1112, 2007.
- LI, Y.; BI, K. HPLC determination of ferulic acid in rat plasma after oral administration of Rhizoma Chuanxiong and its compound preparation. **Biomed Chromatogr.** v. 17, p. 543–546, 2003.
- LU, G.; CHAN, K.; LEUNG, K.; CHAN, C.; ZHAO, Z.; JIANG, Z. Assay of free ferulic acid and total ferulic acid for quality assessment of *Angelica sinensis*. **J Chromatogr A.** v. 1068, p. 209–219, 2005.
- 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.
- MARCO, B. A.; NATORI, J. S. H.; FANELLI, S.; TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Characteristics, properties and analytical methods of amoxicillin: a review with green approach. **Crit Rev Anal Chem.** 2017;47(3):267–277.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **Fat Sci Technol.** v. 94, n. 11, p. 428–432, 1992.

- 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.
- MARUF, A. A.; LIP, H. Y.; WONG, H.; O'BRIEN, P. J. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. **Chem Biol Interact.** v. 234, p. 96–104, 2015.
- MATHEW, S.; ABRAHAM, E. T. Ferulic acid: An antioxidant found naturally in plant cell walls and feruloyl esterases involved in its release and their applications. **Crit Rev Biotechnol.** v. 24, n. 2-3, p. 59–83, 2004.
- MELERO, A.; GARRIGUES, T.M.; ALO's, M.; KOSTKA, K.H.; LEHR, C.M.; SCHAEFER, U.F. Nortriptyline for smoking cessation: release and human skin diffusion from patches. **Int J Pharm** 378:101–107, 2009.
- MENSOR, L. L. et. al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v.15, p.127–130, 2001.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. 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 liberação cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179–184, 2007.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v.65, p. 55–63, 1983.
- MOTA, F. L. Aqueous solubility of some natural phenolic compounds. **Ind Eng Chem Res.** v. 47, p. 5182–5189, 2008.
- MUHEIM, A.; LERCH, K. Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 51, p. 456–461, 1999.
- NATALEA, A.; NARDIELLOA, D.; PALERMOA, C.; MUSCARELLA, M.; QUINTOA, M.; CENTONZEA, D. Development of an analytical method for the determination of polyphenolic compounds in vegetable origin samples by liquid chromatography and pulsed amperometric detection at a glassy carbon electrode. **J Chromatogr A.** v. 1420, p. 66–73, 2015.

- NAZARÉ, A. C. **Avaliação *in vitro* e *ex vivo* da atividade anti-espécies reativas de oxigênio (EROs) do ácido ferúlico e seus ésteres e seu perfil de liberação em preparações dermatológicas.** 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- NAZARÉ, A. C.; FARIA, C. M.Q.; CHIARI, B. G.; PETRÔNIO, M. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, D. H. S.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B.; FONSECA, L. M.; XIMENES, V. F. Ethyl Ferulate, a Component with Anti-Inflammatory Properties for Emulsion-Based Creams. **Molecules**. v.19, p. 8124-8139, 2014.
- NEWBURGER, S. H. **Newburger's Manual of cosmetic analysis.** Washington : Association of Official Analytical Chemists, 1977, 150 p.
- NILE, S. H.; KO, E. Y.; KIM, D. H.; KEUM, Y. S. Screening of ferulic acid related compounds as inhibitors of xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 with anti-inflammatory activity. **Rev bras farmacogn.** v. 26, p. 50–55, 2016.
- Nutr.** v. 35, n. 1-2, p. 7-20, 1995.
- O'BRIEN, J. et. al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 67, n. 17, p. 5421-5426, 2000.
- O'NEIL, M. J.; et al. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.** Cambridge: RSC Publishing, 2013.
- OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**, n.28, Paris, 2004.
- OGIWARA, T.; SATOH, K.; KADOMA, Y.; MURAKAMI, Y.; UNTEN, S.; ATSUMI, T.; SAKAGAMI, H.; Fujisawa, S. Radical scavenging activity and cytotoxicity of ferulic acid. **Anticancer Res.** v. 22, n. 5, p. 2111–2117, 2002.
- OUIMET, M. A.; GRIFFIN, J.; CARBONE-HOWELL, A. L.; WU, W. H.; STEBBIND, N. D.; DI, R.; UHRICH, K. E. Biodegradable ferulic acid-containing poly(anhydride-ester): degradation products with controlled release and sustained antioxidant activity. **Biomacromolecules**. v. 14, p. 854–861, 2013.
- OYAMA, T. et. al. Discovery of a new type of scaffold for the creation of novel tyrosinase inhibitors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 24, p.4509–4515, 2016;
- PALOMINO, J. C; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for

detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PENG, C. C.; CHYAU, C. C.; WANG, H. E.; CHANG, C. H.; CHEN, K. C.; CHOU, K. Y.; PENG, R. Y. Cytotoxicity of ferulic acid on T24 cell line differentiated by different microenvironments. **Biomed Res Int.** v. 2013, p. 1–7, 2013.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **Int. J. Food Sci. Tech.**, v.43, p.185-191, 2008.

