



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo da Eficácia e Segurança *in vitro* do ácido
gentísico incorporado em emulsões para
administração cutânea**

Luciano Borges Cunha

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara – SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo da Eficácia e Segurança *in vitro* do ácido
gentísico incorporado em emulsões para
administração cutânea**

Luciano Borges Cunha

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

2023

C972e Cunha, Luciano Borges.
Estudo da eficácia e segurança *in vitro* do ácido genticóico incorporado em emulsões para administração cutânea / Luciano Borges Cunha. – Araraquara: [s.n.], 2023.
167 f. : il.

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

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

1. Ácido genticóico. 2. Emulsão. 3. IVRT. 4. Fluorescência. 5. Atividade antioxidante. 6. DPPH. 7. *Staphylococcus aureus*. 8. *Escherichia coli*. 9. *Candida albicans*. 10. *Cutibacterium acnes*. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo da Eficácia e Segurança in vitro do ácido gentísico objetivando sua aplicação em preparação para administração cutânea

AUTOR: LUCIANO BORGES CUNHA

ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORRÊA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORRÊA (Participação Virtual)
Departamento de Farmacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Profa. Dra. MARILISA GUIMARÃES LARA (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Farmacêuticas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP

Prof^a. Dr^a. ANDRÉIA BAGLIOTTI MENEGUIN (Participação Virtual)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 13 de julho de 2023

DEDICATÓRIA

Aos Professores que passaram pela minha vida, pessoas extremamente honradas que contribuem para a edificação de uma nação.
À minha família que sempre me suportou na construção de uma história de vida.
A Deus e aqueles que nos protegem que são o farol que dá a direção na escuridão.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pelo excelente acolhimento, suporte e sua exímia maneira de compartilhar conhecimento. À Prof. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e sua equipe Eloah Drudi Lepore, Camila Cristina Baccetti Medeiros e Rodrigo Sorrechia pela dedicação e ajuda sensacional nas análises microbiológicas em um projeto bem atípico. Ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e Jonatas Lobato Duarte pela ajuda no desvendar do equipamento de permeação. Ao Prof. Dr. Fernando Lucas Primo pela receptividade no departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. A Profa. Dra. Valéria de Carvalho Santos Ebinuma pela sensacional ajuda na parte analítica e a habilidade ímpar em compartilhar recursos e fazê-los multiplicarem. À Dra. Nathalia Vieira Veríssimo pelas explicações riquíssimas em fluorescência. À Ilza Yogui pela habilidade em abrir portas para o projeto, ao Caio Humberto Perego pelo seu positivismo e energia sem igual para solução de problemas, ao Vinícius Paschoalini Silva exímia parceria nos cromatógrafos e a Dra. Ana Lúcia Martiniano Nasser pelos conselhos valiosos.

À centenária instituição Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Campus de Araraquara.

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

EPÍGRAFE

Mar calmo nunca fez bom marinheiro.
(provérbio popular)

RESUMO

A aplicação tópica do ácido gentísico é de interesse tanto acadêmico quanto mercadológico visto o amplo espectro de funções. Já foram identificadas atividades como: adstringente, antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral dentre outras. Além das funções é importante elucidar as possíveis formas de administração do fármaco. Neste trabalho, desenvolveu-se emulsões com ácido gentísico onde se avaliou sua estabilidade e o processo de liberação do ativo. Como parâmetros de eficácia avaliou-se o potencial antioxidante e antimicrobiano. Já em termos de segurança o potencial citotóxico. Na quantificação do ativo houve o desenvolvimento de três metodologias analíticas. A mais eficiente, a espectrofotometria de fluorescência, foi validada com limites de detecção de 1,01 e quantificação de 3,07 µg/L. Os resultados foram: atividade antioxidante medida pelo método cinético de DPPH com a razão molar, EC_{50} de 0,09, *antioxidant reducing power* (ARP) de 11,1; a concentração inibitória mínima (MIC) frente ao *Staphylococcus aureus* foi $4,15 \pm 0,09$ mg/mL, *Escherichia coli* foi $4,00 \pm 0,69$ mg/mL, *Candida albicans* foi $3,00 \pm 0,26$ mg/mL e *Cutibacterium acnes* de $3,60 \pm 0,0$ mg/mL; concentrações até 10,0; 7,3 e 4,0 mM não apresentaram citotoxicidade para as células HaCat, HDFa e HepG2, respectivamente, por método NRU; as emulsões possuem processo de liberação (IVRT) seguindo modelo de Higuchi até 2 horas, e após isso modelo de Korsmeyer-Peppas com K de 18,2529 e n de 0,4930. A substância apresenta potencial para administração cutânea com ação antioxidante e potencial citoprotetor em baixas concentrações.

Palavras-chave: ácido gentísico; emulsão; IVRT; fluorescência; atividade antioxidante, DPPH; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Candida albicans*; *Cutibacterium acnes*

ABSTRACT

The Gentisic Acid topical application is academic and marketing interest given the broad spectrum of pharmaceutical functions. Activities such as astringent, antioxidant, anti-inflammatory, antitumor and others have already been identified. In addition to the functions, it is important to elucidate the possible forms of drug delivery. In this work, Gentisic Acid emulsions were developed, and their stability and the process of active ingredient release were evaluated. The antioxidant and antimicrobial potential were evaluated as efficacy parameters. The cytotoxic potential was assessed as a safety item. There were developed three analytical methodologies to proper measure active principal. The most efficient analytical method, fluorescence spectrophotometry, was validated with detection limit of 1.01 and quantification limit of 3.07 $\mu\text{g/L}$. The antioxidant activity molar ratio measured by DPPH kinetic method, EC₅₀ were 0.09, antioxidant reducing power (ARP) of 11.1. The minimum inhibitory concentration (MIC) against *Staphylococcus aureus* was 4.15 ± 0.09 mg/mL, *Escherichia coli* was 4.00 ± 0.69 mg/mL, *Candida albicans* was 3.00 ± 0.26 mg/mL and *Cutibacterium acnes* was 3.60 ± 0.0 mg/mL. The substance hasn't been showing NRU cytotoxicity against HaCat, HDFa and HepG2 cell in concentrations up to 10.0; 7.3 and 4.0 mM, respectively. The emulsions releasing process assessed by IVRT method follow Higuchi's model up to 2 hours and after that Korsmeyer-Peppas's model with K of 18.2529 and n of 0.4930. The substance has been showed potential for cutaneous administration with antioxidant action and cytoprotective potential in low concentrations.

Keywords: Gentisic acid; emulsion; IVRT; fluorescence; antioxidant activity by DPPH kinetic method; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; *Candida albicans*; *Cutibacterium acnes*

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1-1 Ilustração esquemática das grandes divisões cutâneas.	26
Figura 2.6-1 Fórmula espacial do ácido gentísico.	50
Figura 2.6-2 Fórmula estrutural do ácido gentísico.	50
Figura 2.6-3 Dissociação do ácido gentísico com a indicação dos respectivos pKa.	50
Figura 4.2-1 Exemplo de formatação e concentrações para placa de 24 poços para determinação da concentração inibitória mínima.	67
Figura 5.1-1 Espectro de absorção exploratório entre 220 e 1000 nm para diferentes soluções de ácido gentísico.	73
Figura 5.1-2 Espectro de absorbância entre 220 e 400 nm para soluções de ácido gentísico entre 3,015 e 30,15 mg/L em etanol 50% (v/v) com água tamponada em pH 6,6.	74
Figura 5.1-3 Espectro de absorbância entre 220 e 400 nm para soluções de ácido gentísico entre 3,0 e 30 mg/L em etanol 50% (v/v) com água tamponada em pH 2,2.	75
Figura 5.1-4 Curva de calibração para da concentração da ácido gentísico em função da absorbância nos comprimentos de onda 230, 232, 235, 320 e 322 nm para soluções com etanol 50% e água tamponada com fosfato pH 6,6.	77
Figura 5.1-5 Curva de calibração da concentração da ácido gentísico em função da absorbância nos comprimentos de onda 230, 232, 235, 327 e 329 nm para soluções com etanol 50% e água tamponada com fosfato pH 2,2.	77
Figura 5.2-1 Cromatograma comparativo entre injeções com 50 e 100 µg/mL de ácido gentísico.	81
Figura 5.2-2 Cromatograma limitado a 15 min de corrida. Comparação entre injeções com 50 e 100 µg/mL de ácido gentísico.	82
Figura 5.2-3 Picos cromatográficos em evidências de variação do tempo de retenção.	83
Figura 5.2-4 Cromatogramas utilizando ácido fosfórico como controle de ionização.	84
Figura 5.2-5 Picos cromatográficos do ácido gentísico usando ácido fosfórico como controle de ionização.	85
Figura 5.2-6 Comparação dos cromatogramas dos padrões de ácido gentísico usando ácido fórmico e ácido trifluoroacético como controle de ionização.	87
Figura 5.3-1 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,6 mg/L de ácido gentísico.	88
Figura 5.3-2 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,3 mg/L de ácido gentísico.	88
Figura 5.3-3 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,12 mg/L de ácido gentísico.	89

Figura 5.3-4 Representação tridimensional da emissão de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão e excitação para o ácido gentísico a 0,12 mg/L.	90
Figura 5.3-5 Espectro de fluorescência para diversas concentrações de ácido gentísico.	92
Figura 5.3-6 Curva de calibração da Intensidade de fluorescência em função da concentração.	93
Figura 5.3-7 Representação gráfica dos resíduos do ajuste linear em função da concentração.	94
Figura 5.4-1 Placa 24 poços para <i>S. aureus</i> vs. Ampicilina.	98
Figura 5.4-2 Placa 24 poços para <i>E. coli</i> vs. Ampicilina.	99
Figura 5.4-3 Placa 24 poços para <i>Candida albicans</i> vs. Fluconazol.	100
Figura 5.4-4 Placa 24 poços para <i>Cutibacterium acnes</i> vs. Ampicilina.	101
Figura 5.5-1 Superfície de resposta da absorção da reação de ácido gentísico 170 μ M com DPPH em função do tempo e comprimento de onda.	103
Figura 5.5-2 Superfície de resposta para diferentes concentrações de ácido gentísico em meio reacional com o radical DPPH em função do tempo e comprimento de onda.	104
Figura 5.5-3 Inibição percentual do radical em função do tempo de reação.	105
Figura 5.5-4 Extrapolação logarítmica para obtenção de estimativa de RSA no estado estacionário.	106
Figura 5.5-5 Porcentagem de Inibição do DPPH em função da razão molar.	106
Figura 5.5-6 Superfície de resposta da reação do DPPH com ácido ascórbico 180 mM pelo tempo e comprimento de onda.	108
Figura 5.5-7 Superfície de resposta do DPPH com ácido ascórbico 180 mM vs. Tempo vs. Comprimento de onda.	109
Figura 5.5-8 Porcentagem de inibição do radical DPPH para 15 razões molares testadas.	110
Figura 5.5-9 Porcentagem de Inibição do DPPH para razões molares de até 1,5 vezes.	111
Figura 5.6-1 Viabilidade das células HaCat frente ao ácido gentísico.	112
Figura 5.6-2 Viabilidade celular HaCat vs. ácido gentísico.	112
Figura 5.6-3 Viabilidade das células HDFa contra o ácido gentísico.	114
Figura 5.6-4 Comportamento da viabilidade celular de HDFa pela concentração de ácido gentísico	114
Figura 5.6-5 Viabilidade celular para HepG2 pela concentração de ácido gentísico.	115
Figura 5.8-1 Liberação mássica do ácido gentísico em função do tempo para formulações F8 e F10.	120
Figura 5.8-2 Liberação percentual das emulsões de ácido gentísico em função do tempo.	121

Figura 5.8-3 Representação da liberação percentual em função da raiz quadrada do tempo.	122
Figura 5.8-4 Logaritmo neperiano da liberação percentual em função do tempo. ..	123
Figura 5.8-5 Representação bilogarítmico neperiano da liberação percentual em função do tempo para verificação do modelo de Korsmeyer-Peppas.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-1 Temperatura em °C da superfície da pele em função do segmento corporal.	25
Tabela 2.1-2 pH da superfície da pele nos segmentos da cabeça, pescoço e antebraço.	31
Tabela 2.4-1 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente o <i>Staphylococcus aureus</i>	38
Tabela 2.4-2 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente o <i>Escherichia coli</i>	40
Tabela 2.4-3 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente a <i>Candida albicans</i>	41
Tabela 2.6-1 Referências do ácido gentísico em diversas instituições.	49
Tabela 2.6-2 Logaritmo da constante de dissociação ácida segundo cada autor.	50
Tabela 4.1-1 Principais reagentes utilizados.	52
Tabela 4.1-2 Principais materiais auxiliares utilizados.	52
Tabela 4.1-3 Material microbiológico utilizado.....	53
Tabela 4.1-4 Principais equipamentos utilizados.	53
Tabela 4.2-1 Composição em percentual mássica das emulsões.....	59
Tabela 4.2-2 Condições ambientais e frequência de análise para estudo de estabilidade.	61
Tabela 5.1-1 Parâmetros do modelo de regressão linear por comprimento de onda e pH.....	78
Tabela 5.3-1 Resumo dos parâmetros de regressão linear para as três curvas de calibração.....	93
Tabela 5.3-2 Resultado dos testes de heterocedasticidade calculado via software..	94
Tabela 5.3-3 Resultados dos testes de normalidade para os resíduos.....	95
Tabela 5.3-4 Resultado do ensaio de especificidade ou seletividade do método de espectrofotometria de fluorescência.....	96
Tabela 5.3-5 Precisão do método de espectrofotometria de fluorescência por faixa de concentração.....	96
Tabela 5.3-6 Exatidão do método de espectrofotometria de fluorescência.....	97
Tabela 5.7-1 Fórmulas inicialmente testadas.....	117
Tabela 5.7-2 Formulações geradas para maior solubilidade em etanol e maior viscosidade.....	118
Tabela 5.8-1 Resultado do ensaio de solubilidade do ácido gentísico para concentrações de etanol.	119
Tabela 5.8-2 Resultado da regressão linear para modelo de ordem zero.....	121

Tabela 5.8-3 Resultado da regressão linear para modelo de Higuchi para liberação percentual para dois períodos de liberação.	122
Tabela 5.8-4 Parâmetros da regressão linear para o modelo de primeira ordem. ..	123
Tabela 5.8-5 Parâmetros da regressão linear para verificação do modelo de Korsmeyer-Peppas.	124
Tabela 5.9-1 Dados descritivos do pH das emulsões F8 a F11 por condição ambiental e tempo de estudo.	125
Tabela 5.9-2 Teste de esfericidade para o pH.	127
Tabela 5.9-3 Resultado rANOVA do tempo de estabilidade com a variável pH.	128
Tabela 5.9-4 Dados descritivos da densidade (g/cm ³) das emulsões F8 a F11 por condição ambiental e tempo de estudo.	128
Tabela 5.9-5 Análise de esfericidade para densidade.	130
Tabela 5.9-6 Resultado da rANOVA do tempo de estabilidade para densidade.	130
Tabela 5.9-7 Dados Descritivos para a Viscosidade (mPa.s).....	131
Tabela 5.9-8 Teste de esfericidade para a variável viscosidade.	132
Tabela 5.9-9 Resultado da rANOVA para o tempo de estabilidade para a variável viscosidade.	133
Tabela 5.9-10 Dados Descritivos para a teor de ácido gáltico (%).	133
Tabela 5.9-11 Teste de esfericidade para o teor de ácido gáltico.	135
Tabela 5.9-12 Resultado da rANOVA para o tempo de estabilidade para a variável teor de ácido gáltico.	135
Tabela 5.9-13 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico odor.	136
Tabela 5.9-14 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico aspecto.	137
Tabela 5.9-15 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico cor.	138
Tabela 8.5-1 Dados da curva de calibração da concentração de ácido gáltico em função da intensidade de fluorescência, resíduo e resíduo padronizado.	168

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AG – Ácido gentísico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – *American Type Culture Collection*

C. acnes – *Cutibacterium acnes*

C. albicans – *Candida albicans*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - *Deoxyribonucleic Acid*

DPPH – Substância química 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

DPR – Desvio Padrão Relativo

E. coli – *Escherichia coli*

FDA – *Food and Drug Administration*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IVRT – *In vitro release testing* ou teste de liberação *in vitro*

m/m – Razão mássica ou porcentagem mássica.

MIC – Minimum Inhibitory Concentration, que em português é relativo a Concentração Inibitória Mínima

OECD - *Economic Cooperation and Development*

PA – Refere-se a reagentes com grau de pureza para análise

pKa – Constante de dissociação ácida

qsp – Quantidade suficiente para

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis – *Staphylococcus epidermidis*

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UV – Região do Espectro eletromagnético relativo aos comprimentos de onda ultravioleta

UV/Vis – Região do Espectro eletromagnético relativo aos comprimentos de onda ultravioleta e visíveis

v/v – Razão volumétrica ou porcentagem volumétrica.

Vis – Região do Espectro eletromagnético relativo aos comprimentos de onda visíveis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1	A pele.....	23
2.1.1	Função de termorregulação.....	24
2.1.2	A estrutura da pele	25
2.1.2.1	Epiderme.....	26
2.1.2.2	Derme	28
2.1.3	pH da Pele.....	29
2.2	Envelhecimento.....	32
2.3	Microbiota da pele.....	34
2.4	Microrganismos de estudo	37
2.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	37
2.4.2	<i>Escherichia coli</i>	39
2.4.3	<i>Candida albicans</i>	40
2.4.4	<i>Cutibacterium acnes</i>	41
2.5	Liberação de ativos de formulações semissólidas	42
2.5.1	Células de liberação	44
2.5.2	Modelos matemáticos para mecanismo de liberação	45
2.6	O ácido gentísico	47
2.6.1	Funções de interesse farmacêutico	47
2.6.2	Nomenclatura e números de registro.....	48
2.6.3	Fórmula e características físico-químicas.....	49
3	OBJETIVOS	51
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Materiais.....	51
4.1.1	Reagentes e materiais gerais	51
4.1.2	Material microbiológico	52
4.1.3	Equipamentos.....	53
4.1.4	<i>Software</i>	54
4.2	Métodos	54
4.2.1	Espectrofotometria de absorção visível e ultravioleta.....	54
4.2.2	Espectrofotometria de fluorescência.....	55
4.2.3	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica	56
4.2.3.1	Validação da metodologia analítica.....	56
4.2.3.2	Linearidade	56
4.2.3.3	Especificidade ou seletividade	57
4.2.3.4	Exatidão	57
4.2.3.5	Precisão	58
4.2.3.6	Limite de detecção e de quantificação	58
4.2.4	Desenvolvimento das formulações.....	59
4.2.4.1	Procedimento de preparação das emulsões.....	59
4.2.4.2	Teste de estabilidade mecânica e homogeneidade	60
4.2.5	Estudo de Estabilidade Físico-Química	60
4.2.5.1	Análise de pH de emulsões.....	61
4.2.5.2	Análise de Densidade e Viscosidade das emulsões.....	61

4.2.6	Concentração de ácido gentísico de emulsões	61
4.2.7	Avaliação do potencial antioxidante por método cinético	62
4.2.7.1	Curva de calibração de DPPH	62
4.2.7.2	Curva cinética de sequestro de radical DPPH	63
4.2.7.3	Cálculo dos parâmetros	63
4.2.8	Determinação da atividade antimicrobiana	64
4.2.9	Avaliação do potencial citotóxico	67
4.2.9.1	Potencial citotóxico <i>in vitro</i> por meio de NRU	67
4.2.10	Estudos de liberação <i>in vitro</i> (IVRT)	69
4.2.10.1	Solubilidade do ativo no meio ou <i>sink conditions</i>	69
4.2.10.2	Escolha do meio receptor	69
4.2.10.3	Configuração e dimensões do equipamento de teste	69
4.2.11	Análise dos resultados	70
4.2.11.1	Regressão linear	70
4.2.11.2	Teste de homoscedasticidade e heterocedasticidade	70
4.2.11.3	Teste de normalidade	71
4.2.11.4	Teste de autocorrelação	71
4.2.11.5	Critérios específicos	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	Espectrofotometria de absorção na banda espectral visível e ultravioleta ...	72
5.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com uso de detector UV	79
5.3	Espectrofotometria de fluorescência	88
5.3.1	Curva de calibração	91
5.3.2	Análise de homoscedasticidade vs. heterocedasticidade	94
5.3.3	Avaliação da normalidade dos resíduos	95
5.3.4	Limites de quantificação e detecção	95
5.3.5	Especificidade ou seletividade	95
5.3.6	Precisão	96
5.3.7	Exatidão	97
5.4	Avaliação do potencial antimicrobiano	97
5.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	97
5.4.2	<i>Escherichia coli</i>	99
5.4.3	<i>Candida albicans</i>	100
5.4.4	<i>Cutibacterium acnes</i>	101
5.5	Avaliação do potencial antioxidante	102
5.6	Avaliação do potencial citotóxico	111
5.7	Desenvolvimento das emulsões	116
5.8	Estudo de liberação <i>in vitro</i> (IVRT)	119
5.8.1	Solubilidade do ativo investigação de <i>sink condition</i>	119
5.8.2	Ensaio de emulsões de ácido gentísico em célula de Franz	120
5.9	Estudo de estabilidade físico-química	125
5.9.1	Estabilidade dos parâmetros físico-químicos	125
5.9.1.1	pH	125
5.9.1.2	Densidade	128
5.9.1.3	Viscosidade	131
5.9.1.4	Concentração de ácido gentísico	133
5.9.2	Estabilidade dos parâmetros organolépticos	136
5.9.2.1	Odor	136
5.9.2.2	Aspecto	136
5.9.2.3	Cor	137

6	CONCLUSÃO	138
7	REFERÊNCIAS.....	140
8	APÊNDICES	164
8.1	Regressão linear para calibração de calibração 1	164
8.2	Regressão linear para calibração de calibração 2	165
8.3	Regressão linear para calibração de calibração 3	166
8.4	Regressão linear para calibração de calibração média.....	167
8.5	Resíduos da curva de calibração ácido gentísico por fluorescência	168

1 INTRODUÇÃO

O crescimento da população acima dos 40 anos é expressivo no Brasil. No ano 2000 essa faixa etária correspondia a 26,6%, já em 2020, 38,9%, sendo a projeção para 2030 cerca de 46,1%, ou seja, no período de 20 anos, a parcela de maiores de 40 anos aumentou 12,3%, (IBGE, 2020), e segundo as expectativas este crescimento para os próximos 10 anos será superior a 7%. Esses números ratificam não só a importância de entender melhor o processo de envelhecimento e criar possíveis alternativas para oferecer melhor qualidade de vida a esta população, como também desenvolver produtos com características técnicas específicas para essa população envelhecendo.

No cenário do envelhecimento da população faz sentido a busca de ativos ou qualquer outro dispositivo de saúde que previna ou trate os inconvenientes que o avançar da idade traz.

A pele, como o órgão externo, ganha atenção já que evidencia as marcas da idade e como os anos foram vividos. O estudo de aplicações tópicas que visam a melhor aparência e funcionamento da pele são importantes para que, de forma preventiva ou corretiva, esse órgão, além de cumprir suas funções fisiológicas, possa também, ser fonte de bem-estar tanto físico como psicológico.

No entanto, a proposta de dispositivos de saúde para a finalidade de proporcionar bem-estar não deve ser feita a esmo, mas sim usando do processo científico. A construção do conhecimento objetivando oferecer produtos ou serviços que possuem evidências comprovadas de segurança e eficácia naquilo que se propõe a fazer são conceitos indissociáveis no desenvolvimento de novos produtos. Exatamente neste contexto que esta pesquisa se encaixa, visando contribuir com

evidências para o processo de entendimento se o ácido gáltísico é ou não uma alternativa segura e eficaz para a aplicação tópicá.

Um promissor ativo de interesse farmacêutico e cosmético, o ácido gáltísico apresentou evidências científicas como antioxidante, analgésico, anti-inflamatório, anticancerígeno, dentre outras apresentadas ao longo do trabalho, assim a investigação se essa substância pode ser usada para administração cutânea é de interesse científico e prático.

Não obstante, não basta investigar apenas o ativo, mas também é necessário elucidar uma forma de utilizá-lo. A aplicação de uma substância pura sobre a pele pode não ser a forma mais eficiente de administração. O fato de uma substância não estar dispersa em um meio gera uma alta concentração pontual. Isso pode ser nocivo ao indivíduo e dependendo de parâmetros físico-químicos da substância também seria altamente ineficaz do ponto de vista farmacológico. Desta forma, o desenvolvimento de uma forma de administrar uma substância é algo tão importante quanto a descoberta de uma função farmacêutica. Assim, neste trabalho, investiga-se se o sistema emulsionado com ácido gáltísico é uma forma possível de administração. Uma das principais perguntas é: A emulsão é capaz de liberar o princípio ativo? Gerando em seguida ainda outras: Em qual quantidade? De que forma? Perguntas que serão respondidas para este ativo tão promissor em emulsão.

Uma vez que a pele não é uma entidade estéril, mas sim o habitat para um ecossistema que quando em equilíbrio é benéfico para o ser humano, faz sentido esclarecer a interação entre o ativo que está sendo proposto e os representantes desta microbiota. Desta forma, elencou-se os microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cutibacterium acnes* que são comumente

encontrados na microbiota cutânea, como alvo de estudo da interação destes microrganismos com o ácido genticóico.

A elucidação dos microrganismos versus o ativo também é de interesse de algo bem atual que é o fenômeno da resistência dos microrganismos aos agentes antimicrobianos, e que se tornou ainda mais relevante após a pandemia de COVID-19 que é evidenciado mais à frente no texto.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No intuito de suportar o desenvolvimento do trabalho de pesquisa revisou-se o estado atual dos principais assuntos que são de primordial importância para o sucesso do projeto.

2.1 A pele

O tecido que representa a pele humana corresponde de 5 a 16% do peso corporal e é considerado o maior órgão do corpo humano, envolve todo o corpo e tem diversas funções, sendo a principal delas servir de proteção na interface do ambiente interno e externo, (CORRÊA, 2012; DORADO; FRAILE, 2021; RICHARDSON, 2003; VENUS *et al.*, 2010).

O ambiente externo apresenta condições adversas à fisiologia humana com a presença de agentes químicos, físicos e biológicos. A proteção química está associada com a função de barreira contra substâncias diversas presentes no ambiente exterior. Já a proteção física atua mecanicamente contra o atrito e impacto, além da atuação contra determinados tipos de radiações, principalmente do espectro ultravioleta (UV). No caso da proteção contra agentes biológicos, a pele serve não só como barreira contra patógenos, mas também é um ambiente onde estabelece relações de simbiose com diversos agentes microbiológicos, função essa que é profundamente estudada atualmente, (CORRÊA, 2012; MCKNIGHT *et al.*, 2022).

2.1.1 Função de termorregulação

Além das funções de proteção, a termorregulação é outro papel primordial para o bom funcionamento da fisiologia humana. A temperatura corporal interna é mantida entre 36 e 38°C por meio de um sistema de controle que envolve a permeação seletiva da pele, o sistema muscular e o hipotálamo. Caso a temperatura corporal caia, o hipotálamo envia sinal bioquímico para haver uma constrição arterial com o objetivo de evitar a perda de calor por circulação sanguínea e, ao mesmo tempo, o sistema muscular é acionado gerando contrações e com isso gerar calor. No caso contrário, quando a temperatura está subindo acima do ideal, o hipotálamo usa o sistema bioquímico para gerar uma dilatação arterial, o que aumenta a circulação sanguínea nas extremidades, estimula as glândulas sudoríparas a produzirem suor e o processo evaporativo ou o escorrimento do líquido transfere a energia para o ambiente externo. Cada litro de suor evaporado transfere aproximadamente 580 kcal ao meio ambiente. O mecanismo de troca de energia com o meio exterior envolve a troca de calor sensível na superfície da pele por meio dos processos convectivos, condutivos e radiativos. O calor latente é trocado por meio da evaporação do suor e pela difusão de umidade da pele. Na condição neutra, em que o corpo não precisa usar do mecanismo de termorregulação intensamente, o processo de troca de calor sensível representa 75% do total de energia trocada sendo a troca por calor latente os outros 25%, (ARENS; ZHANG, 2006; MCKNIGHT *et al.*, 2022; SHRESTHA *et al.*, 2021).

Enquanto a temperatura corporal é mantida controlada em uma faixa relativamente estreita de 36 a 38 °C, o mesmo não se aplica à temperatura da pele, que varia segundo condições do ambiente e não é constante ao longo do corpo. Hui Zhang, em sua tese de Ph.D. na Universidade da Califórnia, em Berkeley, (ZHANG, 2003), coletou dados da temperatura da pele onde os voluntários vestiam uma fina

roupa em função da condição do ambiente. Os dados são reproduzidos de forma consolidada na Tabela 2.1-1.

Tabela 2.1-1 Temperatura em °C da superfície da pele em função do segmento corporal.

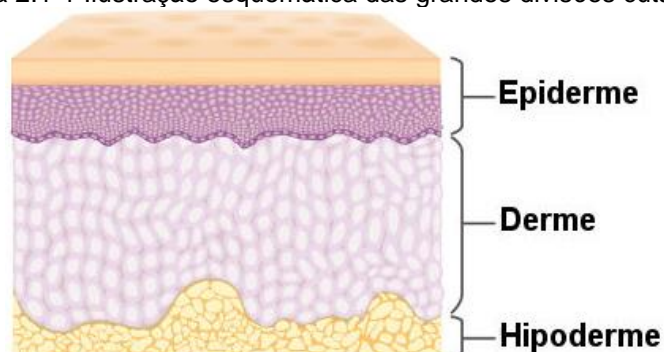
Segmento	Percepção da temperatura do ambiente externo		
	Fria	Neutra	Quente
Testa	30,7	35,8	36,5
Bochecha	27,7	35,2	36,3
Pescoço anterior	33,5	35,8	36,8
Pescoço posterior	34,5	35,4	36,1
Peito	30,9	35,1	36,1
Costas	32,4	35,3	36,3
Abdômen	28,7	35,3	36,2
Antebraço	24,7	34,2	36,4
Braço	27,3	34,6	36,1
Mão	23,1	34,4	36,0
Dedo	21,1	35,3	36,7
Coxa	27,0	34,3	35,6
Canela	26,5	32,9	34,4
Panturrilha	24,3	32,7	34,1
Pé	21,4	33,3	36,4
Média	27,6	34,6	36,0

Nota: cálculo da média e organização em tabela feita pelo autor. Dados oriundos de Zhang (2003).

2.1.2 A estrutura da pele

A estrutura da pele é composta de camadas que podem ser verificadas por ensaios histológicos. Existem duas ou três grandes divisões, dependendo do autor, a primeira camada mais superficial é a epiderme, e a segunda é a derme que é mais espessa e é onde está a maioria dos apêndices da pele. A terceira, que não faz parte do tecido tegumentar e por isso não é considerada parte da pele por alguns autores, é a hipoderme que é composta de tecido adiposo e tem grande variação de espessura de um indivíduo ao outro, (MARIEB *et al.*, 2014). A Figura 2.1-1 ilustra as estruturas brevemente descritas.

Figura 2.1-1 Ilustração esquemática das grandes divisões cutâneas.



Fonte: (SBD, 2022)

2.1.2.1 Epiderme

A epiderme é um plano queratinizado e estratificado que contém quatro classes de células que são: queratinócitos, melanócitos, células epiteliais táteis e células de Langerhans. A espessura da epiderme média é de 0,1 mm, mas nas regiões mais grossas, como a palma das mãos e a planta dos pés, varia entre 1 e 2 mm, já nas regiões mais finas como a pálpebra é de aproximadamente 0,03 mm. Esta camada é a que possui o maior número de células, composta majoritariamente por queratinócitos, e apresenta uma dinâmica de renovação celular intensa, (DORADO; FRAILE, 2021; YOUSEF *et al.*, 2023).

As subdivisões da epiderme dependem da região do corpo. Quando essa é delgada estão presentes quatro camadas, por vezes chamadas de estratos, já na pele espessa existem cinco camadas. Na interface com a derme está uma camada muito fina formada por apenas uma linha de células tronco com alta taxa de divisão celular e de formato cuboide. Essa linha de células é responsável por gerar os queratinócitos jovens. Nesta fronteira com a derme também estão presentes em bem menor número as células de Merkel, por vezes chamadas de células epiteliais táteis. Os melanócitos, que são responsáveis pela síntese da melanina, são entre 10 e 25% das células dessa camada. Uma vez a melanina produzida, essa migra para os queratinócitos, onde a substância agrupa-se sobre o núcleo celular protegendo o material genético da

radiação ultravioleta (UV). A essa camada, que representa o processo de nascimento celular dá-se o nome de camada germinativa, camada basal, estrato basal ou estrato germinativo, sendo essas quatro denominações consideradas sinônimos, (HONARI; MAIBACH, 2014; WAUGH; GRANT, 2018; YOUSEF *et al.*, 2023).

A próxima camada no sentido interface derme para a superfície da pele é a camada espinhosa ou estrato espinhoso. O nome se dá pelo fato dos desmossomos dos queratinócitos terem filamentos proteicos que atravessam a membrana plasmática da célula e ligam-se na membrana proteica do desmossomo do outro queratinócito, gerando uma estrutura intercelular, o que lembra espinhos. Os filamentos proteicos são compostos de queratina, placina e desmogleína. O citoplasma dos queratinócitos nesta camada são ricos em queratinas k1-k10. As células dendríticas também fazem parte do estrato espinhoso, mas em menor quantidade, estão ligadas ao sistema imunológico e fazem endocitose de algum antígeno que possa ter chegado até ela, (ALDEHLAWI *et al.*, 2020; FLORINDA, 2008; ISHIDA-YAMAMOTO *et al.*, 2000).

Continuando na sequência das camadas da epiderme em direção a superfície da pele agora temos a camada granulosa ou estrato granuloso. Nesta camada começa-se a queratinização das células. É a região mais distante da derme e recebe pouca nutrição levando a morte celular. As células adquirem formato pouco mais achatado, apresentando grânulos de querato-hialina, que é um precursor das queratinas k2 e k11, fazem exocitose de fosfolipídios, ceramidas e glicolipídios para o ambiente intercelular, o que gera uma barreira que dificulta e regula a passagem de água e outras substâncias. À medida que esse material excretado migra junto com as células para os estratos superiores forma-se uma espécie de adesivo que mantém as

células juntas e consolida a barreira que visa a impermeabilização da pele, (BEILIN *et al.*, 2020; MATOLTSY, 1975; SMACK *et al.*, 1994)

A próxima camada é o estrato lúcido, que só ocorre em regiões de pele espessa como a palmar e plantar e é caracterizada por ter células mortas, achatadas, onde a querato-hialina foi convertida em eleidina, substância de caráter oleoso que também é um precursor mais próximo da queratina. Tem por função impedir a perda de água.

A última camada da epiderme é a que faz fronteira com o ambiente externo que é o estrato córneo. É a camada mais espessa da epiderme possuindo entre 20 e 30 camadas de células mortas, anucleadas, bem achatadas, sendo que a área de uma só célula recobre aproximadamente 25 células basais, (CORRÊA, 2012). Possuem filamentos de queratina imersos em filagrina que passam a receber o nome de corneócitos dado o grau de diferenciação que atingiram. Os corneócitos que estão mais profundos no estrato córneo estão melhor aderidos uns aos outros e o espaço intercelular é bem preenchido com glicolípido, que deixa a estrutura consideravelmente impermeável. À medida que vão se aproximando da superfície a adesão dos desmossomos diminui até chegarem a se soltar, o que gera a descamação da pele, (DORADO; FRAILE, 2021; MARIEB *et al.*, 2014).

2.1.2.2 Derme

No sentido do ambiente externo para o interno, após a epiderme, encontra-se a derme, que apresenta duas camadas: a mais superficial que é delgada e é chamada de papilar e a mais interna e espessa chamada de reticular, (CORRÊA, 2012). Essas camadas possuem fibroblastos distintos. Os que formam a papila dérmica são responsáveis pelo folículo piloso, o crescimento do pêlo ou cabelo e o músculo eretor. Já a derme reticular tem fibroblastos que excretam a maioria do material da matriz extracelular fibrosa, (DRISKELL *et al.*, 2013).

Em termos de espessura essa camada da pele pode variar de menos de 2 até 4 mm e é responsável pela maior parte da estrutura mecânica da pele, sendo a resistência contra ruptura de 5 até 27 MPa, (WONG *et al.*, 2016).

O processo de cicatrização da pele humana adulta os fibroblastos da derme são recrutados primeiramente e os superiores são requisitados durante a reepitelização. A ativação epidérmica da beta-catenina estimula a expansão da linhagem dérmica superior, (DRISKELL *et al.*, 2013)

2.1.3 pH da Pele

Em 1892 o médico alemão Ernst Heuss reporta um procedimento para determinação colorimétrica da acidez da pele e suor, e descobre que tanto a superfície da pele quanto o suor são ácidos (HEUSS, 1892). Vale lembrar que o conceito de ácido e base foi proposto por Antoine Lavoisier (1743-1794) e por muito tempo foi sendo aprimorado por grandes químicos como Svante Arrhenius (1859-1927), Gilbert Lewis (1875-1946) e Hermann Walther Nernst (1864-1941), sendo este último o que introduziu a ideia da medição da concentração de um íon pela diferença de potencial gerado em um eletrodo, mas foi Søren Peter Lauritz Sørensen (1868-1939) que apresentou a proposta de expressar acidez como o logaritmo negativo da concentração do íon de hidrogênio em água, conceito usado até hoje, (SURBER *et al.*, 2018). Nota-se que tanto o médico Heuss como os químicos Arrhenius, Lewis e Nernst viveram na mesma época e a medição da acidez da pele foi realizada em tempos que o próprio conceito de pH, ácido e base estavam sendo elucidados. Fato notável e um avanço considerável.

A descoberta de Heuss foi confirmada por Schade e Marchionini (1928), agora usando a escala de pH, e reporta além dos dados, a dificuldade metodológica de medir o pH da pele seca e da pele com suor concentrado. O título do artigo publicado foi

“Der Säuremantel der Haut”, que em tradução ao português seria “O manto ácido da pele”, criando assim um termo que foi muito usado como sinônimo de uma camada bioquímica que protege a pele: “manto ácido protetor” ou apenas “manto ácido”.

Alfred Marchionini junto com alguns colaboradores, nos anos de 1938 e 1939, reporta uma série de cinco artigos detalhando vários aspectos da pele, inclusive que as doenças cutâneas têm correlação com alterações de pH, que existem alterações quantitativas e qualitativas das bactérias que vivem sobre a pele com as mudanças do pH. Lesões cutâneas tem sua origem explicada em parte por uma alteração qualitativa dos microrganismos que vivem na pele e que produtos aplicados sobre esta podem alterar seu pH. Temas que lembram o que se discute hoje na vanguarda do estudo da cútis, mas apontados há cerca de 85 anos, (MARCHIONINI, 1938; MARCHIONINI *et al.*, 1938; MARCHIONINI; HAUSKNECHT, 1938; MARCHIONINI; SCHMIDT, 1938, 1939). A questão dos microrganismos que habitam a pele humana será avaliada no item 2.2.

Segger *et al.* (2008) realizaram um estudo multicêntrico com 222 voluntários sendo 147 mulheres e 75 homens, onde a média do pH cutâneo obtido foi 4,9 com intervalo de confiança de 95% entre 4,1 e 5,8.

Em outro estudo 20 voluntários saudáveis foram separados em dois grupos de 10 indivíduos, o grupo de adultos jovens com média $29,8 \pm 3,9$ anos (\pm desvio padrão amostral) com amplitude de 24 a 34 anos, e no grupo de adultos idosos com média de $73,6 \pm 17,4$ anos, alcance de 66 a 83 anos. Mediu-se o pH de diversos segmentos como pode ser verificado na Tabela 2.1-2, nota-se o pH da pele idosa é ligeiramente menos ácida, (MARRAKCHI; MAIBACH, 2007).

Tabela 2.1-2 pH da superfície da pele nos segmentos da cabeça, pescoço e antebraço.

Segmento	Grupos	
	Adultos Jovens	Idosos
Testa	4,43 ± 0,44	5,19 ± 0,44
Pálpebra	4,62 ± 0,40	5,13 ± 0,49
Nariz	5,23 ± 0,55	5,39 ± 0,50
Bochecha	5,07 ± 0,45	5,47 ± 0,52
Nasolabial	5,17 ± 0,58	5,59 ± 0,51
Perioral	5,05 ± 0,48	5,35 ± 0,56
Queixo	5,55 ± 0,57	5,86 ± 0,31
Pescoço	5,20 ± 0,43	5,67 ± 0,49
Antebraço	5,30 ± 0,32	5,75 ± 0,43

Nota: Dados de Marrakchi e Maiback (2007). Organização em tabela feita pelo autor. Valores representam a média ± desvio padrão amostral.

A manutenção da função de barreira do estrato córneo é dependente do pH. A barreira lipofílica depende da síntese de ceramidas e estas por sua vez dependem de duas enzimas, a esfingomielinase acidificada e β -glucocerebrosidase, enzimas que possuem pH ótimo de atividade entre 4,5 e 5,5, respectivamente (RIPPKE *et al.*, 2002). Já o espaço extracelular do estrato córneo possui estruturas em organização lamelar com presença de cristais líquidos que dependem da ionização parcial dos ácidos graxos que se dá em pH entre 4,6 e 6, (BOUWSTRA *et al.*, 1998; FRIBERG, 1990; OSBORNE; FRIBERG, 1987).

Jean-Pierre Hachem, pesquisador da Universidade da Califórnia, em parceria com diversos pesquisadores, realizou ensaios em que a pele foi exposta a um pH mais alcalino, que mostrou o comprometimento da função de barreira, homeostase e integridade mecânica do estrato córneo. A causa é atribuída justamente pela baixa atividade das enzimas acima citadas, gerando uma reduzida taxa de síntese de ceramidas e o aumento da atividade das serino proteases, também conhecidas como enzimas proteolíticas, (HACHEM *et al.*, 2003, 2005).

As observações entre pH e patologias cutâneas não são poucas. No caso da Dermatite Atópica (DA), pacientes que apresentam lesões possuem pH da pele

ligeiramente mais elevado na região quando comparados com pacientes saudáveis, (CHOI *et al.*, 2003; DANBY; CORK, 2018; SEIDENARI; GIUSTI, 1995).

A Ictiose, que se caracteriza por um distúrbio de queratinização, pele seca, escamosa, com fissuras e geralmente associada a questões hereditárias, também apresentam pH mais elevado na região das lesões. Um agravante nos casos de Ictiose são as constantes infecções fúngicas que são facilitadas justamente pelo pH cutâneo mais alto que está relacionado com a menor capacidade da pele se defender nessas condições de pH, (DANBY; CORK, 2018; MIAO *et al.*, 2021; SCHMID-WENDTNER; KORTING, 2006).

2.2 Envelhecimento

O processo do envelhecimento é complexo e com muitas frentes de estudos, porém, ainda hoje, permanecem obscuras as razões que desencadeiam as alterações mecanobiológicas. Saindo da fase infantojuvenil, o organismo envelhece como um todo, levando a uma deterioração funcional, afetando tanto a vitalidade como o comportamento de órgãos e tecidos. Além disso, a debilidade atinge até o nível celular, suas organelas e o DNA, (BAJPAI *et al.*, 2021; SBD, 2023).

Um dos fatores do envelhecimento é a redução da capacidade da célula de se replicar corretamente, o que é conhecido como senescência celular. Ao passar dos anos, a participação das células em senescência tem maior proporção. As estruturas que ficam nas pontas dos cromossomos com a função de proteger da degradação por nucleases e manter a estabilidade do material genético, conhecidas como telômeros, e que não fazem parte do processo de transcrição, é perdida pouco a pouco cada vez que a célula se divide. Ao longo do tempo, após múltiplas divisões celulares, o telômero fica menor e fragmentos importantes do DNA são perdidos durante as próximas divisões, o que leva à perda da função celular, (SBD, 2023; ZHANG; DUAN,

2018). Durante o envelhecimento cutâneo, também ocorrem modificações do material genético acima citado. Dessa forma, o tecido perde sua elasticidade e capacidade de regular as trocas de homeostase, tornando a replicação do tecido menos eficiente. Reações de oxidação química e enzimática, com formação de radicais livres, aceleram ainda mais este processo. Na pele envelhecida observa-se a perda de tecido fibroso, a redução da rede vascular e glandular. A função de barreira que mantém a hidratação celular também fica prejudicada. Dependendo de fatores endógenos como a genética e exógenos como o estilo de vida, com a possível exposição à radiação ultravioleta ou tabagismo, as funções fisiológicas normais da pele podem diminuir em 50% até a meia-idade, (FLOOD *et al.*, 2019; SANCHES SILVEIRA; MYAKI PEDROSO, 2014; SCOTTI; VELASCO, 2003; SILVA *et al.*, 2017).

Adicionando ainda mais complexidade ao exposto acima, as áreas que estudam o sistema dérmico recentemente apontam para a importância do microbioma cutâneo para a saúde humana. A crença que quanto mais “estéril” for a pele melhor para a saúde vem caindo por terra, mas essa extensa e complexa rede de microrganismos que residem na pele humana ainda não é inteiramente entendida, (LEHTIMÄKI *et al.*, 2017). Hoje se sabe que o correto desenvolvimento do sistema imunológico em crianças depende do contato com os microrganismos de onde ela vive, (BLASER; DOMINGUEZ-BELLO, 2016).

Tanto na tenra idade com na fase adulta, a conveniente interação e manutenção do ecossistema microbiano cutâneo ajudam: na produção de compostos anti-inflamatórios, manutenção da função de barreira, composição do arsenal imunológico contra patógenos, correção de danos no tecido e manutenção da homeostase do manto cutâneo saudável, (SANFORD; GALLO, 2013).

Como visto acima, reações de oxidação e formação de radicais livres fazem parte do processo de envelhecimento. Assim, faz sentido pesquisar a função antioxidante de um ativo antes de propô-lo para o uso tópico. A função antioxidante de uma substância é importante para prover ao organismo proteção contra a ação danosa dos radicais livres em excesso, (ALVES *et al.*, 2010).