PÓVOA, L.G.; PÓVOA FILHO, H. Radicais livres (Generalidade) In: PÓVOA, H. **Radicaís Livres: em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago, 1995, p.163-182

PubChem. **Ferulic acid**. Disponível em:

<<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/445858#section=Top>> Acesso em : 13 abr. 2019

PUSSAYANAWIN, V.; WETZEL, L.; FULCHER, R. G. Fluorescence Detection and Measurement of Ferulic Acid in Wheat Milling Fractions by Microscopy and HPLC. **J. Agric. Food Chem**, v. 36, p. 515-520, 1988.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim Nova**. v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RAMANAUSKIENĖ, K.; INKĖNIENĖ, A. M. Propolis oil extract: quality analysis and evaluation of its antimicrobial activity. **Nat Prod Res.** v. 25, n. 15, p. 1463–1468, 2011.

SARI, R. **Otimização da extração de compostos fenólicos das Folhas de *Tabernaemontana catharinensis* e avaliação dos marcadores de estresse oxidativo em ratos diabéticos**. 2018. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2018.

SCOTT, B. C.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B.; AROUMA, O. I. Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. **Free Rad Res Comms.** v. 19, n. 4, p. 241–253, 1993.

SHI, C.; ZHANG, X.; SUN, Y.; YANG, M.; SONG, K.; ZHENG, Z.; CHEN, Y.; LIU, X.; JIA, Z.; DONG, R. CUI, L.; XIA, X. Antimicrobial activity of ferulic acid against *Cronobacter sakazakii* and possible mechanism of action. **Foodborne Pathog Dis.** v. 13, n. 4, p. 196–204, 2016.

- SIENIAWSKA, E.; BAJ, T.; LOS, R.; SKALICKA-WOZNIAK, K.; MALM, A.; SIENIAWSKA, K.; Phenolic acids content, antioxidant and antimicrobial activity of *Ligusticum mutellina* L. **Nat Prod Res.** v. 27, n. 12, p. 1108–1110, 2013.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Sacharomyces cerevisiae*. **Rev Bras Cienc Farm.** v. 1, p. 95–100, 2005.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev Nutri.** v. 15, n. 1, p. 71–78, 2002.
- SPAGNOL, C. M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. 2014. 146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.
- SPAGNOL, C. M. **Micropartículas poliméricas biodegradáveis contendo ácido cafeico para aplicação tópica**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2018.
- SPAGNOL, C. M.; ISAAC, V. L. B.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Validation of HPLC–UV Assay of Caffeic Acid in Emulsions. **Journal of Chromatographic Science**, Araraquara, v. 34, n. 3, p. 305–311, Out. 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.
- SRINIVASAN, M.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **J Clin Biochem Nutr.** v. 40, p. 92–100, 2007.
- TÓTOLI, E. G.; SALGADO, H. R. N. Besifloxacin: A critical review of its characteristics, properties, and analytical methods. **Crit Rev Anal Chem.** v. 48, n. 2, p. 132–142, 2018.
- TYRAKOWSKA, B.; SOFFERS, A. E. M. F.; SZYMUSIAK, H.; BOEREN, S.; BOERSMA, M.G.; LEMANSKA, K.; VERVOORT, J.; RIETJEMS, I. M. C. M. TEAC

antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. **Free Radical Biol. Med.**, v.27, p.1427-1436, 1999.

VANZIN, S. B.; CAMARGO, C. P. **Entendendo cosmecêuticos**: diagnósticos e tratamentos. 2. Ed. São Paulo: Santos, 2011. 398p.

VASHISTH, P.; KUMAR, N.; SHARMA, M.; PRUTHI, V. Biomedical applications of ferulic acid encapsulated electrospun nanofibers. **Biotechnol Rep.** v. 8, p. 36–44, 2015.

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.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem.** v. 54, n. 4, p. 377–382, 1995.

YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campus, 1995. 151p.

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

ZIMMERMANN A.; TÓTOLI E. G.; FERNANDES, F. H. A.; SALGADO, H. R. N. An eco-friendly and low-cost method for the quantification of cefazolin sodium in powder for injectable solution using thin-layer chromatography assisted by digital images. **J Planar Chromat.** v. 30, n. 4, p. 285–290, 2017.

ZUPFER, J. M.; CHURCHILL, K. E.; RASMUSSEN, D. C.; FULCHER, R. G. Variation in ferulic acid concentration among diverse barley cultivars measured by HPLC and microspectrophotometry. **J Agric Food Chem.** v. 46, p. 1350–1354, 1998.