2.3 Microbiota da pele

A microbiota da pele é formada por diversas bactérias, fungos e vírus que habitam a pele humana. Esse relacionamento de seres microscópicos e humanos gerou um processo de coevolução mútua, logo espera-se que a relação seja benéfica para humanos e sua microbiota que ao longo do tempo assumiu funções importantes da fisiologia do órgão mais externo, (HARRIS-TRYON; GRICE, 2022).

Visto a crescente importância que os microrganismos residentes têm ganhado frente a elucidação do funcionamento fisiológico humano, diversos pesquisadores vêm se dedicando a entender a microbiota humana como um todo, não só a cutânea e não apenas em um determinado período, mas também ao longo do tempo. Incluindo investigações desde o nascimento, o impacto do tipo de parto, normal ou cesariana, além de questões comportamentais, localidade e outras variáveis. Hoje sabe-se que o número de seres microbianos simbióticos supera o número de células humanas em pelo menos 10 vezes, algo da ordem de 100 trilhões de microrganismos, (COSTELLO *et al.*, 2009; DETHLEFSEN *et al.*, 2007).

A modalidade do parto influencia a microbiota. Recém-nascidos por parto normal têm a as espécies *Lactobacillus*, *Prevotella* e *Sneathia* transferidas do colo uterino e canal vaginal para a pele. Em torno de seis semanas após o parto a microbiota desenvolve um perfil com espécies de *Staphylococcus* e *Corynebacterium*. Entretanto, nos indivíduos nascidos por cesariana, as espécies *Staphylococcus*,

Corynebacterium e *Cutibacterium* são predominantes, sem os microrganismos da assinatura vaginal precedente, (CHU *et al.*, 2017).

A fonte de alimentos e condições de oxigenação são determinantes para formação da microbiota de certos pontos da pele. No folículo piloso, região rica em material graxo produzido pela glândula sebácea associada e escassez de oxigênio, leva a bactéria *Cutibacterium acnes*, que é uma anaeróbica facultativa, a dominar a região. A presença de regiões mais mecanicamente protegidas, acaba levando a uma maior umidade local, como nas axilas, virilhas e umbigo, onde é propício o desenvolvimento da espécie *Corynebacterium*. Durante a puberdade os hormônios sexuais levam ao final do desenvolvimento das glândulas sebáceas aumentando a produção de material graxo e por sua vez a presença ainda maior da *Cutibacterium acnes* e *Malassezia spp.* Na idade adulta a microbiota cutânea é relativamente estável nos indivíduos saudáveis assim como acontece com a microbiota intestinal, exceto dos vírus de DNA que possuem alta variação, (CHU *et al.*, 2017; FAITH *et al.*, 2013; OH *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2022; SCHLOISSNIG *et al.*, 2013).

A bactéria mais prevalente na pele humana adulta e sadia é a *Cutibacterium acnes* que representa cerca de 92% da comunidade bacteriana em regiões sebáceas com base nos cálculos executados por Conwill *et al.* (2022) que usou os dados levantados por Oh *et al.* (2014).

Cada indivíduo possui seu próprio conjunto de cepas de *Cutibacterium acnes* (OH *et al.*, 2014), que variam também entre regiões da pele do próprio indivíduo onde uma determinada linhagem pode dominar um poro cutâneo e uma outra cepa diferente em um outro poro. Essa especificidade é gerada pela variabilidade de nutrientes, condições de oxigenação e grau de exposição ao ambiente externo, (CONWILL *et al.*, 2022).

O uso de antissépticos tópicos levam a uma ação de mortalidade local da *C. acnes*, mas essa se mantém durante a recuperação do ecossistema bacteriano. No entanto, quando a intervenção é mais prolongada com uso de agentes bacterianos sistêmicos via oral, nota-se a geração de cepas de *Staphylococcus* resistentes e esse agente antimicrobiano torna-se duradoura na recuperação da microbiota cutânea. O uso de antibióticos sistêmicos gera uma mobilização genética no microbioma como um todo que é considerado uma resposta microbiológica ao estresse, (JO *et al.*, 2021; SANMIGUEL *et al.*, 2018).

A microbiota também compõe a função de barreira da pele. O equilíbrio microbiológico possui espécies que secretam substâncias que visam impedir a colonização por microrganismos invasores ou regulam o ambiente para que nenhuma das espécies da própria microbiota transforme-se em um organismo de risco a saúde humana. Pode-se citar o *Staphylococcus hominis* que produz substâncias antibióticas únicas que possuem excelente ação inibitória contra o *Staphylococcus aureus*. Em outro exemplo, no caso de um aumento da população do *S. aureus* a expressão gênica de regulação populacional, *quorum sensing*, é alterada por substâncias produzidas pelo *Staphylococcus capitis* e *Staphylococcus epidermidis* fazendo com que o *S. aureus* freie sua virulência. Já em um exemplo de interação com as células humanas o *Staphylococcus lugdunensis* produz um ciclo peptídeo que desencadeia a produção de antibióticos pelos queratinócitos humanos, (BITSCHAR *et al.*, 2019; NAKATSUJI *et al.*, 2017; PAHARIK *et al.*, 2017; WILLIAMS *et al.*, 2019).

Sabe-se que mais de 90% de toda a microbiota aeróbia residente na pele é formada por *Staphylococcus epidermidis* que tem inúmeras funções, entre elas estão: ações anti-inflamatórias mutualísticas, reforço da função de barreira e inibição do crescimento de algumas cepas de *Staphylococcus aureus* que são patogênicos,

(BAVIERA *et al.*, 2014). A proliferação do *Staphylococcus aureus* e a menor pluralidade da microbiota cutânea está associada em mais de 90% dos casos de pacientes com dermatite atópica, e em indivíduos que não apresentam essa patologia o microrganismo foi encontrado em menos de 5% dos indivíduos, (GRICE; SEGRE, 2011; PRESCOTT *et al.*, 2017). A infecção por *S. aureus* pode causar abscessos cutâneos, popularmente chamadas de furúnculos, ou até doenças mais sistêmicas como choque séptico e endocardite infecciosa, a taxa de mortalidade é maior que 20% em casos de infecção invasiva, (MISTRETTA *et al.*, 2019; TONG *et al.*, 2015).

2.4 Microrganismos de estudo

Com o objetivo de levantar informações para suportar os ensaios microbiológicos do item 4.2.8, verificou-se as principais atualizações sobre os microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cutibacterium acnes*.

2.4.1 *Staphylococcus aureus*

O *Staphylococcus aureus* pode ser considerado um dos mais eficientes patógenos conhecidos. Capaz de apresentar infecções cutâneas que não chamam muita atenção até milhões de infecções de alta gravidade por ser altamente difundido em todo o mundo. Visto seu alto espectro de severidade o levantamento do número de infecções no globo é uma tarefa bem desafiadora, (CHEUNG *et al.*, 2021; RASIGADE *et al.*, 2014).

Um levantamento importante sobre coinfeções com o COVID-19, realizado por meio de revisão sistemática com metanálise, analisou 33345 estudos onde 171 deles reportavam coinfeção bacteriana com o vírus, o que representa 171262 pacientes. Na maioria dos casos não houve processo de identificação do agente de coinfeção, mas nos casos que isso foi solicitado o agente com maior prevalência de coinfeção

e infecção secundária era o *Staphylococcus aureus* com 25 e 14% respectivamente, (LANGFORD *et al.*, 2022).

A mortalidade por infecção pelo *S. aureus* estimada por meta-regressão é de 10,4% em 7 dias, 13,3% em 15 dias, 18,1% em 1 mês, 27,0% em 3 meses e 30,2% em 1 ano, com base em 536.791 pacientes. Observou-se um aumento de 10% na resistência à meticilina, (BAI *et al.*, 2022).

Visto a severidade dos dados, vários autores e organizações governamentais publicam guias para o tratamento do que é conhecido como *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), onde os fármacos mais recomendados são: vancomicina por meio intravenoso, linezolida, teicoplanina, algumas associações de daptomicina com fosfomicina, ceftarolina ou antiestafilocócico β -lactâmico, (BROWN *et al.*, 2021; CHENG *et al.*, 2021; MOLINA *et al.*, 2022; PUJOL *et al.*, 2021; TABAH *et al.*, 2020; TABAH; LAUPLAND, 2022; TONG *et al.*, 2020).

Um levantamento na literatura da concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente ao *Staphylococcus aureus* pode ser observada na Tabela 2.4-1.

Tabela 2.4-1 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente o *Staphylococcus aureus*.

Autor	Condição testada	Cepa e Resultado da MIC			
		PCM		ATCC	
		2267	25923	29213	6538
(VANDAL <i>et al.</i> , 2015)	1 mg/mL			S	
(PINHEIRO <i>et al.</i> , 2003)	100 μ g/L		S		
(KALINOWSKA <i>et al.</i> , 2021)	mg/mL	5			
(FELDEKOVÁ <i>et al.</i> , 2022)	mM				5 ⁽¹⁾

Onde: S = Sem efeito antimicrobiano, números representam a MIC na unidade testada. (1) Redação e metodologia não estão claras. Dados obtidos de cada referência. Organização em formato de tabela feita pelo autor.

A ampicilina é um antimicrobiano usado como controle, logo, verificou-se a literatura disponível deste fármaco quando aplicado contra a cepa específica deste trabalho, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, obteve-se as seguintes concentrações

mínimas inibitórias: 4 µg/mL (DA SILVA *et al.*, 2018), 0,325 µg/mL (BIKELS-GOSHEN *et al.*, 2010), 9 µmol/L (PANG *et al.*, 2019) e 1ug/mL (NURAL *et al.*, 2021).

2.4.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa que tem por característica respiratória ser anaeróbia facultativa, sendo mais presente no trato gastrointestinal de humanos e animais. No entanto, tem comportamentos que variam entre benéfico e inofensivo a altamente patogênico, (AKBAR; ANAL, 2011; ARBAB *et al.*, 2022; FRIEDMAN *et al.*, 2002).

Assim como o *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli* também apresentou processo de coinfeção junto ao COVID-19, não sendo o principal microrganismo associado a esse tipo de patologia, entretanto nota-se que a resistência a agentes antibióticos da *E. coli* aumentou significativamente nos casos de coinfeção ao COVID-19. A prevalência da *E. coli* resistente a antibióticos foi estudada por meio de revisão sistemática com meta análise, onde chama atenção o nível de resistência dos seguintes fármacos: associação de amoxicilina com clavulanato 85,5%, ampicilina 87,5%, cefuroxima 65,5%, ceftriaxona 73%, levofloxacina 75% e ciprofloxacina 71%, (SULAYYIM *et al.*, 2022). As prevalências de *E. coli* resistente a antibióticos imediatamente antes do COVID-19 eram: ceftriaxona 59%, levofloxacina 43% e ciprofloxacina 46%, (AHMED *et al.*, 2019; AZIMI *et al.*, 2019).

Levantamento na literatura da concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente a *Escherichia coli* pode ser observada na Tabela 2.4-2.

Tabela 2.4-2 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente o *Escherichia coli*

Autor	Condição testada	Cepa e Resultado da MIC		
		PCM	ATCC	
		2857	25922	8739
(VANDAL <i>et al.</i> , 2015)	1 mg/mL		S	
(PINHEIRO <i>et al.</i> , 2003)	100 µg/L		S	
(KALINOWSKA <i>et al.</i> , 2021)	mg/mL	3		
(FELDEKOVÁ <i>et al.</i> , 2022)	mM			5 ⁽¹⁾

Onde: S = Sem efeito antimicrobiano, números representam a MIC na unidade testada. (1) = Redação e metodologia não estão claras. Dados obtidos de cada referência. Organização em formato de tabela feita pelo autor.

A ampicilina é um antimicrobiano usado como controle. Logo verificou-se a literatura disponível deste fármaco quando aplicado contra a cepa específica deste trabalho, *Escherichia coli* ATCC 10536, obteve-se as seguintes concentrações mínimas inibitórias: 1 µg/mL (AL-ZOREKY, 2009), 0,5 µg/mL (NURAL *et al.*, 2021) e < 1 µg/mL (GECGEL *et al.*, 2020).

2.4.3 *Candida albicans*

A família *Saccharomycetaceae* possui o gênero *Candida* que é responsável pela maioria das infecções fúngicas patológicas em humanos. Algumas espécies são amplamente discutidas como a *Candida glabrata* que comumente apresenta resistência a antimicrobianos, a *Candida auris* que tornou-se rapidamente uma ameaça à saúde pública global e a *Candida albicans* que é a mais prevalente. Outras espécies vêm obtendo crescente atenção do sistema mundial de saúde e construção de conhecimento como a *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei*, (LAMOTH *et al.*, 2018; LOPES; LIONAKIS, 2022; PAPPAS *et al.*, 2018).

A *Candida albicans* é comumente encontrada no corpo humano e geralmente associada a regiões de mucosa como boca, ouvidos, pênis, vagina, canal nasal e pulmões estando em estado de simbiose, no entanto algo que traga desequilíbrio para microbiota pode ser um gatilho para tornar-se uma séria infecção fúngica, (ANSALDO *et al.*, 2021; WANG; HOOPER, 2019).

A prevalência de candidíase invasiva é de aproximadamente 29 casos por 100 mil habitantes, (RICOTTA *et al.*, 2021), mas paradoxalmente os indivíduos mais colonizados pela *Candida albicans* são justamente os mais resistentes a uma infecção invasiva, (SHAO *et al.*, 2022).

A concentração inibitória mínima (MIC) obtida na literatura pode ser verificada por meio da Tabela 2.4-3.

Tabela 2.4-3 Concentração inibitória mínima (MIC) do ácido gentísico frente a *Candida albicans*.

Autor	Condição testada	Cepa e Resultado da MIC	
		PCM	ATCC
		2566-FY	10231
(VANDAL <i>et al.</i> , 2015)	mg/mL		1
(KALINOWSKA <i>et al.</i> , 2021)	mg/mL	5	

Onde: números representam a MIC na unidade testada. Dados obtidos de cada referência. Organização em formato de tabela feita pelo autor.

2.4.4 *Cutibacterium acnes*

A recém reclassificada como *Cutibacterium acnes*, (SCHOLZ; KILIAN, 2016), a bactéria anaeróbica facultativa antes chamada de *Propionibacterium acnes*, representa cerca de 92% da microbiota da pele de regiões sebáceas, como apresentado no item 2.3.

A saúde da microrregião está relacionada ao seu equilíbrio. Casos de Dermatite Atópica investigados mostram um decaimento na população e diversidade da *C. acnes* e aumento do *S. aureus*, (FRANCUZIK *et al.*, 2018; WILLIAMS; GALLO, 2017). A Psoríase, que no Reino Unido afeta de 1,3 a 2,5% da população, (CORDINGLEY *et al.*, 2022), também apresenta disbiose cutânea com a redução do *Cutibacterium* aumento do *Staphylococcus* e uma certa manutenção do *Corynebacterium*, o que leva a uma mudança de proporção entre os gêneros, (QUAN *et al.*, 2020).

A Acnes Vulgares, que é a patologia cutânea que afeta entre 60 e 95% da população adolescente global, (CAVALLO *et al.*, 2022). Apresenta atualmente uma mudança no seu entendimento, ainda não amplamente acolhido. A patologia até então é entendida como tendo como uma das principais causas uma alteração hormonal, onde a 5-alpha redutase converte testosterona em di-hidrotestosterona, aumentando a secreção graxa, com isso, acréscimo repentino na proliferação da *Cutibacterium acnes* e o acionamento da cascata inflamatória de forma crônica, (DRÉNO *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2019; MAHMOOD; SHIPMAN, 2017; PASCHOAL; ISMAEL, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2015a, 2015b; SUTARIA *et al.*, 2023). No entanto, autores vem apontando uma mudança significativa no entendimento, onde a diversidade de subespécies de *Cutibacterium acnes* como: *C. acne ssp. elongatum*, *C. acnes ssp. acnes*, *C. acnes ssp. defendens* e outros subtipos produzem quantidades significativas de espécies reativas e oxidativas na pele acneica o que acionaria a cascata inflamatória. Já na pele sadia a microbiota local não produz agentes oxidantes, assim não gerando inflamação, (CORVEC *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2022; LEE *et al.*, 2019; MCLAUGHLIN *et al.*, 2019; MIAS *et al.*, 2023; ROZAS *et al.*, 2021).

A concentração mínima inibitória da ampicilina em relação a *Cutibacterium acnes* para cepas selvagens estaria entre 0,06 e 0,25 µg/mL, (ZHANG *et al.*, 2019), no entanto os autores não deixam exatamente claro a forma de cálculo.

Os dados da atividade antimicrobiana do ácido gentísico não foram encontrados na literatura, podendo ser inédito.

2.5 Liberação de ativos de formulações semissólidas

Os corticoides foram considerados revolucionários no tratamento de doenças cutâneas inflamatórias no pós-segunda guerra mundial em meados da década de 1950, (BARRY; WOODFORD, 1974). O sucesso dos corticoides trouxe muitas

empresas a colocarem suas formulações no mercado. A ideia de que formulações semissólidas poderiam desempenhar papéis diferentes ao liberar o mesmo ativo veio à mente de alguns pesquisadores, o que gerou o interesse de compará-las. Os métodos eram baseados em experimentos clínicos, mas pesquisas na área metodológica também foi alvo de interesse e avanço, (BARRY; WOODFORD, 1974, 1975; BURDICK *et al.*, 1973; CHRISTIE; MOORE-ROBINSON, 1970; COLDMAN *et al.*, 1971; DUMAS; SCHOLTZ, 1972; FALCONI, 1972; MCKENZIE, 1962).

Uns dos primeiros pesquisadores a tentarem um aparato não utilizando testes clínicos e sem a utilização de pele humana como barreira foram Barry e Eini (1976), que verificaram a difusão de corticoides em formulações usando um surfactante não iônico na emulsão e medindo sua permeabilidade em membrana de acetato de celulose.

Tantos outros autores chamaram a atenção para a diferença de desempenho das formulações tópicas que usavam do mesmo princípio ativo e concentração. Até que o médico dermatologista Richard B Stoughton, que foi editor e presidente do *Journal of Investigative Dermatology*, com carreira civil e militar na área, em 1987 publicou um contundente artigo, ainda usando o método clínico de constrição, questionando a equivalência de glicocorticoides disponíveis no mercado, onde encontrou-se significativa variação entre fabricantes que, em teoria, não deveria existir, (STOUGHTON, 1987).

O impacto do artigo foi suficiente para que o FDA passasse a estudar o assunto e finalmente iniciasse um processo de regulamentação, (FDA, 1995). A equivalência entre formas semissólidas requer o entendimento da taxa em que o princípio ativo deixa o veículo ficando disponível para permear a primeira barreira cutânea, ou seja, o estrato córneo. Visto a enorme demanda de estudos de liberação, tornou-se inviável

continuar fazendo testes clínicos para essa finalidade, gerando assim interesse ao desenvolvimento de metodologias e validações para métodos *in vitro*. Ficou-se assim conhecido no setor como: *in vitro release test* (IVRT), (SHAH *et al.*, 2022).

O primeiro guia publicado pela agência reguladora americana no assunto foi em 1995 com o enfoque de bioequivalência considerando testes *in vivo*, (FDA, 1995). Já em 1997 foi elaborado um guia que é considerado um marco no setor. Trata de questões como: *scale up* de formas semissólidas não estéreis, alterações no processo pós-aprovação e a obrigatoriedade de comparações usando testes de liberação *in vitro*, no intuito de evitar a variabilidade da equivalência farmacêutica devido ao processo de transporte do fármaco do veículo até seu alvo, (FDA, 1997).

Atualmente os principais guias e regulamentações envolvendo o setor são:

FDA-2022-D-1859, versão preliminar que está em consulta pública na data da redação deste trabalho, (FDA, 2022b);

Seminário promovido pelo FDA em relação a boas práticas em desenvolvimento de produtos tópicos, (FDA, 2022a);

Método publicado pela Farmacopeia Americana, (USP, 2014);

Seminário detalhando questões metodológicas e interpretativas, (FDA, 2017);

Guia da União Europeia de qualidade e equivalência de produtos tópicos, (EMA, 2018);

Guia da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD) para testes *in vitro* e *in vivo*, (OECD, 2004).

2.5.1 Células de liberação

O desenvolvimento dos aparatos para realização dos ensaios *in vitro*, por si só, é algo que demonstra a criatividade humana na busca por mimetizar em laboratório algo que acontece na natureza, sendo a célula criada por Tomaz J. Franz, (FRANZ,

1975), que na época era colaborador da divisão de consumo da Procter & Gamble, tornou-se padrão para os ensaios e é a mais utilizada pelos autores e órgãos reguladores como referência, (FDA, 2022a; OECD, 2004; USP, 2014).

A forma como a célula de Franz é montada, na vertical, fez com que a nomeassem como *Vertical Diffusion Cell* (VDC), entretanto existem outras configurações como Célula de Imersão (USP, 2014), *Enhancer Cell* (CORBO, 1995), *in-line cell* (ILC) (CÓRDOBA-DÍAZ *et al.*, 2000; THAKKER; CHERN, 2003; UPADHYAY *et al.*, 2019), sendo que essa última vem ganhando popularidade.

2.5.2 Modelos matemáticos para mecanismo de liberação

O transporte de um fármaco por uma membrana pode ser modelado pela primeira lei de Fick, (FICK, 1855), modelo de difusão, onde o fluxo de material (J) é proporcional a taxa de variação de sua concentração no espaço (dC/dx) multiplicada por uma constante que é conhecida como coeficiente de difusão (D), gerando-se a equação (1), onde o sinal negativo de D representa que o compartimento doador está perdendo massa. A segunda lei de Fick, determina a variação temporal de concentração (dC/dt) em função das derivadas parciais em relação as três dimensões espaciais (x, y, z), equação (2), (OLEJNIK *et al.*, 2012; THAKKER; KLEIN, 2020).

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (1)$$

$$\frac{dC}{dt} = D \left(\frac{\partial^2 C}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 C}{\partial z^2} \right) \quad (2)$$

Aplicando-se as equações (1) e (2), para a difusão entre dois compartimentos sendo o primeiro o doador e o segundo o receptor, separados por uma membrana, chega-se a equação (3) onde o processo de integração matemática, sob algumas condições de contorno, produz duas soluções: a primeira no caso da substância estar

em dispersão no meio doador segue-se a equação (4), já no caso da substância estar solubilizada no meio doador aplica-se a equação (5), (HIGUCHI, 1961; HIGUCHI; HIGUCHI, 1960). Ficando conhecido por modelo de Takeru Higuchi, ou apenas Higuchi. Modelagem matemática ainda amplamente aceita hoje em dia, (FDA, 2022a; USP, 2009, 2014).

$$\frac{M_t}{M_0} = K(t)^{0,5} \quad (3)$$

$$Q = 2C_0 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{0,5} \quad (4)$$

$$Q = (2C_0C_sDt)^{0,5} \quad (5)$$

No entanto existem outros modelos que não são diretamente derivados das equações (1) e (2). Entre eles estão: o de ordem zero com a equação (6), o de primeira ordem com a equação (7), e o de Korsmeyer-Peppas com a equação (8), (ALONSO *et al.*, 2020; ELHASSAN, 2022; MALLANDRICH *et al.*, 2017).

$$\frac{M_t}{M_0} = K \cdot t \quad (6)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - e^{-k \cdot t} \quad (7)$$

$$\frac{M_t}{M_0} = K \cdot t^n \quad (8)$$

Sendo M_t e M_0 a massa da substância no tempo t e a massa no início do experimento, respectivamente. K sendo a constante de específica para cada modelo matemático. A razão dentre M_t e M_0 é conhecida como liberação percentual quando multiplicada por 100.

2.6 O ácido gentísico

2.6.1 Funções de interesse farmacêutico

O ácido gentísico é amplamente encontrado fazendo parte do próprio sistema de defesa das plantas, (ABEDI *et al.*, 2020; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). O processo de investigação científica já identificou algumas funções relevantes. A substância vem demonstrando um vasto espectro de atividade biológica, incluindo propriedades antioxidante, adstringente, anti-inflamatória e antirreumática, (BORGES; CASTLE, 2015; HMDB, 2022; PELEG; NOBLE, 1995). O grupo de pesquisa de Kabra *et al.* (2014) apresentou interessante atividade antiparkinsoniana e recentemente Sun *et al.* (2019) evidenciou uma descoberta que o ácido gentísico pode impedir a transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca prevenindo a disfunções cardíacas. Kim *et al.* (2020) concluem que o ácido gentísico tem efeito sinérgico com o processo de cicatrização da pele e sugerem que esse seja o composto principal para essa finalidade.

O ácido gentísico vem mostrando-se como um ativo antitumoral e anticancerígeno (SHARMA, S. *et al.*, 2004) ou com um papel na prevenção ao câncer (SHARMA, Sonia *et al.*, 2004). Já Altinoz *et al.* (2018), em um artigo contundente, relataram atividade antitumoral e sugerem que o ácido gentísico tenha estudos ampliados como um fármaco anticancerígeno. Como o ácido gentísico é um catabólico da aspirina alguns autores demonstraram a influência desta substância em alguns tipos de câncer, por exemplo, tumores gliais (EGAN *et al.*, 2016; SIVAK-SEARS *et al.*, 2004) e câncer de mama (LU *et al.*, 2017; YANG *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2012), mas em indivíduos que tem geneticamente alelos da variante CYP2C9, é dificultada a conversão da aspirina em ácido gentísico, assim os portadores não usufruem do

benefício (BIGLER *et al.*, 2001), o que é mais uma evidência da importância do ácido gentísico na função antitumoral ou anticancerígena.

Algumas plantas como *Solanum nigrum* Linn, *Hibiscus rosa sinensis*, *Amaranthus spp.* e *Leonurus sibiricus* são elencadas, pelo conhecimento popular, por suas atividades antitumorais, visto isso, alguns autores, investigando-as, confirmaram o conhecimento tradicional e atribuíram à presença do ácido gentísico nestas plantas a função associada ao emprego popular, (HUANG *et al.*, 2010; SARKER; OBA, 2020; SHARMA, Sonia *et al.*, 2004; SITAREK *et al.*, 2017).

2.6.2 Nomenclatura e números de registro

O ácido gentísico possui alguns sinônimos como 2,5-di-hidrobenzoico e 2,5-DHBA, *2,5-Dihydroxybenzoate*, *2,5-dihydroxybenzoic acid*, *2,5-Dihydroxybenzoic acid*, *5-hydroxysalicylic acid*, *Gentisate*, *Gentisic acid*, *Hydroquinone carboxylic acid*. A nomenclatura em língua inglesa mais usada é *Gentisic Acid*, sendo o nome IUPAC: *2,5-Dihydroxybenzoic acid*, (HMDB, 2022). A substância possui registro em diversas instituições como visto na Tabela 2.6-1.

Tabela 2.6-1 Referências do ácido gentísico em diversas instituições.

Instituição	Sigla	Número de Registro ou Referência
<i>Chemical Abstract Service</i>	CAS	490-79-9
<i>Chemical Entities of Biological Interest</i>	ChEBI	17189
<i>International Chemical Identifier</i>	InChI	1S/C7H6O4/c8-4-1-2-6(9)5(3-4)7(10)11/h1-3,8-9H,(H,10,11)
<i>International Chemical Identifier</i>	InChIKey	WXTMDXOMEHJXQO-UHFFFAOYSA-N
<i>Simplified Molecular-Input Line-Entry System</i>	SMILES	OC(=O)c1cc(O)ccc1O
<i>World Health Organization - International Nonproprietary Names</i>	INN	756
<i>National Library of Medicine</i>	PubChem® CID	3469
<i>Human Metabolome Database</i>	HMDB	HMDB00152
<i>European Chemicals Agency</i>	ECHA	207-718-5
<i>Japan Chemical Substance Dictionary</i>	Nikkaji	J6.046 ^a
<i>Food and Drug Administration</i>	UNII	VP36V95O3T

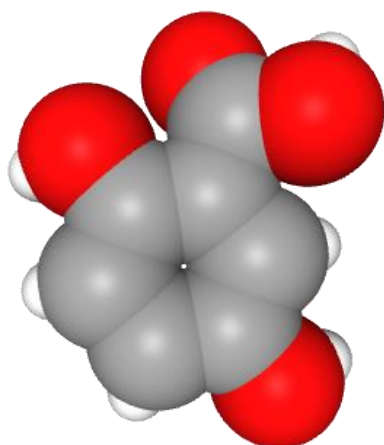
Nota: organização em tabela pelo autor, dados consultados em cada instituição.

2.6.3 Fórmula e características físico-químicas

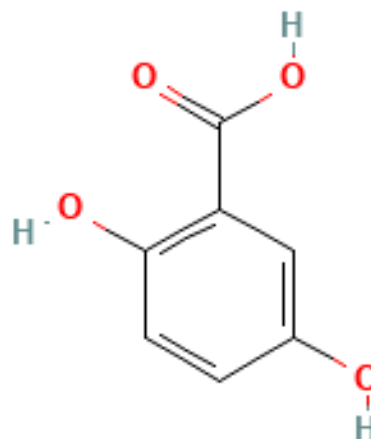
O ácido gentísico apresenta-se como pó cristalino com coloração variando entre branco a amarelado e possui a característica de formar cristais monocínicos em forma de prisma quando precipitado de uma solução aquosa.

A fórmula molecular é C7H6O4, sendo a massa molar média de 154,121 g/mol, ponto de fusão é estimado em 199,5 °C, sua solubilidade em água é estimada em 12,3 g/L, (HMDB, 2022). Pode-se ter uma ideia da fórmula espacial pela Figura 2.6-1 e Figura 2.6-2.

Figura 2.6-1 Fórmula espacial do ácido gentísico. Figura 2.6-2 Fórmula estrutural do ácido gentísico.



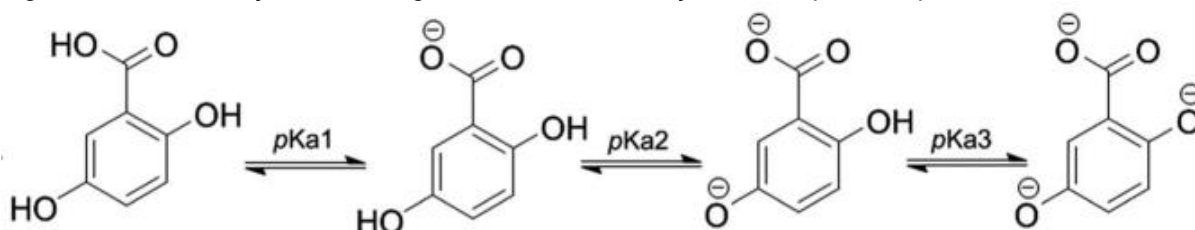
Fonte: (PUBCHEM, 2023)



Fonte: (PUBCHEM, 2023)

A substância caracteriza-se por ser um ácido poliprótico, possuindo diferentes graus de dissociação segundo Figura 2.6-3.

Figura 2.6-3 Dissociação do ácido gentísico com a indicação dos respectivos pKa.



Fonte: (PÉREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2014)

Dados do logarítmico da constante de dissociação ácida (pKa) foram coletados na literatura e organizados na forma da Tabela 2.1-1.

Tabela 2.6-2 Logaritmo da constante de dissociação ácida segundo cada autor.

pKa1	pKa2	pKa3	Método	Referência
2,97	10,50	-	Potenciométrico	(TSIN-JAO <i>et al.</i> , 1962)
3,0	10,3	13,9	Titulação espectrofotométrica	(STALLINGS; SCHULMAN, 1975)
2,77	10,01	10,80	Cromatográfico	(ERDEMGIL <i>et al.</i> , 2007)
2,98	10,29	-	Potenciométrico	(ERDEMGIL <i>et al.</i> , 2007)

Nota: A origem dos dados segundo cada referência. Organização em tabela pelo autor. (-) dado não disponível.

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho consiste na obtenção de resultados que elucidem a aplicação tópica de emulsão com ácido genticóico.

No intuito de atingi-lo tem-se as seguintes etapas a serem cumpridas:

1. Desenvolvimento de metodologia analítica para sua quantificação;
2. Preparação de emulsões;
3. Elucidação sobre a solubilidade do ativo em meio receptor;
4. Avaliação do processo de liberação do ácido genticóico das emulsões;
5. Avaliação do potencial antimicrobiano;
6. Avaliação do potencial citotóxico;
7. Avaliação do potencial antioxidante;
8. Estudo de estabilidade das emulsões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os principais materiais e métodos científicos usados no desenvolvimento deste projeto de pesquisa encontram-se especificados nesta seção.

4.1 Materiais

4.1.1 Reagentes e materiais gerais

Os principais reagentes usados estão referenciados na Tabela 4.1-1.

Tabela 4.1-1 Principais reagentes utilizados.

Reagente	Fornecedor e/ou referência
Ácido acético glacial grau HPLC	J. T. Baker, USA, lote: A25A21
Ácido ascórbico	Sigma-Aldrich Brasil Ltda e fabricado pela Aldrich China com Lote: SLBC7863V
Ácido fórmico PA	LabSynth produtos para laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil
Ácido fosfórico PA	LabSynth produtos para laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil
Ácido gentísico	Sigma-Aldrich Brasil Ltda e fabricado pela Aldrich China com Lote: WXBD5188V
Ácido trifluoroacético	Êxodo científica Ltda, Sumaré, SP, Brasil
Etanol grau HPLC	Êxodo científica Ltda, Sumaré, SP, Brasil
Etanol PA	Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda, Suzano, SP, Brasil
Fosfato de sódio bibásico PA	LabSynth produtos para laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil
Fosfato de sódio monobásico anidro PA	LabSynth produtos para laboratórios Ltda, Diadema, SP, Brasil
Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)	Sigma-Aldrich Brasil Ltda e fabricado pela Aldrich USA, St. Louise, com Lote: 0000127711
Metanol grau HPLC	Êxodo científica Ltda, Sumaré, SP, Brasil

Fonte: o autor.

Os principais materiais auxiliares estão listados na Tabela 4.1-2.

Tabela 4.1-2 Principais materiais auxiliares utilizados.

Material	Fornecedor e/ou referência
Garrafa de cultivo celular	Estéril, com filtro, Costar™
Placa 24 poços	Construída em poliestireno, fundo plano, com tampa, estéril, marca Costar™
Placa 24 poços	Construída em poliestireno, fundo plano, com tampa, estéril, marca TPP™
Placa 96 poços	Construída em poliestireno, fundo plano, com tampa, estéril, marca Costar™
Swab	Estéril, marca FirstLab
Tubo graduado	Tipo Falcon marca Cral™

Fonte: o autor.

4.1.2 Material microbiológico

Os materiais microbiológicos utilizados no projeto estão relacionados na Tabela 4.1-3.

Tabela 4.1-3 Material microbiológico utilizado.

Microrganismo	Fornecedor	Cepa
<i>Candida albicans</i>	ATCC	10231
<i>Cutibacterium acne</i>	ATCC	6919
<i>Escherichia coli</i>	ATCC	10536
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC	6538

Nota: A ATCC considera o número de cada cepa uma marca registrada. Fonte: o autor.

4.1.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados encontram-se listados na Tabela 4.1-4.

Tabela 4.1-4 Principais equipamentos utilizados.

Equipamento	Fornecedor e/ou referência
Agitador Magnético com Aquecimento	KASVI, modelo K40-1820H
Agitador tipo hélice	Marconi, potência 1/6 CV e 1680 rpm máximo
Agitador tipo vórtex	KASVI, modelo K40-1020B
Balança analítica	Schimadzu, modelo ATX224
Balança analítica	Schimadzu, modelo AT220
Balança técnica	Gehaka, modelo BG 4000RS
Banho ultrassônico	Sanders, modelo Soniclean 6, potência 500 W
Centrífuga	Heraeus, modelo Biofuge haemo
Centrífuga	Eppendorf, modelo 5804 FT
Cromatógrafo	PerkinElmer modelo Flexar, número serial: 292N1120802F com duas bombas, detector UV, desgaseificador e injetor de 20 µL.
Espectrômetro de Fluorescência	Schimadzu, modelo RF- 6000
Espectrômetro UV/VIS	BMG Labtech SPECTROstar™ Nano
Estufa	Quimius
Estufa	Fanem, modelo 002 CB
Fluxo laminar	Veco™
Microscópio	Olympus™
Permeador por célula de Franz	Hanson Research modelo Microette
PHmetro	Gehaka, modelo PG 1800
Pipetas automáticas com volume variável	Eppendorf com capacidade de 100, 1000 e 5000 µL
Pipetas automáticas com volume variável	Labmate, modelo Soft com capacidade 100, 200 e 1000 µL
Viscosímetro	Anton Paar, modelo SVM 3000

Fonte: o autor

4.1.4 Software

Os *softwares* utilizados estão listados abaixo:

Chromera™ versão 3.4.0.5712.

Jamovi versão 2.3.

JASP 0.17.1.

LabSolutions RF versão 1.01.

Microsoft Excel™ versão 365.

Microsoft Word™ versão 365.

R versão 4.2.2.

RStudio™ versão 2022.07.2 Build 576.

SPECTROstar™ Nano Control versão 2.1.

SPECTROstar™ Nano MARS Data Analysis versão 3.01 R2.

4.2 Métodos

4.2.1 Espectrofotometria de absorção visível e ultravioleta

A absorção de energia luminosa de uma substância no espectro eletromagnético pode ser útil para identificá-la, quantificá-la ou com posse das informações fornecidas por essa técnica melhor utilizar outras ferramentas de química analítica.

Na obtenção do espectro utilizou-se cubetas de quartzo de base quadrada com aresta interna de 10 mm de comprimento e altura de 45 mm com 2 faces polidas e volume aproximado de 3,5 mL. O espectrofotômetro BMG Labtech SPECTROstar™ Nano foi configurado para leitura entre 220 e 1000 nm com resolução de 1 nm.

No campo exploratório foram testadas diversas concentrações de ácido gentísico em solução água e etanol em proporções de etanol variando de 30 a 50% (v/v).

No campo analítico utilizou-se soluções de ácido gentísico de 3 a 30 mg/L utilizando como diluente solução água etanol 50% (v/v).

Os dados foram coletados pelo software SPECTROstar™ Nano Control versão 2.1 por saída de texto e futura análise ou por meio do software SPECTROstar™ Nano MARS Data Analysis versão 3.01 R2.

4.2.2 Espectrofotometria de fluorescência

A obtenção do espectro de fluorescência contou com duas etapas: a exploratória e a analítica. Em ambas utilizaram-se cubetas de quartzo de base quadrada com aresta interna de 10 mm de comprimento e altura de 45 mm com 4 faces polidas e volume aproximado de 3,5 mL. As amostras foram diluídas em solução de água e etanol 50 % (v/v).

Na fase exploratória o espectrofotômetro de fluorescência Shimadzu RF- 6000 foi configurado para varredura de comprimento de onda de excitação de 250 a 400 nm com resolução de 2 nm e varredura de emissão de 380 a 530 nm com resolução de 1 nm, velocidade de varredura de 6000 nm/min, filtro de excitação de 3 nm e de emissão de 5 nm.

Na fase analítica o mesmo espectrofotômetro foi configurado para comprimento de onda de excitação de 322 nm, varredura do comprimento de onda de emissão de 400 a 480 nm, com resolução de 1 nm, velocidade de varredura de 600 nm/min e os mesmos filtros da fase exploratória.

A aquisição de dados se deu por meio do software LabSolutions RF versão 1.01 e exportação no formato texto UTF-8 para análise posterior.

4.2.3 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica

A metodologia para a detecção e quantificação do Ácido Gentísico foi desenvolvida considerando duas grandes abordagens analíticas: a Espectrofotometria e a Cromatografia.

A Espectrofotometria com medição do Espectro Ultravioleta, Visível e de Fluorescência e na Cromatografia usando *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) com detector de luz ultravioleta (UV).

4.2.3.1 Validação da metodologia analítica

A validação de um método analítico é definida como sendo um processo por meio do qual, estudos de laboratório são utilizados para garantir que o método em questão atenda às exigências desejadas. O processo de validação engloba estudos da linearidade, especificidade, precisão, exatidão e limite de detecção (HARRIS *et al.*, 2017). Este processo traz segurança para o emprego e reprodução dos resultados.

A metodologia analítica foi validada, por meio de protocolos de instituições nacional (ANVISA, 2017), e internacional (ICH, 1995, 2022).

4.2.3.2 Linearidade

A linearidade de um método analítico é a capacidade de produzir resultados que são diretamente proporcionais a concentração do analito em uma dada faixa e foi avaliada segundo requisitos da legislação nacional vigente, (ANVISA, 2017).

Na avaliação da linearidade do método espectrofotométrico por fluorescência foram preparadas sete soluções padrão do ácido gentísico em diferentes concentrações de 0,010, 0,020, 0,030, 0,050, 0,100, 0,150 e 0,20 mg/L em etanol 50% (v/v). Mediu-se a variável de resposta, que consiste na intensidade de fluorescência no comprimento de onda de emissão de 446 nm quando a amostra é excitada em 320 nm para cada solução padrão do ácido gentísico em triplicata. Obteve-se assim três

conjuntos de dados representados pelos pontos de concentração e a variável de resposta e um quarto conjunto que é a média aritmética da variável de resposta para cada concentração. Calculou-se os parâmetros da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Critérios de aceitação seguiram a seção II da RDC 166, (ANVISA, 2017).

4.2.3.3 Especificidade ou seletividade

Um procedimento analítico deve apresentar especificidade, ou seja, sua capacidade de avaliar de forma inequívoca a substância que se tem o intuito de analisar ou quantificar.

A especificidade foi avaliada frente ao preparo da solução padrão de ácido gentísico na concentração de 0,20 mg/L e contaminantes: ácido clorídrico 0,001 M e peróxido de hidrogênio 3%.

O resultado das concentrações esperadas e as medidas foram comparadas e seguiu-se os critérios da seção I da RDC 166, (ANVISA, 2017).

4.2.3.4 Exatidão

A semelhança ou proximidade dos resultados obtidos, por meio do método analítico em validação, será comparada ao valor tido como verdadeiro, ou seja, aquilo que sabidamente foi colocado nas soluções. O cálculo comparativo também é conhecido como porcentagem de recuperação, (ANVISA, 2017).

O teste de recuperação foi realizado em emulsões adicionando três níveis de concentração, 0,15% (R1), 0,5% (R2) e 1% (R3) de ácido gentísico em triplicata. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Assim, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor das amostras com concentrações pré-determinadas. O critério de aceitação se dá pela seção VI da RDC 166, (ANVISA, 2017).

4.2.3.5 Precisão

A precisão do método analítico é o nível de consonância entre resultados medidos ao entorno de um valor central, executadas repetidas vezes em uma amostra homogênea com condições preestabelecidas, onde avalia-se o grau de dispersão em relação a esse centro.

A precisão geralmente é expressa em termos de desvio padrão e desvio padrão relativo. As réplicas da solução de ácido gentísico de 0,20, 0,15 e 0,03 mg/mL foram analisadas seguidamente, sob as mesmas condições e pelo mesmo analista, assim o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises e analistas foi avaliado. Aceitação sendo critérios da seção V da RDC 166, (ANVISA, 2017).

4.2.3.6 Limite de detecção e de quantificação

O método analítico possui limite de detecção (LD), equação 9, que representa a menor concentração da substância em análise, neste caso do ácido gentísico, presente na amostra que pode ser detectada, mas não seguramente quantificada, enquanto o limite de quantificação (LQ), equação (10), de um método representa a menor concentração da substância alvo da análise na amostra que pode ser quantificada com adequada precisão e exatidão.

$$LD = \frac{3,3\sigma}{a} \quad (9)$$

$$LQ = \frac{10\sigma}{a} \quad (10)$$

Onde:

“ σ ” é o desvio padrão da interceptação com o eixo ordenado com o mínimo de três curvas analíticas;

“ a ” é o coeficiente angular ou a inclinação da curva analítica.

Os critérios de aceitação são dados pela seção VII para o limite de detecção e pela seção VIII para o limite de quantificação, RDC 166, (ANVISA, 2017).

4.2.4 Desenvolvimento das formulações

Foram desenvolvidas emulsões óleo em água (O/A) contendo ácido genticóico em diferentes concentrações. O controle foi feito por meio de formulação placebo. As composições estão descritas na Tabela 4.2-1.

Tabela 4.2-1 Composição em percentual mássica das emulsões.

Reagente (INCI Name)	Fase	Formulações			
		F8 (%)	F9 (%)	F10 (%)	F11 (%)
<i>Cetyl Alcohol</i>	O	6,0	6,0	6,0	6,0
<i>Sodium Cetearyl Sulfate</i>	A	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Isopropyl Myristate</i>	O	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Ethylhexyl Stearate</i>	O	1,2	1,2	1,2	1,2
<i>Glycerin</i>	A	3,0	3,0	3,0	3,0
<i>Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil</i>	O	0,4	0,4	0,4	0,4
<i>Disodium EDTA</i>	A	0,05	0,05	0,05	0,05
<i>Gentic acid</i>	O	1,0	0,5	0,15	-
<i>Water</i>	A	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100

Onde: valores em porcentagem (p/p), A - refere-se a fase aquosa, O - refere-se a fase orgânica. Fonte: adaptado de Corrêa (2012).

4.2.4.1 Procedimento de preparação das emulsões

A fase orgânica (O) e a fase aquosa (A), segundo a Tabela 4.2-1, foram pesadas separadamente de forma analítica em béquer de volume apropriado. Aqueceu-se as fases em banho-maria mantendo-as sob leve agitação manual com uso de baqueta polimérica. Uma vez atingida a temperatura entre 70 e 75 °C, verteu-se a fase aquosa sobre a orgânica. Manteve-se em agitação manual sob aquecimento até criar-se uma fase leitosa de aspecto homogêneo, aproximadamente 75°C. Retirou-se do banho-maria e manteve-se em forte agitação manual sobre a bancada forrada com protetor térmico até início de espessamento. Após isso, colocou-se sob agitação

mecânica em rotação aproximada de 1200 rpm até o resfriamento em temperatura ambiente.

4.2.4.2 Teste de estabilidade mecânica e homogeneidade

Os testes de homogeneidade e estabilidade mecânica foram realizados após 12 horas de preparação da emulsão sendo mantidas neste período em temperatura ambiente e tampadas.

Teste estabilidade mecânica consistiu em amostrar em triplicata cada emulsão em tubo graduado tipo eppendorf de 2 mL e submetê-los a centrifugação de 3500 rpm por 30 minutos e observação visual se houve alguma separação de fase ou mudança no aspecto.

Teste de homogeneidade foi realizado por espalhamento de cerca de 5 gramas de emulsão sobre vidro de relógio e inspecionado visualmente pela presença de grumos.

As emulsões aprovadas nesses testes foram submetidas ao estudo de estabilidade.

4.2.5 Estudo de Estabilidade Físico-Química

O estudo de estabilidade acelerado é baseado no Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, (ANVISA, 2004). Todas as formulações foram mantidas em frascos de vidro com tampa polimérica, identificados e submetidos ao estudo de estabilidade durante 90 dias em condições preestabelecidas, incluindo o placebo. Análises físico-químicas (pH, viscosidade, densidade, concentração de ácido genticóico) e organolépticas (aspecto, cor e odor) foram realizadas nos tempos: zero (inicial), duas semanas, um, dois e três meses segundo condições da Tabela 4.2-2.

Tabela 4.2-2 Condições ambientais e frequência de análise para estudo de estabilidade.

Local	Temperatura (°C)	Periodicidade das Análises				
		0	2S	1M	2M	3M
Geladeira	5 ± 2	+	+	+	+	+
Ambiente	25 ± 5	+	+	+	+	+
Estufa	37 ± 2	+	+	+	+	+

Onde: (0) Inicial, (S) Semana, (M) Mês e (+) realizar análises. Fonte: organização em tabela pelo autor, com base em ANVISA (2004) e Isaac *et al.* (2008).

4.2.5.1 Análise de pH de emulsões

Avaliou-se o pH das emulsões por meio da dispersão aquosa a 10% em temperatura ambiente e com o uso do PHmetro Gehaka PG 1800 previamente calibrado.

Na preparação da dispersão de emulsão pesou-se em um béquer 1 g de emulsão em balança técnica Gehaka modelo BG 4000RS e aliciou-se água desmineralizada até obter-se 10 g de dispersão.

Agitou-se o recipiente com uso de bastão polimérico até obtenção de uma dispersão parcialmente homogenia.

O pH foi medido com uso de termômetro do próprio equipamento para correção do desvio por temperatura. Leituras são referentes ao pH a 20°C.

4.2.5.2 Análise de Densidade e Viscosidade das emulsões

A densidade e viscosidade foram avaliadas por meio do viscosímetro Anton Paar modelo SVM 3000 que além da viscosidade fornece também o parâmetro de densidade da amostra medida.

Injeta-se 2,5 mL por meio de seringa na entrada de amostra do equipamento. As medidas de viscosidade e densidades foram realizadas a 40 ± 0,01 °C. Sendo a densidade reportada referente a temperatura de 25 °C.

4.2.6 Concentração de ácido genticico de emulsões

A concentração de ácido genticico foi mensurada com o uso da metodologia desenvolvida no item 5.3.

Pesou-se 360 mg de emulsão de forma analítica usando balança Shimadzu modelo ATX224. A amostra pesada foi diluída na proporção de 1:2500 sendo a primeira diluição realizada com Etanol absoluto grau HPLC e as subseqüentes com Etanol grau HPLC e água desmineralizada na proporção de 50% (v/v).

4.2.7 Avaliação do potencial antioxidante por método cinético

Na avaliação do potencial antioxidante utilizou-se o método cinético de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) da leitura fotométrica da oxidação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) em metanol frente a amostra de antioxidante.

4.2.7.1 Curva de calibração de DPPH

Construiu-se a curva de calibração da absorbância pela concentração de DPPH usando-se soluções metanólicas de DPPH nas concentrações: 80, 60, 40, 20, 5, 2,5, 1,5 μM . Preparadas por meio da pesagem analítica de DPPH para a solução mais concentrada, 80 μM , e a diluição sequencial desta para obter-se as demais concentrações utilizadas na curva. Todas as soluções foram preparadas pela manhã do dia do experimento.

Uma vez de posse das soluções utilizou-se: cubeta de quartzo 10 mm de comprimento ótico por 45 mm de altura com duas faces polidas e duas opacas; espectrofotômetro BMG Labtech SPECTROstar™ Nano configurado em modo *scan* com resolução de 1 nm de 220 a 1000 nm . Comprimento de onda de interesse em 515 nm , alta sensibilidade, 100 disparos por amostra e leitura de absorção.

Como solução de referência usou-se metanol grau HPLC sem nenhuma adição. As leituras foram executadas em ambiente escuro, climatizado em aproximadamente 20°C e sem controle de umidade para a obtenção do espectro de absorção para cada uma das soluções descritas no parágrafo anterior.

A absorvância no comprimento de onda de 515 nm de cada solução padrão foi correlacionada com a respectiva concentração. Foi usado o método dos quadrados mínimos para encontrar a equação e parâmetros de ajuste da curva de calibração.

Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da luz.

4.2.7.2 Curva cinética de sequestro de radical DPPH

Na construção da superfície de resposta da absorvância do DPPH em função do tempo aplicou-se os mesmos parâmetros do espectrofotômetro do item anterior, 4.2.7.1. À cubeta adicionou-se 2000 µL de solução de DPPH 60 µM e executou-se a primeira leitura, em seguida, adicionou-se rapidamente 200 µL da solução da substância antioxidante em estudo. Executou-se a segunda leitura com 1 minuto decorrido da primeira e as demais com intervalo de 1 minuto até o final do tempo estipulado de análise. A primeira e a segunda adições foram executadas por meio de pipeta de volume variável entre 5000 µL e 200 µL respectivamente.

Repetiu-se o procedimento do parágrafo anterior para cada solução metanólica de agente antioxidante em diferentes concentrações. Ácido gentísico: 170, 150, 100, 90, 60, 50, 48, 30 e 12 µM. Ácido Ascórbico: 250000, 180000, 120000, 60000, 40000, 4000, 800, 400, 160, 120, 100, 80, 56, 20 e 8 µM.

4.2.7.3 Cálculo dos parâmetros

Calcula-se a concentração de DPPH por meio dos parâmetros do ajuste linear da curva de calibração, equação (11):

$$C_{DPPH} = \frac{A + b}{a} \quad (11)$$

Onde:

“A” é a absorvância no comprimento de onda de 515 nm;

“a” e “b” são os coeficientes angular e linear respectivamente da curva de calibração.

A porcentagem de inibição do radical, ou em língua inglesa, *radical scavenging activity*, (RSA), é calculada pela equação (12):

$$RSA = \frac{A_{inicial} - A_{atual}}{A_{inicial}} \times 100\% \quad (12)$$

Onde:

RSA é a porcentagem de radical livre inibido no momento do teste;

$A_{inicial}$ e A_{atual} são as absorvâncias da solução em questão no comprimento de onda de 515 nm no momento inicial e no momento do teste respectivamente.

A razão molar de antioxidante, também conhecida como *Efficiency Concentration*, (EC), é calculada de acordo com a equação (13):

$$razão\ molar\ ou\ EC = \frac{Q_{AO}}{Q_{DPPH}} \quad (13)$$

Onde:

Q_{AO} e Q_{DPPH} são as quantidades molares de substância antioxidante e de DPPH no momento inicial da reação química.

É comum as notações EC_{30} , EC_{50} , EC_{90} e EC_{100} onde o número subscrito refere-se a porcentagem de inibição do radical. A Capacidade de redução antioxidante, *antioxidant reducing power*, (ARP), é o inverso de EC, ou seja, equação (14):

$$APR = \frac{1}{EC} \quad (14)$$

O valor estequiométrico do antioxidante é considerado como o dobro de EC_{50} .

4.2.8 Determinação da atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada com método baseado em Kalinowska *et al.* (2021) com alterações.

Em uma visão geral o método utiliza a diluição de soluções de ácido gentísico com concentração conhecida em ágar Mueller Hinton (MHA) e a posterior inoculação de solução padronizada de microrganismo.

Utilizou-se placa de vinte quatro poços, estéril, fundo plano, com tampa onde doze poços foram destinados para ágar com crescentes concentrações do analito, outros oito poços para ágar com crescente concentração do antimicrobiano de controle e finalmente os quatro poços restantes para os controles: do ágar, do microrganismo, do diluente da amostra e da amostra.

O poço de menor concentração que inibiu o crescimento do microrganismo tem sua concentração nomeada como a inibitória mínima da placa tanto para o analito quanto para o antimicrobiano de controle. A média aritmética da triplicada de cada substância e microrganismo é considerada como a MIC para o experimento.

Três soluções de ácido gentísico nas concentrações de 60, 45 e 30 mg/mL foram preparadas utilizando como diluente água desmineralizada estéril com dimetilsulfóxido (DMSO) a 5% estéril em tubo tipo Falcon e agitada por 40 min em agitador tipo vórtex.

Foram preparadas duas soluções aquosas de cada antimicrobiano de controle: Ampicilina 0,2 e 0,05 mg/mL, Fluconazol 0,08 e 0,0016 mg/mL, Anfotericina-B 0,08 e 0,0016 mg/mL e mais duas soluções de Ampicilina 0,005 e 0,0014 mg/mL, utilizando-se como diluente água desmineralizada e estéril.

A placa de vinte quatro poços foi preparada aplicando ágar em volume pré-determinado para cada poço, variando entre 1,80 e 1,92 mL e de 0,20 a 0,08 mL para a solução do ativo ou antimicrobiano de controle de forma que o volume final do poço seja sempre mantido em 2,00 mL.

A adição na placa mencionada acima foi executada aplicando-se poço a poço primeiramente o ágar, morno, ainda fluido a aproximadamente 48 °C, por meio de pipeta de volume variável com ponteira estéril. Logo após, a solução do ativo ou antimicrobiano de controle é adicionada, utilizando-se essa segunda pipeta para homogeneizar a mistura, de ágar mais a solução, por meio de sucção e dispensa da mistura por quatro vezes e em seguida a ponteira sendo descartada.

As soluções microbianas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Cutibacterium acnes* foram padronizadas em 0,5 McFarland equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL e diluídas para $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Já para *Candida* foram contadas em câmara de Neubauer e padronizada em $2,0 \times 10^4$ UFC/mL. Estas soluções microbianas foram inoculadas sobre o ágar já solidificado por meio de swab estéril em cada poço que deveria receber o microrganismo. A placa foi incubada por $24 \pm 0,5$ horas a $35,5 \pm 2$ °C para *Candida albicans*, a 37 ± 2 °C, no caso dos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e 48 ± 1 hora a 37 ± 2 °C em câmara de anaerobiose para *Cutibacterium acnes*.

No intuito de obter-se organização e clareza na execução do experimento, confeccionou-se mapas da placa de vinte quatro poços, como o exemplo da Figura 4.2-1, para cada condição: microrganismo, analito e antimicrobiano. O mapa foi impresso tomando toda folha A4 e fixada na parte frontal do fluxo laminar auxiliando na orientação da execução.

Figura 4.2-1 Exemplo de formatação e concentrações para placa de 24 poços para determinação da concentração inibitória mínima

S. aureus vs Ampicilina Rev_4

	1 SP1	2 SP2	3 SP3	4 AP1	5 AP2	6 CRT
A	1,80 0,20	1,82 0,18	1,84 0,16	1,80 0,20	1,80 0,20	Amostra
B	1,82 0,18	1,84 0,16	1,86 0,14	1,82 0,18	1,82 0,18	Agar
C	1,84 0,16	1,86 0,14	1,88 0,12	1,84 0,16	1,84 0,16	Solvente + Agar
D	1,86 0,14	1,88 0,12	1,90 0,10	1,86 0,14	1,86 0,14	Micro + Agar

Nota: nas colunas de 1 a 5 a primeira linha dentro da representação de cada poço representa o volume de ágar a ser adicionado em mL e a segunda linha representa o volume da solução de ativo ou antimicrobiano a ser adicionado. Às colunas de 1 a 3, hachuradas em tons de amarelo, adicionou-se ágar mais a solução do analito. Na primeira coluna, SP1, usou-se a solução 1 de analito e subsequentemente para SP2 e SP3. As colunas em tons de verde são para a solução do antimicrobiano. AP1 e AP2 que são referentes a primeira e segunda soluções de antimicrobiano. Já a coluna 6 é reservada aos controles. Fonte: o autor.

Foram avaliadas as atividades antimicrobianas contra as cepas padrão:

Staphylococcus aureus ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 10536, *Candida albicans*

ATCC 10231 e *Cutibacterium acnes* ATCC 6919.

4.2.9 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico segue a metodologia estabelecida pelo *International Organization for Standardization (ISO)* na norma *Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*, (“ISO 10993-5”, 2009).

4.2.9.1 Potencial citotóxico *in vitro* por meio de NRU

Este ensaio *neutral red uptake* (NRU) foi desenvolvido pela Rockefeller University como um esforço de pesquisa do câncer, mas rapidamente tornou-se um

dos mais utilizados no mundo para pesquisas de sensibilidade celular, (BORENFREUND; PUERNER, 1985; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

O potencial citotóxico é determinado em queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat) cultivados em *Minimum Essential Media* (MEM) e para dermo fibroblastos humanos (HDFa) e hepatocarcinoma humano (HepG2) em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), ambos com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 . As células com confluência de 80 a 90% são tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos, então, semeadas em placas de 96 poços. A tripsina é neutralizada com o meio em questão com soro fetal bovino e a concentração de células para o ensaio é de $1,0 \times 10^6$ células/mL. As placas são incubadas por 24 horas para adesão celular, ("ISO 10993-5", 2009).

Logo após, são adicionados 100 μL de lauril sulfato de sódio, como controle positivo. Os meios DMEM ou MEM, dependendo da linhagem celular, com adição de 5% de soro fetal bovino e os antibióticos são usados como controle negativo. Os demais poços são adicionados às amostras nas concentrações a serem testadas e a placa novamente incubada por 24 h. Decorrida a incubação, a placa é invertida com parcimônia para remoção do meio de cultura e lavada com 150 μL de PBS. Segue-se com a adição de 100 μL do meio com *neutral red* a 40 $\mu\text{g/mL}$ em cada um dos poços e novamente incubada por 3h. Passado a curta incubação, a suspensão de cada poço é removida invertendo-se a placa novamente e nova lavagem com 150 μL PBS. Adiciona-se 150 μL da solução de dessorção de ácido acético e submetida a agitação orbital por 10 min. A mensuração da absorbância em 540 nm é feita por meio de

espectrofotômetro equipado com leitor de microplacas, (BHAVIKATTI *et al.*, 2021; CORRÊA *et al.*, 2022; “ISO 10993-5”, 2009; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008)

4.2.10 Estudos de liberação *in vitro* (IVRT)

Os testes de liberação *in vitro* foram conduzidos seguindo o método da farmacopeia americana, (USP, 2009, 2014). com esclarecimentos presentes no seminário promovido pelo FDA sobre o assunto, (FDA, 2017), e dois métodos muito citados por outros autores, (OECD, 2004; SHAH *et al.*, 1989).

4.2.10.1 Solubilidade do ativo no meio ou *sink conditions*

A realização do teste de liberação *in vitro* requer que não exista resistência ao transporte do fármaco relativo à sua solubilidade no meio receptor. Logo, para garantir a condição mede-se a solubilidade do analito no meio receptor e garante-se que a quantidade a ser liberada não represente mais que 10% do limite de solubilidade, (USP, 2009).

4.2.10.2 Escolha do meio receptor

O meio receptor deve atender as condições do item anterior. Preferencialmente uma solução alcoólica, (FDA, 2017), concentração de referência de 50% de etanol (v/v), (OECD, 2004). Elegeu-se para esse estudo concentração de 50% de etanol em água tamponada com PBS.

4.2.10.3 Configuração e dimensões do equipamento de teste

Equipamento utilizado é dotado de: 6 células de difusão vertical de Franz operando simultaneamente, área de membrana exposta a permeação de 1,77 cm², massa de material semissólido adicionado 300 mg; volume da célula receptora 7,0 mL, volume de amostra coletada 1mL, parâmetro de reposição 2,8 mL, temperatura de 32 ± 1 °C, (USP, 2014), amostragem nos tempos: 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 12 h coletadas automaticamente em *vials*.

4.2.11 Análise dos resultados

A significância estatística adotada em todo trabalho é de 95%, sendo esse nível aplicado, por exemplo, em análise de variância (ANOVA) que pode determinar se três ou mais grupos são estatisticamente diferentes. Algumas análises específicas:

4.2.11.1 Regressão linear

No intuito de mostrar a relação entre as variáveis independentes e variável de resposta, criou-se os modelos de regressão onde ajusta-se uma curva segundo um modelo matemático. No caso dos modelos de regressão linear usa-se uma linha reta, por outro lado, os modelos de regressão logística e não linear usam outras funções matemáticas, ou seja, curvas. No entanto, o modelo de regressão linear possui alguns pressupostos como, (CASSON; FARMER, 2014):

- Existência de homogeneidade da variância, homoscedasticidade, onde o tamanho do erro das projeções não se altera significativamente entre os valores da variável independente.
- As variáveis são independentes das observações, ou seja, não há relações ocultas entre as observações.
- Os resíduos da regressão linear dos dados experimentais devem seguir uma distribuição normal.

4.2.11.2 Teste de homoscedasticidade e heterocedasticidade

Em geral H_0 é a hipótese onde os resíduos da regressão linear são homocedásticos e H_1 é a hipótese em que os resíduos não são homocedásticos, ou seja, com a presença de heterocedasticidade. Rejeita-se H_0 quando o nível de significância escolhido for atingido, como definido no item 4.2.11, ou seja, caso valor

de p seja menor que 0,05, obtém-se a significância maior que o determinado. Neste caso opta-se por H_1 , caso contrário mantem-se H_0 .

Os testes utilizados são o de Breusch-Pagan (BREUSCH; PAGAN, 1979), Goldfeld-Quandt (GOLDFELD; QUANDT, 1965) e Harrison-McCabe (HARRISON; MCCABE, 1979), e foram calculados por meio do software estatístico Jamovi (THE JAMOVI PROJECT, 2022) que utiliza a linguagem de programação R e o pacote *Companion to Applied Regression (CAR)*, (FOX *et al.*, 2021; R CORE TEAM, 2021).

4.2.11.3 Teste de normalidade

Caso as diferenças entre valores propostos pelo modelo de predição e os resultados experimentais sigam o modelo de distribuição normal, atende-se ao requisito de normalidade dos resíduos. No intuito de assegurar essa condição aplica-se o teste de Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk para suportar a tomada de decisão, (BERGER; ZHOU, 2014; MASSEY, 1951; SHAPIRO; WILK, 1965; SMIRNOV, 1944).

Muito semelhante com o processo de formulação de hipótese do item anterior, formula-se a hipótese H_0 que assumindo que resíduos da regressão linear seguem a distribuição normal e a hipótese H_1 para quando não se pode afirmar H_0 , ou seja, sua negação que resulta em considerar que os resíduos não seguem a distribuição normal. Rejeita-se H_0 quando o nível de significância definido no item 4.2.11 for atingido.

4.2.11.4 Teste de autocorrelação

Um dos pré-requisitos do modelo de regressão linear é que não exista correlação oculta no conjunto de dados. A tomada de decisão de que não existe autocorrelação pode ser suportada por meio do teste de Durbin-Watson, (UYANTO, 2020), onde formula-se a hipótese H_0 que assume que resíduos da regressão linear

não possuem correlação com a variável independente e a hipótese H_1 para quando não se pode afirmar H_0 , ou seja, sua negação. Rejeita-se H_0 quando o nível de significância definido no item 4.2.11 for atingido. Logo, optando-se por H_1 , caso contrário mantem-se H_0 .

4.2.11.5 Critérios específicos

Aplica-se no processo de validação analítica o requisito de seletividade do método. Esta será verificada pela ausência de resposta quando comparados com os placebos empregados. A precisão dos métodos será considerada adequada quando forem obtidas estimativas de desvio padrão relativo entre as determinações inferiores a 2%, (ICH, 1995, 2022). Na exatidão, valores entre 98,0% e 102,0% serão considerados adequados.

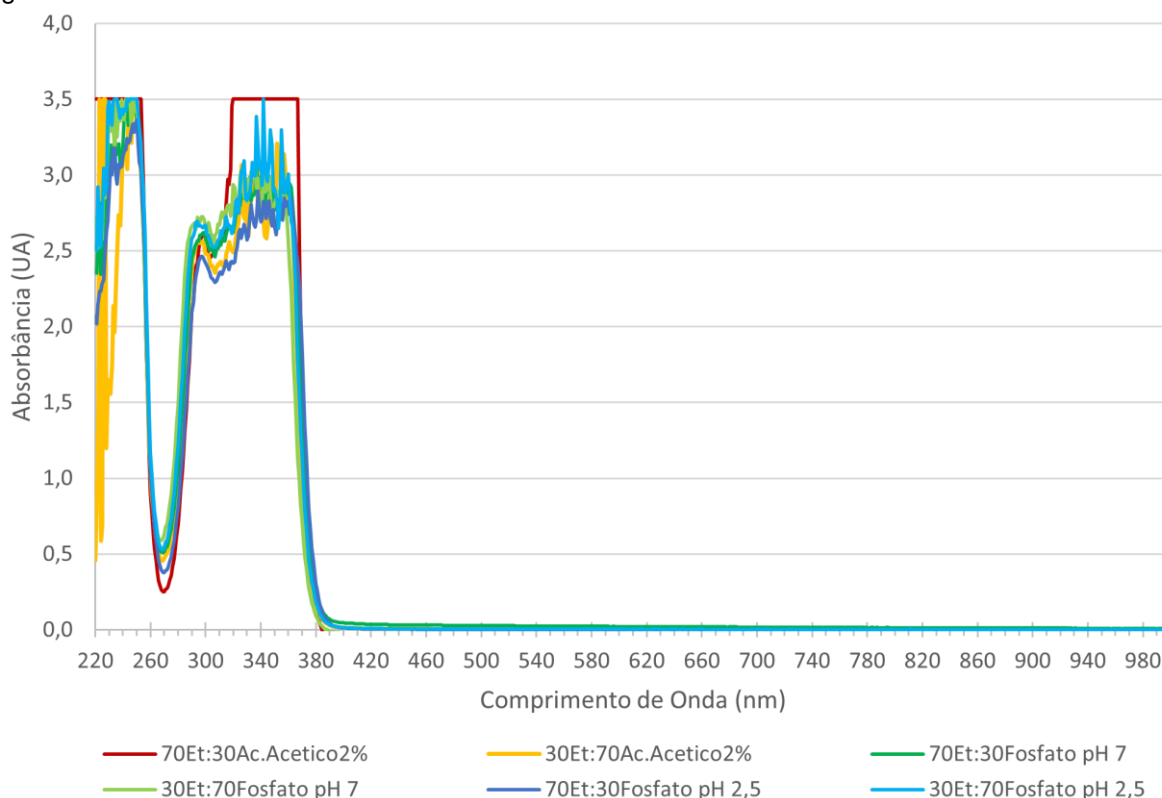
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a comparação, quando possível, frente a outros resultados publicados na literatura científica estão disponíveis a seguir. A primeira questão abordada no projeto foi o experimento para a busca de uma metodologia analítica. A estratégia inicial envolve a aquisição de dados sobre o comportamento espectrofotométrico.

5.1 Espectrofotometria de absorção na banda espectral visível e ultravioleta

No intuito exploratório de verificar a influência do diluente da amostra e o pH sobre o espectro de absorção das bandas ultravioleta e visível (UV/Vis) foram formuladas diferentes soluções com concentração constante de ácido gentísico, 1 g/L, variando a porcentagem de etanol, 30 ou 70% (v/v) e o pH, por meio da adição de 2% de ácido acético ou tampões de fosfato de pH 2,5 a 7,0. Os espectros estão reunidos na Figura 5.1-1.

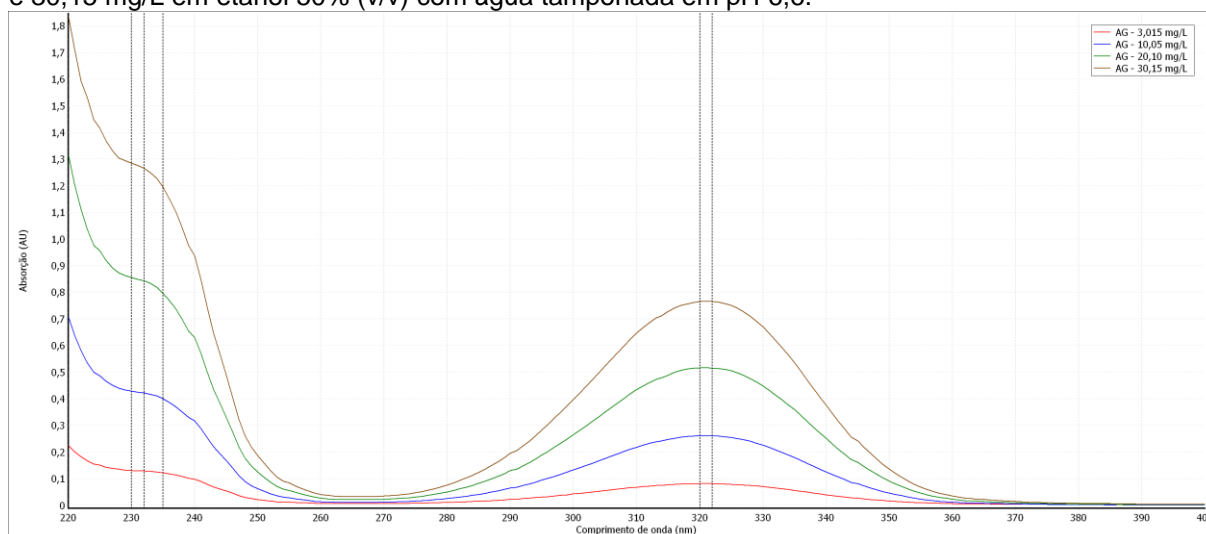
Figura 5.1-1 Espectro de absorção exploratório entre 220 e 1000 nm para diferentes soluções de ácido genticóico.



Onde: UA representa unidades de absorbância. Na legenda as linhas nomeadas com 70 Et e 30 Et representam 70 e 30 % (v/v) de etanol respectivamente. A porção aquosa contou com adição de 2% (v/v) de ácido acético ou tampão fosfato com o pH de 2,5 ou 7,0 conforme especificado em cada rotulo de dados. Fonte: o autor.

Pode-se observar na Figura 5.1-1 que a concentração usada saturou o detector ou está próxima da saturação. A presença do ácido acético, que tem absorção em solução com etanol a 60% até 260 nm, (BEISL *et al.*, 2018), explica o comportamento da linha vermelha. O Ácido Genticóico aparenta possuir ao menos duas regiões distintas de absorção e não apresenta absorção significativa após 400 nm. Sendo essas observações levadas em consideração para a obtenção do próximo espectro. Optou-se por soluções de ácido genticóico com concentrações bem menores, entre 3,015 e 30,15 mg/L, e como diluente optou-se por deixar constante a proporção de etanol em 50% (v/v) com a parte aquosa utilizando apenas os tampões de fosfato com pH 6,6. Vide Figura 5.1-2.

Figura 5.1-2 Espectro de absorvância entre 220 e 400 nm para soluções de ácido gentísico entre 3,015 e 30,15 mg/L em etanol 50% (v/v) com água tamponada em pH 6,6.



Onde: AU representa unidades de absorvância. Na legenda as linhas identificam a concentração de ácido gentísico. Fonte: o autor.

Observa-se no espectro da Figura 5.1-2 que existem algumas regiões de interesse. A primeira é uma banda de absorção entre 220 e 240 nm, já que próximo de 270 nm a absorção é bem menor. A segunda é uma banda que se inicia por volta de 280 nm e termina em aproximadamente 360 nm. Adhikari *et al.* (2021) reporta espectro de absorção do ácido gentísico para a água e etanol em 322 nm e 325 nm respectivamente, os autores não exploram a região mais energética do espectro ultravioleta (UV) acima de 270 nm. Já Garzón *et al.* (2015) permite uma avaliação visual do espectro publicado, onde pode-se verificar que o máximo da absorção estaria entre 211 e 213 nm, comprimento fora do range do equipamento usado neste trabalho, na mesma publicação nota-se um patamar com região central em aproximadamente 230 nm e uma segunda banda centrada em 320 nm que são válidos para a substância em meio aquoso e pH 7,74. Tanto os dados de Garzón *et al.* (2015) quanto Adhikari *et al.* (2021) estão em consonância com o resultado aqui obtido, mesmo que não sejam exatamente as mesmas condições.

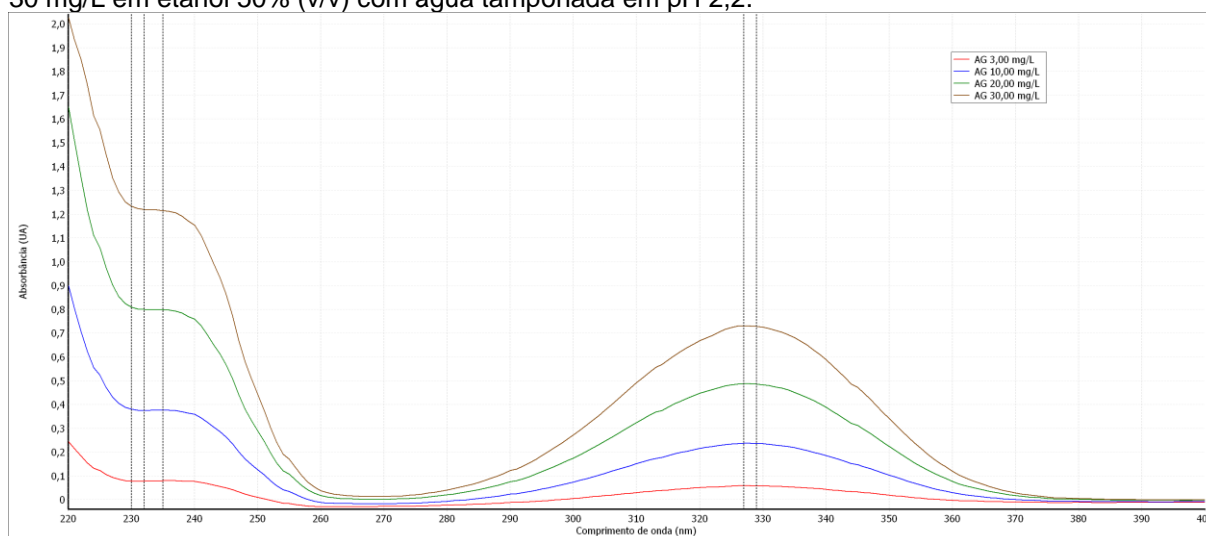
Nas regiões mencionadas no parágrafo anterior, alguns comprimentos de onda chamam a atenção, além de 220 nm que representa o máximo da absorção. Os

comprimentos de 230, 232 e 235 nm que são pontos em uma região onde a taxa de decaimento da absorção em função da variação do comprimento de onda é menor, levando para uma possível região de interesse analítico pois pode contribuir com uma maior robustez do método visto que uma pequena variação no comprimento de onda não leva a uma variação tão expressiva como nas regiões de 220 e 227 nm ou 237 e 247 nm.

Na segunda região de interesse da Figura 5.1-2 os comprimentos de onda que chamam a atenção são os de 320 e 322 nm, visto que são comprimentos de máxima absorção da segunda banda, isso também gera interesse analítico pelo fato que em regiões mais altas do espectro existe uma menor quantidade de substância que absorvem, podendo assim contribuir para a especificidade do método.

No intuito de entender o comportamento espectro fotométrico das soluções agora com pH da água ácida formulou-se soluções de ácido genticílico de 3 a 30 mg/L, usando como diluente a mesma proporção de etanol, 50% (v/v), mas agora a água com tampão fosfato pH 2,2. Obtendo-se o espectro da Figura 5.1-3.

Figura 5.1-3 Espectro de absorbância entre 220 e 400 nm para soluções de ácido genticílico entre 3,0 e 30 mg/L em etanol 50% (v/v) com água tamponada em pH 2,2.



Onde: AU representa unidades de absorbância. Na legenda as linhas identificam a concentração de ácido genticílico. Fonte: o autor.

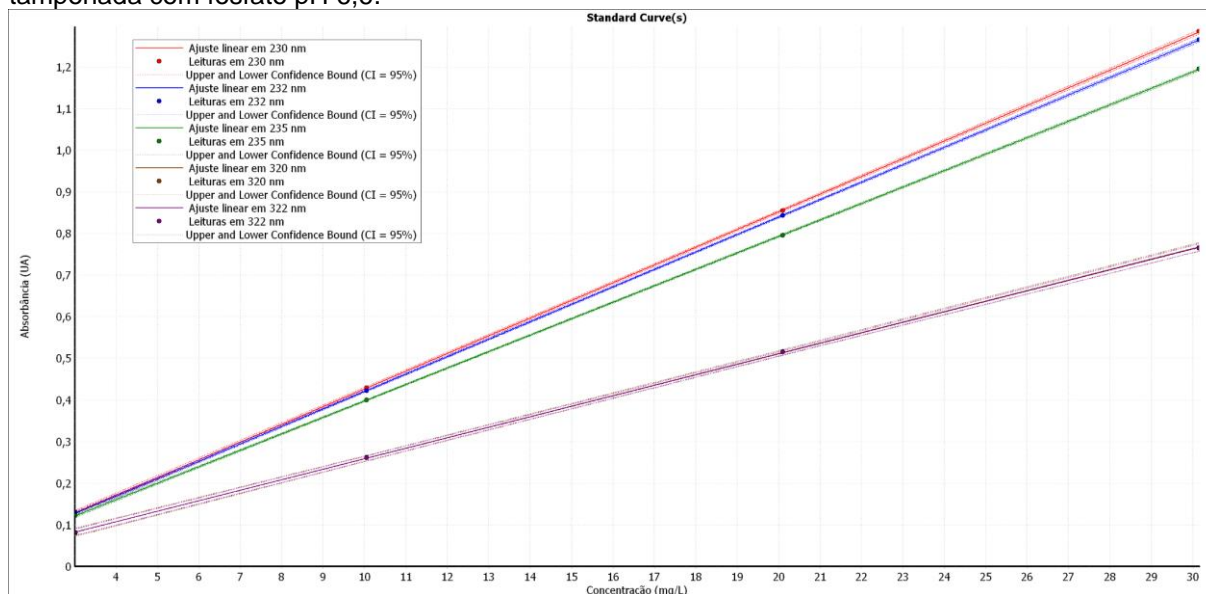
Visualmente observa-se comportamentos semelhantes entre os espectros da Figura 5.1-2 e Figura 5.1-3 onde se vê duas bandas de absorção com a primeira apresentando um platô de estabilidade. No entanto quando se compara mais detalhadamente, nota-se que a região dos comprimentos 230, 232 e 235 nm apresenta uma maior estabilidade em pH 2,2 do que com pH 6,6.

Um olhar um pouco mais atento na segunda banda pode evidenciar que o comprimento de onda de pico está entre e 327 e 329 nm, no entanto essa mesma região apresenta comprimentos de pico entre 320 e 322 nm quando o pH é 6,6, ou seja, houve um deslocamento espectral de aproximadamente 7 nm quando o pH varia de 2,2 para 6,6. Comportamento aproximado também é observado na literatura, (ADHIKARI *et al.*, 2021; GARZÓN *et al.*, 2015), que evidencia a mudança do espectro em função da variação do pH do meio.

Na comparação das duas bandas de absorção espectral a primeira representa uma maior estabilidade frente a variação de pH, logo explorar a primeira banda em questões analíticas pode gerar métodos mais robustos.

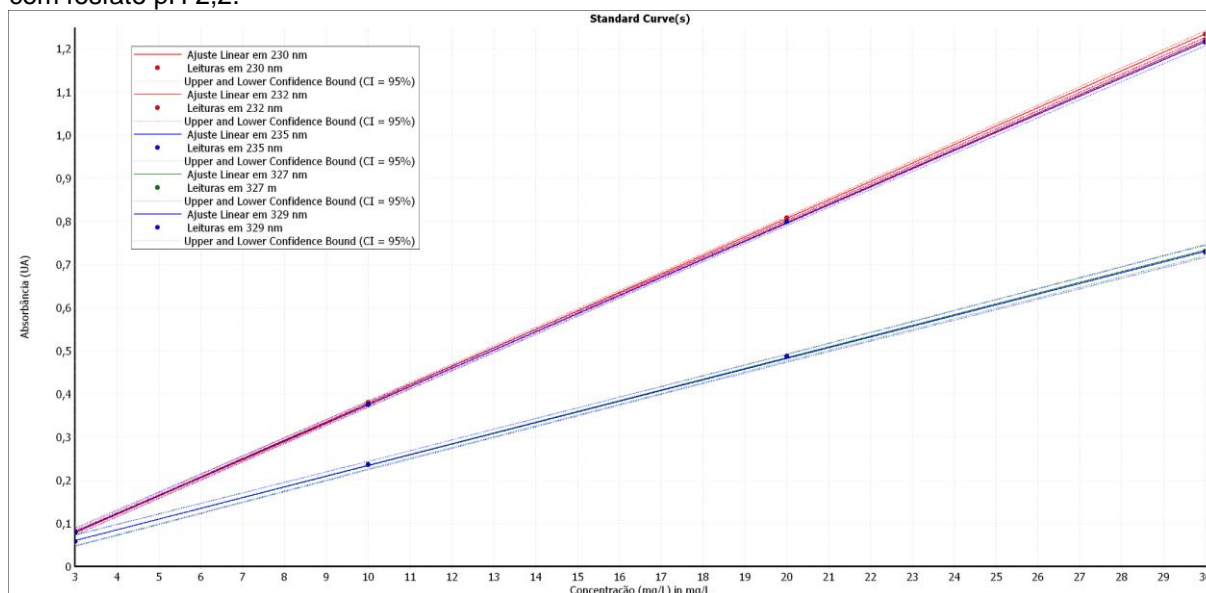
As análises até então trazem à mente uma questão: Qual seria a melhor configuração de pH e comprimento de onda para se estabelecer uma curva de calibração? No intuito de responder essa questão calculou-se curvas de calibração exploratórias para os conjunto de dados das Figura 5.1-2 e Figura 5.1-3 gerando as Figura 5.1-4 e Figura 5.1-5, que são relativas ao pH 6,6 e 2,2 respectivamente.

Figura 5.1-4 Curva de calibração para da concentração da ácido gentísico em função da absorbância nos comprimentos de onda 230, 232, 235, 320 e 322 nm para soluções com etanol 50% e água tamponada com fosfato pH 6,6.



Onde: AU representa unidades de absorbância. Na legenda as linhas identificam cada curva ajustada pelo método dos mínimos quadrados, os pontos identificam as leituras experimentais. Fonte: o autor.

Figura 5.1-5 Curva de calibração da concentração da ácido gentísico em função da absorbância nos comprimentos de onda 230, 232, 235, 327 e 329 nm para soluções com etanol 50% e água tamponada com fosfato pH 2,2.



Onde: AU representa unidades de absorbância. Na legenda as linhas identificam cada curva ajustada pelo método dos mínimos quadrados, os pontos identificam as leituras experimentais. Fonte: o autor.

Visualmente pode-se identificar que pela Figura 5.1-4 e Figura 5.1-5 que as curvas na de calibração para a primeira banda de absorção, ou seja, que envolvem os comprimentos de onda de 230, 232, 235 nm, apresentam coeficiente angular maiores, tanto para as soluções tamponadas em pH 6,6 ou pH 2,2; o que representa

uma vantagem sobre as curvas traçadas na segunda banda de absorção que compreendem os comprimentos de 320 e 322 nm para pH 6,6 e 327 e 329 nm para pH 2,2.

Tabela 5.1-1 Parâmetros do modelo de regressão linear por comprimento de onda e pH.

Wavelength (nm)	Fit results are based on OD values for pH 6.6				Wavelength (nm)	Fit results are based on OD values for pH 2.2			
		95% CI min	95% CI max			95% CI min	95% CI max		
230	Slope	0,04253	0,04222	0,04283	230	Slope	0,04278	0,04237	0,04318
	Offset	0,00129	-0,00449	0,00707		Offset	-0,04890	-0,05654	-0,04127
	r	1,00000	-	-		r	1,00000	-	-
	r ²	0,99999	-	-		r ²	0,99999	-	-
232	Slope	0,04188	0,04164	0,04212	232	Slope	0,04230	0,04201	0,04258
	Offset	0,00147	-0,00306	0,00600		Offset	-0,04832	-0,05366	-0,04298
	r	1,00000	-	-		r	1,00000	-	-
	r ²	1,00000	-	-		r ²	1,00000	-	-
235	Slope	0,03950	0,03931	0,03969	235	Slope	0,04205	0,04152	0,04258
	Offset	0,00267	-0,00092	0,00626		Offset	-0,04490	-0,05489	-0,03492
	r	1,00000	-	-		r	0,99999	-	-
	r ²	1,00000	-	-		r ²	0,99998	-	-
320	Slope	0,02524	0,02464	0,02583	237	Slope	0,02492	0,02419	0,02565
	Offset	0,00654	-0,00463	0,01771		Offset	-0,01427	-0,02797	-0,00056
	r	0,99997	-	-		r	0,99995	-	-
	r ²	0,99994	-	-		r ²	0,99991	-	-
322	Slope	0,02519	0,02471	0,02566	329	Slope	0,02482	0,02401	0,02562
	Offset	0,00678	-0,00222	0,01578		Offset	-0,01414	-0,02929	0,00101
	r	0,99998	-	-		r	0,99994	-	-
	r ²	0,99996	-	-		r ²	0,99989	-	-

Nota: Modelo linear: $OD = Slope \cdot [\text{concentração em mg/L}] + Offset$, onde *Slope* corresponde ao coeficiente angular da reta e *Offset* o coeficiente linear. OD é a absorbância em UA. 95% CI min. e max. são os limites inferior e superior do intervalo de confiança em nível de 95%. Fonte: o autor.

No intuito de propiciar uma avaliação mais numérica encontra-se acima a Tabela 5.1-1, onde é possível avaliar os parâmetros do modelo de regressão linear. Nota-se que os coeficientes de correlação de Pearson tendem a 1, ou seja, apontando uma excelente correlação, no entanto, no universo de boas correlações que constam nesta tabela é possível notar que para os comprimentos de onda de 230, 232 e 235 nm em pH 6,6 o coeficiente angular, que na tabela é representado por *slope*, de 0,04253, 0,04188 e 0,03950 enquanto os mesmos comprimentos de onda para o pH

2,2 apresentam 0,04237, 0,04201 e 0,04152. Os modelos para pH 6,6 possuem um intervalo de coeficiente angular de 0,00302, que é maior quando comparado como o intervalo análogo para o pH 2,2 que é de 0,00073. Esse comportamento matemático vem de encontro com a análise gráfica dos espectros contidos na Figura 5.1-2 e Figura 5.1-3, onde o patamar mais estável do espectro da Figura 5.1-3 levou a uma menor variação do coeficiente angular com a variação do comprimento de onda.

Existindo a possibilidade de escolha de pH para análise espectrofotométrica o mais ácido, 2,2, apresenta resultados ligeiramente melhores que os comparados com os de pH 6,6. Da mesma forma, caso exista a possibilidade de escolha do comprimento de onda, 232 nm apresenta ligeira vantagem que os demais no pH 2,2 visto o coeficiente de correlação de Pearson ser 1,00, sendo sua versão quadrática logicamente também igual a 1.

No conjunto de dados do comprimento de 232 nm quando aplica-se equação (9), obtém-se Limite de Detecção (LD): 81,8 µg/L e a aplicação da equação (10) gera um Limite de Quantificação (LQ): 247,9 µg/L.

As informações levantadas até aqui possibilitaram a abordagem de outra técnica analítica como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou seu nome em língua inglesa *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) com o uso de detector UV.

5.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com uso de detector UV

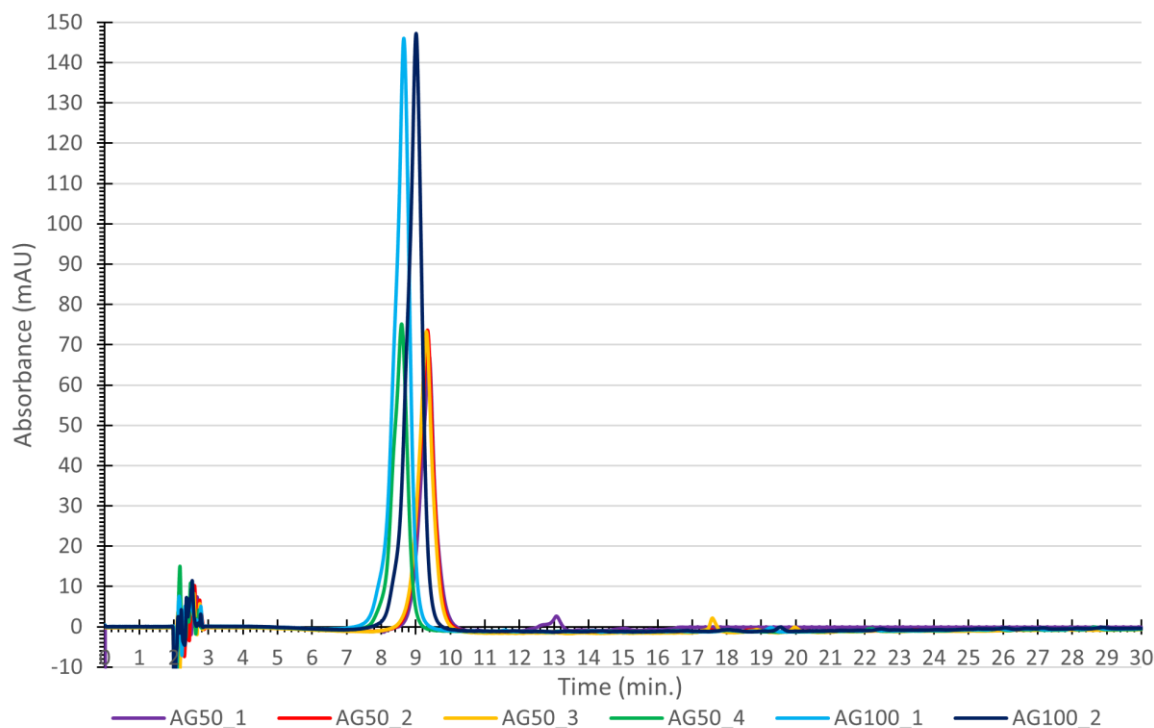
A exploração da técnica cromatográfica líquida seguiu algumas das premissas da química verde como a fase móvel o mais adequada possível ao meio ambiente e a saúde do operador do equipamento como discutido por Byrne *et al.* (2016), Henderson *et al.* (2011), Prat *et al.* (2015) e Prat, Hayler e Wells (2014). Neste

alinhamento, preferiu-se a cromatografia líquida de fase reversa e o uso de água como fase móvel e etanol como modificador orgânico.

Visto que o ácido gentísico possui pKa baixo, como revisado na Tabela 2.6-2, faz-se necessário o uso de modificador da fase móvel no intuito de controlar a ionização do composto. Uma alternativa classificada como verde, pelos mesmos autores citados no parágrafo anterior, é o ácido acético, mas como discutido no item 5.1, a faixa de absorção no UV do ácido acético apenas possibilita sua utilização da segunda banda de absorção do ácido gentísico. Neste sentido utilizou-se a condição cromatográfica de gradiente exploratório iniciando em 5 até 100% de etanol, água acidificada com 2% de ácido acético, sendo a vazão 0,8 mL/min, coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm, detector UV ajustado em 320 nm, tempo de corrida cromatográfica de 30 min e volume de injeção de 20 µL.

O padrão comercial do ácido gentísico foi diluído em etanol nas concentrações de 50 e 100 µg/L e injetadas no cromatógrafo gerando os dados usados na confecção da Figura 5.2-1.

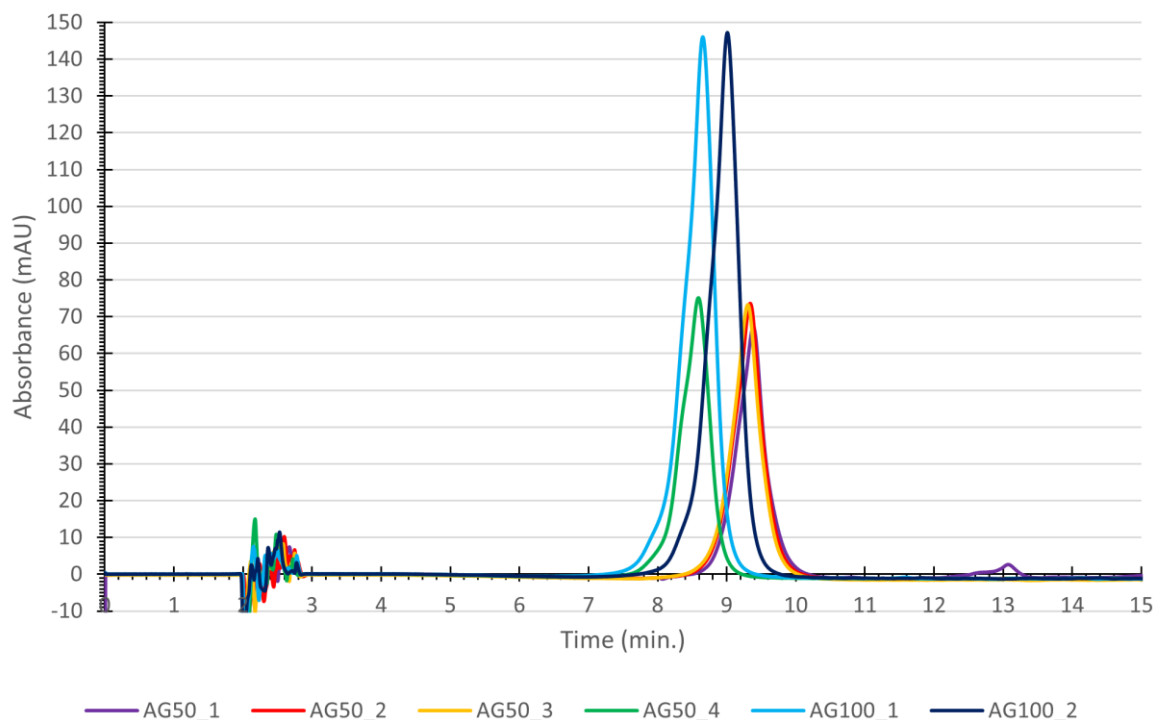
Figura 5.2-1 Cromatograma comparativo entre injeções com 50 e 100 µg/mL de ácido gentísico.



Dados: O autor. Onde: AG50_1 a AG50_4 representam injeções repetidas de padrões de 50 µg/mL e AG100_1 e AG100_2 injeções em duplicatas com padrões de 100 µg/mL. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 30 min. Detector: UV em 320 nm. Taxa de amostragem: para AG50_1 e AG50_2 10 Hz, para as outras corridas 20 Hz.

Uma análise preliminar da Figura 5.2-1 permite identificar que o tempo de retenção do ácido gentísico está em torno de 9 minutos e que praticamente não existiu separação de outros compostos que absorvem em 320 nm, vide exceção no tempo cromatográfico de 13 e 17,5 minutos aproximadamente, onde alguma impureza foi separada. No intuito de se investigar melhor a região do tempo de retenção obteve-se a Figura 5.2-2 que representa os dados da Figura 5.2-1, mas com tempo de corrida cromatográfica limitado até 15 minutos.

Figura 5.2-2 Cromatograma limitado a 15 min de corrida. Comparação entre injeções com 50 e 100 µg/mL de ácido genticico.

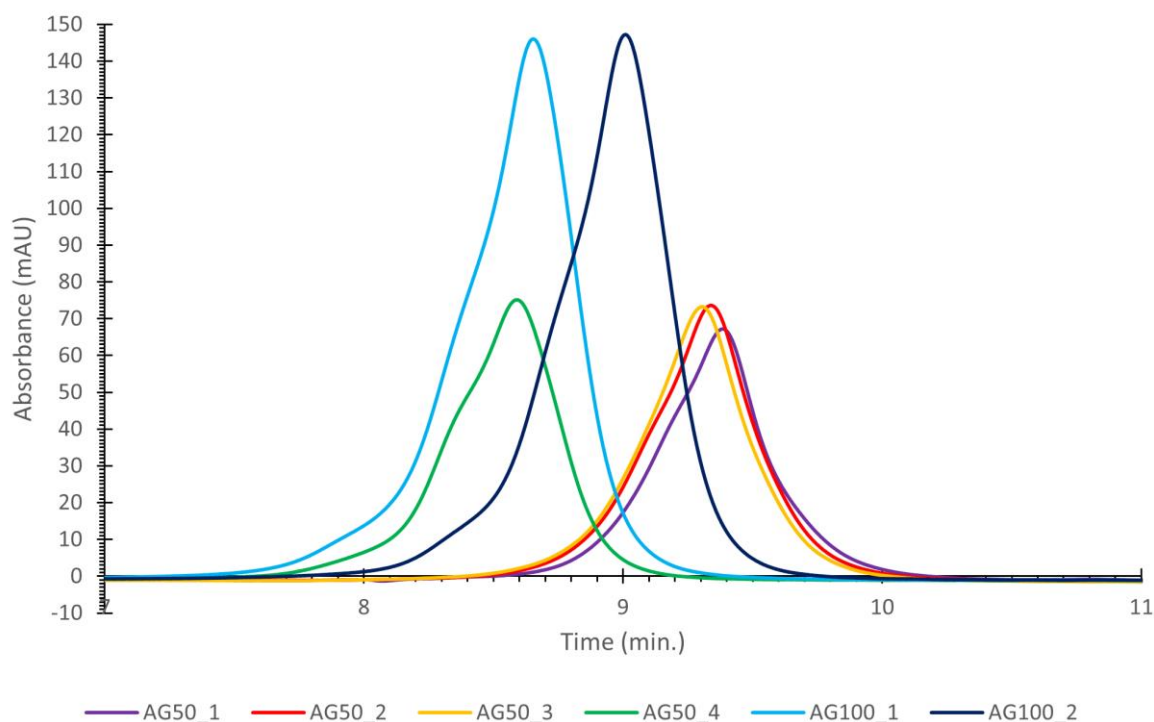


Dados: O autor. Onde: AG50_1 a AG50_4 representam injeções repetidas de padrões de 50 µg/mL e AG100_1 e AG100_2 injeções em duplicatas com padrões de 100 µg/mL. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 30 min, mas com exibição dos primeiros 15 minutos. Detector: UV em 320 nm. Taxa de amostragem: para AG50_1 e AG50_2 10 Hz, para as outras corridas 20 Hz.

Visualmente pela Figura 5.2-2 nota-se que as áreas formadas entre a linha da absorbância e a linha de base são semelhantes para as mesmas concentrações.

No entanto, chama a atenção a falta de estabilidade em relação ao tempo de retenção o que pode ser melhor verificado por meio da Figura 5.2-3 que explora justamente a região dos picos.

Figura 5.2-3 Picos cromatográficos em evidências de variação do tempo de retenção.



Dados: O autor. Onde: AG50_1 a AG50_4 representam injeções repetidas de padrões de 50 µg/mL e AG100_1 e AG100_2 injeções em duplicatas com padrões de 100 µg/mL. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 30 min, mas com exibição entre 7 e 11 minutos. Detector: UV em 320 nm. Taxa de amostragem: para AG50_1 e AG50_2 10 Hz, para as outras corridas 20 Hz.

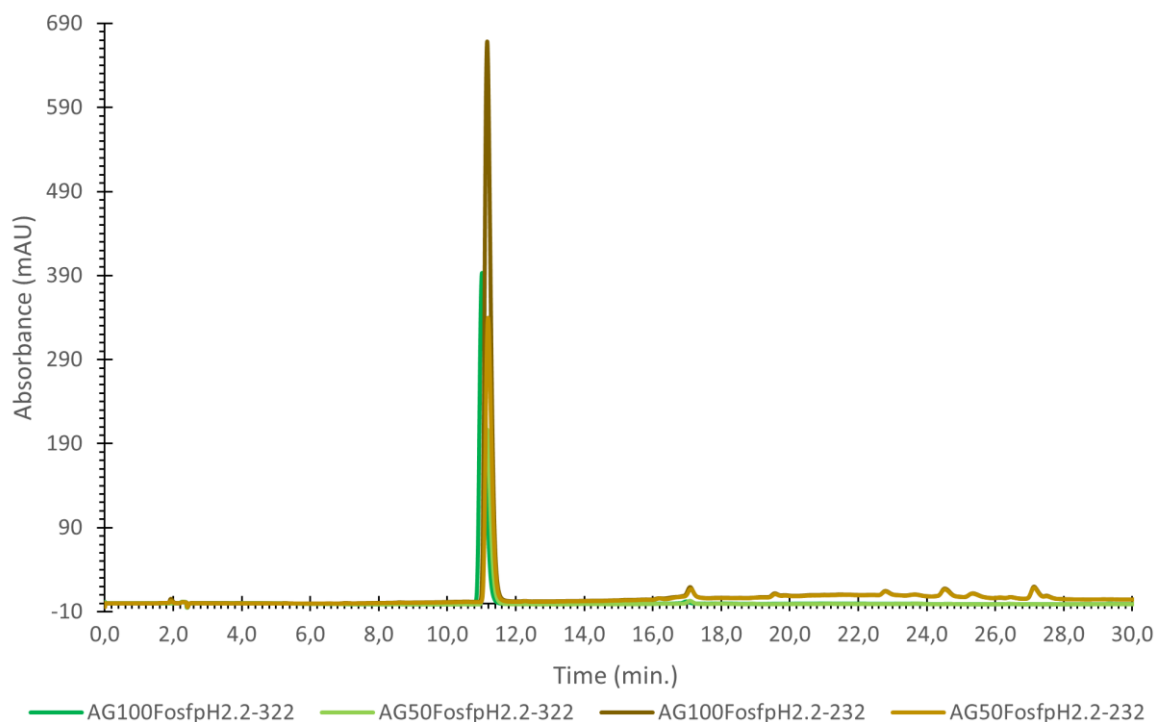
A variação do tempo de retenção pode ser causada por variação na concentração do modificador orgânico, temperatura da coluna, variação de pH quando a amostra tem ionização, flutuações na velocidade da fase móvel, ou seja, vazão (DOLAN, 2014; DONG, 2005), mas é geralmente causada por variação na temperatura da coluna, (DONG, 2005).

Visto que um equipamento com forno de coluna não estava disponível na época da execução dos experimentos tentou-se melhorar as outras questões apontadas pelos pesquisadores acima citados.

A primeira tentativa consistiu em mudar o controle de ionização para tampão de ácido fosfórico na concentração de 25 mM obtendo-se a fase aquosa no pH de $2,24 \pm 0,04$. O ácido fosfórico permite que se utilize as duas bandas de absorção do ácido genticóico no espectro UV, logo foram realizadas corridas cromatográficas com

o detector UV em 232 e 322 nm e como o instrumento não possibilita a leitura de mais de um comprimento de onda simultaneamente executou-se uma corrida cromatográfica para cada comprimento de onda nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, obtendo assim a Figura 5.2-4.

Figura 5.2-4 Cromatogramas utilizando ácido fosfórico como controle de ionização.

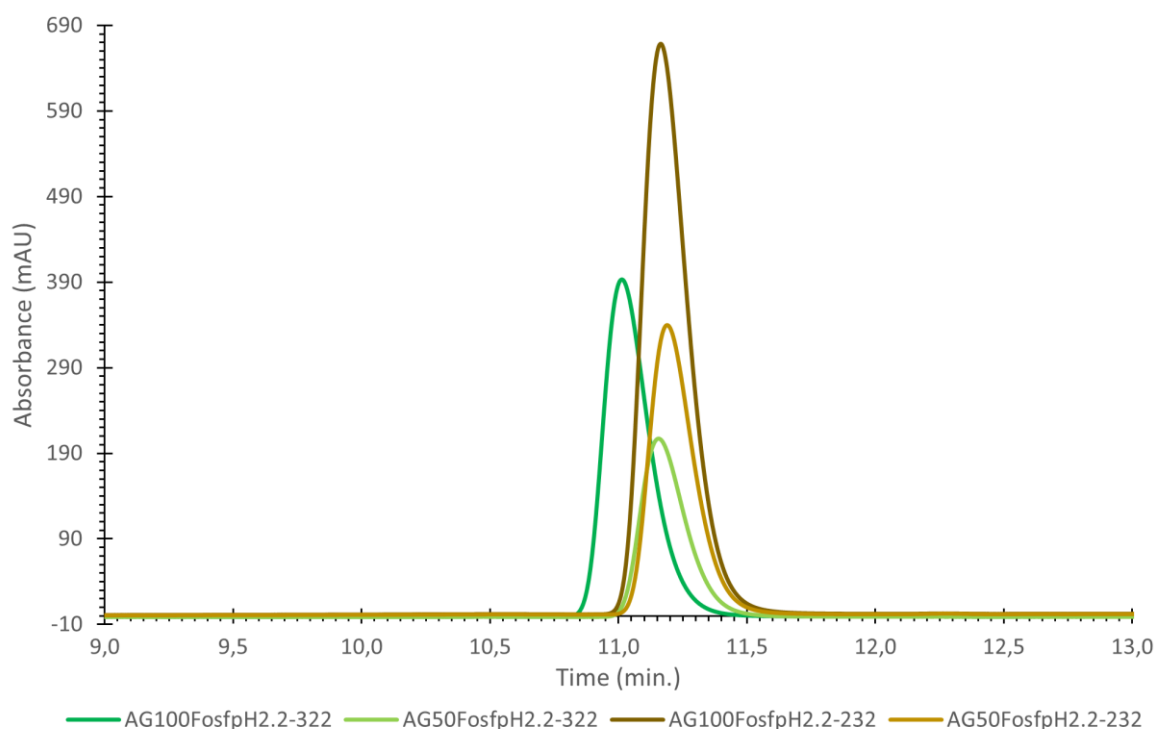


Dados: O autor. Onde: AG100 a AG50 representam injeções de padrões de 50 µg/mL e 100 µg/mL. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 0 a 30 min. Corridas em tom verde detector: em 322 nm e em tom marrom 232 nm. Taxa de amostragem: 20 Hz.

Nota-se que o ácido fosfórico promoveu uma melhor concentração na coluna cromatográfica uma vez que a largura do pico é menor quando se compara a Figura 5.2-4 e Figura 5.2-1. Outro ponto bem visível é o efeito da leitura em comprimento de onda de maior sensibilidade na Figura 5.1-1 para uma concentração de 100 µg/L de ácido gentísico quando o pico atinge aproximadamente 146 mUA de absorbância em 320 nm, já na Figura 5.2-4, para a mesma concentração atinge-se aproximadamente 668 mUA em 232 nm. Existe um pouco do efeito de mais estreito, melhor processo de separação, mas o principal efeito é a leitura em comprimento de onda de maior

sensibilidade. No entanto, ainda resta analisar qual seria a estabilidade do tempo de retenção com a utilização do ácido fosfórico como controlador de ionização, assim gera-se a Figura 5.2-5 no intuito de elucidar essa questão.

Figura 5.2-5 Picos cromatográficos do ácido gentísico usando ácido fosfórico como controle de ionização.



Dados: O autor. Onde: AG100 a AG50 representam injeções de padrões de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 30 min, mas com exibição de 9 a 13 min. Corridas em tom verde detector: em 322 nm e em tom marrom 232 nm. Taxa de amostragem: 20 Hz.

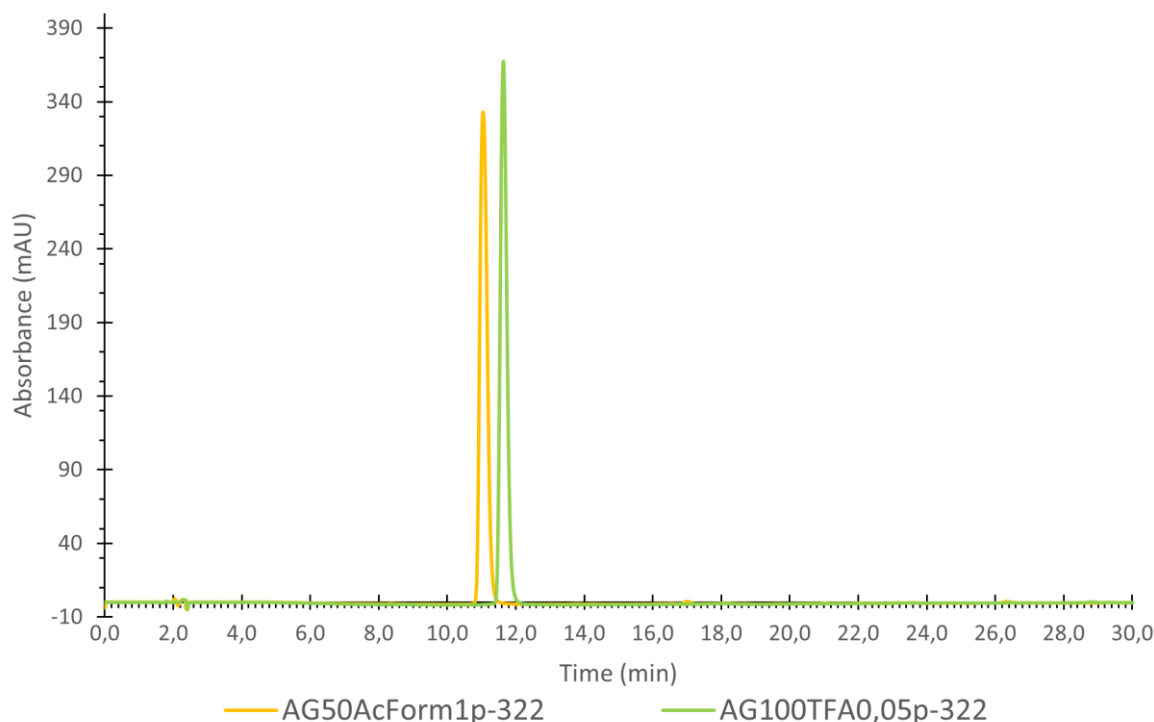
A inspeção da Figura 5.2-5 apresenta uma variação de 0,18 minutos no tempo de retenção o que é consideravelmente melhor que 1 minuto obtido quando o controle de ionização era feito por meio do ácido acético. Recomenda-se que a variação no tempo de retenção esteja entre 0,02 e 0,05 minutos, (DOLAN, 2014; SNYDER *et al.*, 2010), logo o resultado obtido está acima do recomendado pelos autores. Quando se divide 0,18 minutos de variação pela média dos tempos de retenção, 11,01 minutos, obtém-se 1,63%, talvez a variação percentual do tempo de retenção fosse uma base de comparação, no entanto não se obteve referências confiáveis para esse parâmetro.

A utilização do formato de coluna com as condições cromatográficas testadas pode ser uma oportunidade para que o tempo de retenção esteja dentro da recomendação dos autores.

Um inconveniente do tampão de ácido fosfórico é que não pode ser usado em detector do tipo massas (MS). Caso exista a intenção de fazer-se a extensão do método de separação desenvolvido para esse tipo de detector deve-se fazê-lo com modificadores compatíveis, assim duas outras opções de controlador de ionização seriam o ácido fórmico e uma opção que foge da premissa do desenvolvimento via química verde seria o ácido trifluoroacético (TFA).

Testou-se tanto o ácido fórmico quanto o ácido trifluoroacético, na concentração de 1 e 0,05% da fase aquosa, respectivamente, gerando os cromatogramas da Figura 5.2-6. No entanto, apenas as primeiras duas injeções foram bem-sucedidas, visto que o sistema de aquisição de dados do cromatógrafo parou de funcionar após alguns minutos de início nas demais injeções, não possibilitando assim, a execução da estratégia de verificação da estabilidade do tempo de retenção para esses dois controladores de ionização.

Figura 5.2-6 Comparação dos cromatogramas dos padrões de ácido gentísico usando ácido fórmico e ácido trifluoroacético como controle de ionização.



Dados: O autor. Onde: AG100 e AG50 representam injeções de padrões de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$. Condição cromatográfica: Gradiente de 5 a 100% de etanol. Vazão: 0,8 mL/min. Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18, 95A, 4,6x150 mm. Tempo Cromatográfico de 0 a 30 min. Detector: em 322 nm. Taxa de amostragem: 20 Hz.

Pode-se notar que para a mesma quantidade de ácido gentísico o ácido fórmico a 1% da fase móvel foi mais efetivo que o tampão de ácido fosfórico a 25 mM, quando compara-se a altura do pico da Figura 5.2-5 obtido em 322 nm para 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gentísico obteve-se um pico de altura aproximada de 202 mUA enquanto para a mesma concentração do analito usando o ácido fórmico como controle de ionização obteve-se altura aproximada de 390 mUA na Figura 5.2-6. Entretanto, o mesmo não aconteceu para o ácido trifluoroacético que obteve altura aproximada de 362 mUA para 100 $\mu\text{g/mL}$ de ácido gentísico enquanto o tampão fosfato obteve 390 mUA, ou seja, uma leitura semelhante ou ligeiramente menor. Esses dados mostram que ainda podem existir oportunidade de otimização nas concentrações usadas de aditivos da fase aquosa para controle de ionização. A oportunidade não foi explorada pelo fato de

o cromatógrafo não permitir a execução de corridas de 30 minutos no momento do desenvolvimento analítico.

Visto a indisponibilidade de um cromatógrafo com forno de coluna para o controle de temperatura e o fato do sistema de aquisição de dados do equipamento ter parado antes da finalização do método, optou-se por pelo desenvolvimento de outra técnica analítica.

5.3 Espectrofotometria de fluorescência

No intuito de entender o comportamento do espectro de emissão do ácido gentísico preparou-se uma solução de ácido gentísico de 0,6 mg/L e como diluente usou-se etanol grau HPLC 50% (v/v). Sendo a amostra submetida a leitura de excitação de 250 a 400 nm e leitura de emissão de 380 a 530 nm obtendo-se a Figura 5.3-1. Analisando a figura pode-se observar uma saturação do detector em uma ampla área o que demonstra que o ácido gentísico possui alta fluorescência e que é necessário diluir a amostra para obter-se uma leitura que seja passível de análise.

Figura 5.3-1 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,6 mg/L de ácido gentísico.

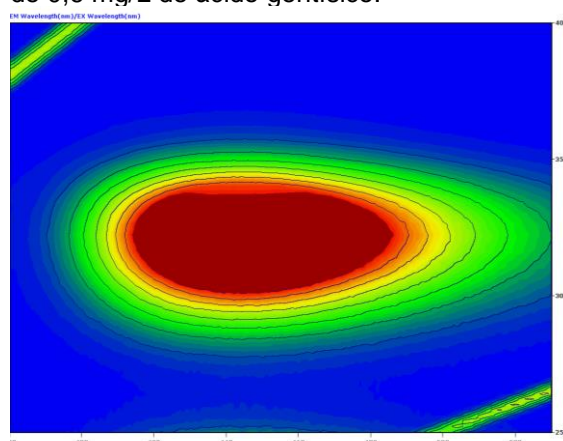
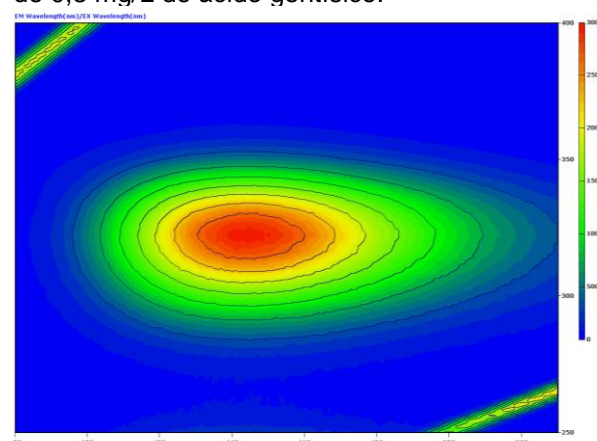


Figura 5.3-2 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,3 mg/L de ácido gentísico.

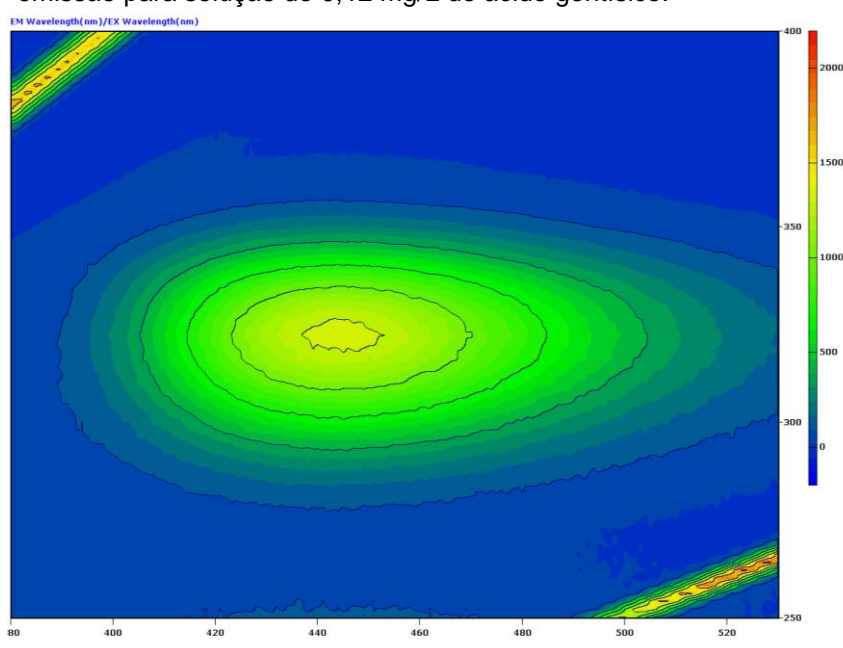


Fonte: o autor. Onde: comprimento de onda de excitação de 250 a 400 nm e leitura de emissão de 380 a 530 nm. Espectrômetro de Fluorescência marca Shimadzu RF- 6000. Concentração de 0,6 e 0,3 mg/L respectivamente.

Diluindo-se a amostra obteve-se uma concentração de 0,3 mg/L gerando-se a Figura 5.3-2 onde pode-se notar que ainda existe saturação do detector, mas percebe-

se que o pico de emissão estaria entre 430 e 450 nm e o de excitação entre 310 e 330 nm, assim dilui-se novamente obtendo-se uma solução de 0,12 mg/L que gerou o espectro da Figura 5.3-3.

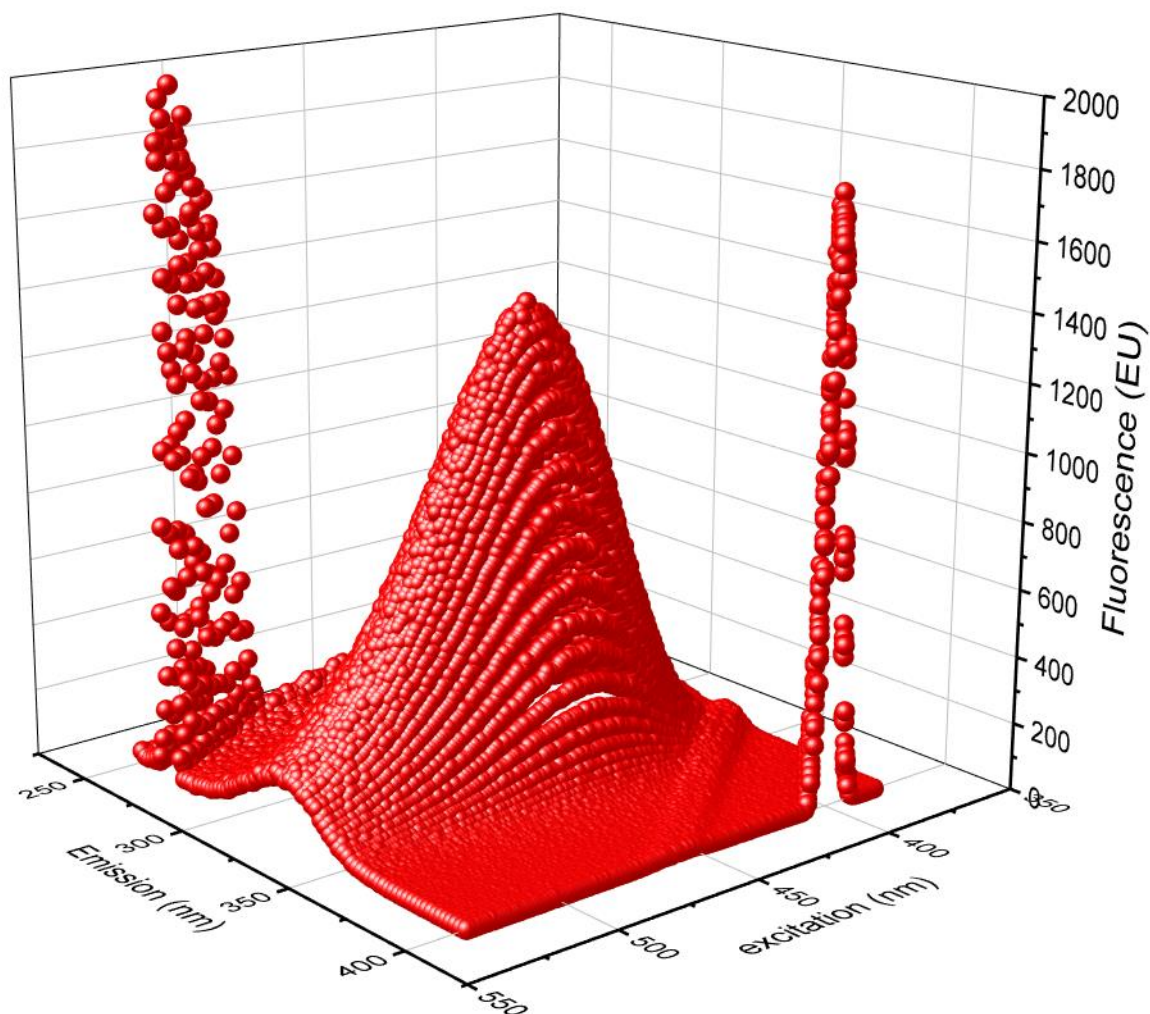
Figura 5.3-3 Espectro de fluorescência de varredura em excitação e emissão para solução de 0,12 mg/L de ácido gentísico.



Fonte: o autor. Onde: comprimento de onda de excitação de 250 a 400 nm e leitura de emissão de 380 a 530 nm. Espectrômetro de Fluorescência marca Shimadzu RF- 6000.

Pode-se observar que a emissão máxima estaria entre 443 e 449 nm e a excitação 318 e 324 nm, visto que por uma questão da resolução da imagem não se pode identificar visualmente o ponto máximo. A exportação dos dados e sua plotagem deve resolver isso, no entanto o espectrômetro de fluorescência exporta os dados em formato não adequado para a representação em três dimensões, assim foi necessário reorganizá-los para o formato conhecido como “Tidy” e para isso construiu-se um *script* em R, com o arquivo de resposta obteve-se a Figura 5.3-4.

Figura 5.3-4 Representação tridimensional da emissão de fluorescência em função do comprimento de onda de emissão e excitação para o ácido gentísico a 0,12 mg/L.



Fonte: o autor. Onde: comprimento de onda de excitação de 350 a 550 nm e leitura de emissão de 250 a 400 nm.

A análise da Figura 5.3-4 leva a conclusão de que a máxima fluorescência acontece quando a substância é excitada entre 444 e 446 nm, já que a resolução do equipamento é 2 nm para esse tipo de análise, sendo a maior intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 322 nm, que se chama comprimento de emissão. Esses dados estão alinhados com as observações de Adhikari *et al.* (2021) que reportou que o ácido gentísico em água tem a emissão máxima em 322 nm e quando em etanol 325 nm, os autores também reportaram que a máxima excitação para ativo em água estaria no comprimento de onda de 444 nm e quando solubilizado

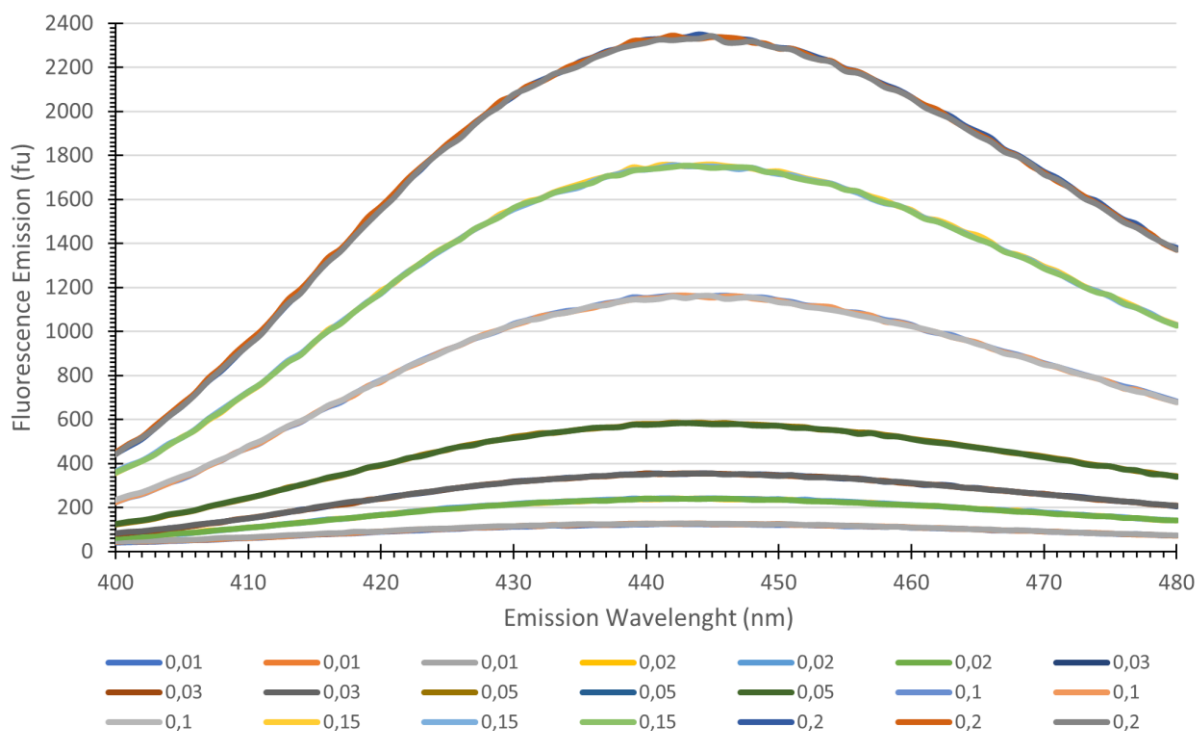
em etanol 445 nm. Já Stallings e Schulman (1975) reportaram dados apenas para a solução aquosa do ácido gentísico onde encontraram um comprimento de emissão de 318 nm e 442 nm para excitação. Considera-se que os dados experimentais estão alinhados com a literatura mesmo que não se trate de condições exatamente iguais, uma vez que, os autores trazem dados do analito em solução aquosa ou etanólica e neste trabalho usa-se solução etanol e água a 50% (v/v).

Uma vez os ensaios exploratórios em consonância com a literatura. Definiu-se como comprimento de onda de excitação 320 nm e comprimento de onda para leitura da emissão em 446 nm.

5.3.1 Curva de calibração

Uma vez definido os parâmetros analíticos, preparou-se soluções etanólicas 50% (v/v) nas seguintes concentrações de ácido gentísico: 0,010, 0,020, 0,030, 0,050, 0,100, 0,150 e 0,200 mg/L em triplicata. O espectro de fluorescência para excitação em 320 nm em função do comprimento de onda de emissão encontra-se na Figura 5.3-5. A intensidade de fluorescência no comprimento de onda de 446 nm para cada triplicata e os parâmetros mais relevantes da regressão linear em função da concentração de ácido gentísico estão disponíveis na Tabela 5.3-1. Os dados de regressão foram calculados primeiramente por meio de planilha eletrônica e depois verificados utilizando o *software* estatístico JASP, (JASP TEAM, 2023). As telas com os resultados da regressão linear encontram-se nos apêndices nas páginas 164 a 167.

Figura 5.3-5 Espectro de fluorescência para diversas concentrações de ácido genticico.



Onde: valores da legenda estão em mg/L. Comprimento de onda de excitação de 320 nm. A unidade de medida do eixo abscissa é unidade de fluorescência (fu). Fonte: o autor.

A análise da Tabela 5.3-1 mostra que as três curvas de calibração apresentaram resultados satisfatórios como coeficiente de correção quadrático de Pearson tendendo a 1,000, estatística F maior que o limite de valor de p tendendo a zero.

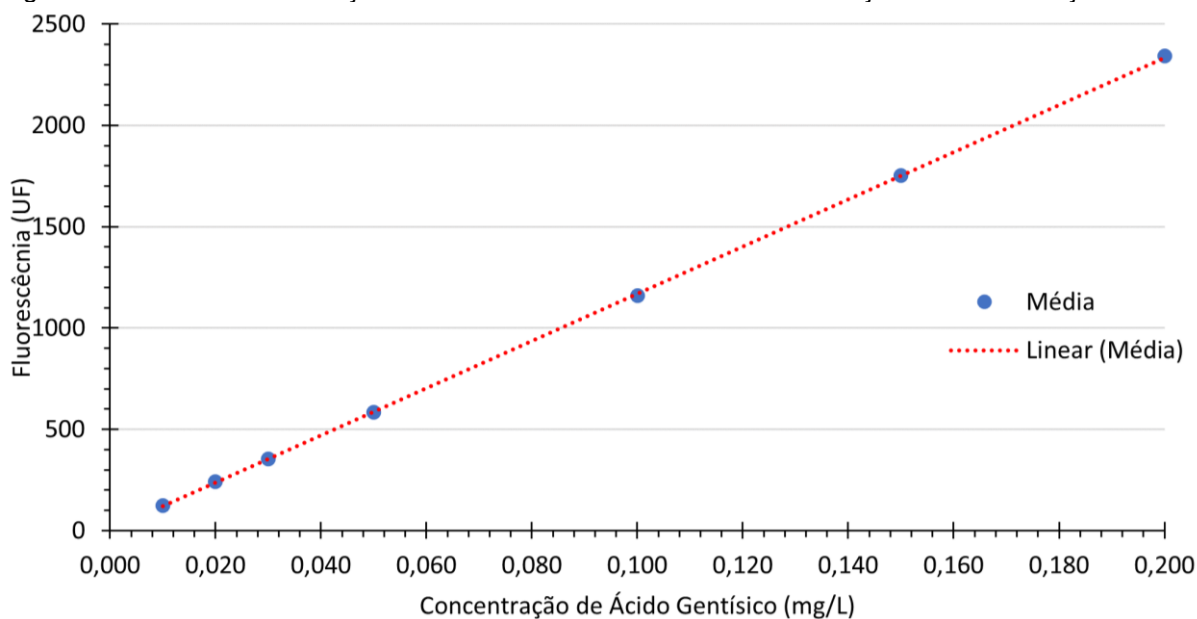
A última coluna, da mesma tabela, representa a média das leituras da intensidade de fluorescência para cada ponto de concentração. Isso gera um novo conjunto de dados que foram usados como uma curva de calibração adicional. Nota-se que da mesma forma que as três curvas apresentaram resultados satisfatórios o mesmo acontece com a curva média ou a quarta curva de calibração. Aplicou-se essa curva aos experimentos que demandam a medição do teor de ácido genticico. A representação gráfica está disponível na Figura 5.3-6.

Tabela 5.3-1 Resumo dos parâmetros de regressão linear para as três curvas de calibração.

Concentração (mg/L)	Intensidade de fluorescência (UF)			
	1	2	3	Média
0,010	124,394	124,092	125,643	124,710
0,020	240,557	241,278	241,343	241,059
0,030	354,511	354,585	355,694	354,930
0,050	583,491	585,488	579,306	582,762
0,100	1162,859	1154,805	1161,342	1159,669
0,150	1760,061	1751,576	1742,514	1751,384
0,200	2341,122	2339,082	2343,159	2341,121
R ²	1,0000	0,9999	0,9999	1,0000
Coeficiente Angular	11678,000	11643,647	11643,748	11655,132
Coeficiente Linear	3,902	4,352	4,072	4,109
Erro Coef. Angular	30,0549	40,5101	45,1888	34,2456
Erro Coef. Linear	3,1399	4,2322	4,7209	3,5777
F	150975,6261	82613,4030	66393,3919	115831,3292
p	2,1429×10 ⁻¹²	9,6743×10 ⁻¹²	1,6708×10 ⁻¹¹	4,1562×10 ⁻¹²

Fonte: o autor.

Figura 5.3-6 Curva de calibração da Intensidade de fluorescência em função da concentração.



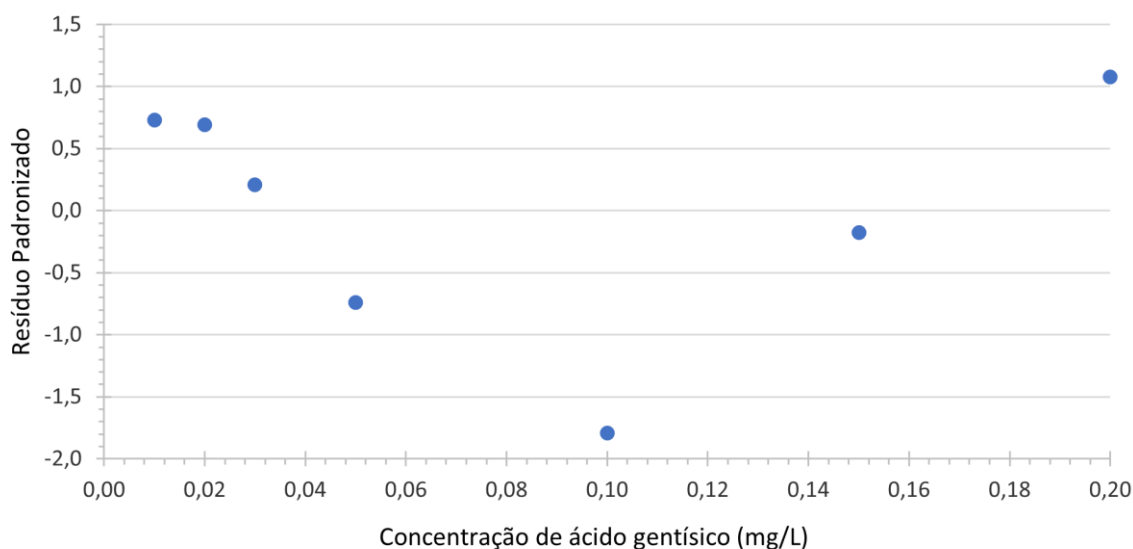
Onde: pontos representam a média da Tabela 5.3-1. Comprimento de onda de excitação de 320 nm. A unidade de medida do eixo abscissa é unidade de fluorescência (UF). Fonte: o autor.

Dados adicionais estão disponíveis no item 8.4, onde pode-se notar que o intervalo de confiança para o coeficiente angular é de 11567,1008 a 11743,1628, logo como o intervalo não inclui o zero, pode-se considerar que este é significativamente diferente de zero, que é um dos requisitos do modelo de regressão linear.

5.3.2 Análise de homoscedasticidade vs. heterocedasticidade

Um dos pressupostos da análise de regressão linear é que as variâncias são homogêneas, pelo menos de forma ideal. A representação gráfica dos resíduos calculados na Tabela 8.5-1, que encontra-se nos apêndices, pode ser vista por meio da Figura 5.3-7 abaixo.

Figura 5.3-7 Representação gráfica dos resíduos do ajuste linear em função da concentração.



Fonte: dados obtidos pelo autor.

Uma forma mais objetiva de verificar a questão da homoscedasticidade é por meio de testes do item 4.2.11.2. Onde os resultados encontram-se na Tabela 5.3-2.

Tabela 5.3-2 Resultado dos testes de heterocedasticidade calculado via software.

Testes de Homoscedasticidade	Estatística	p
Goldfeld-Quandt	26,97	0,134915
Breusch-Pagan	0,4449	0,504780
Harrison-McCabe	0,1758	0,149000

Fonte: dados o autor.

Visto o valor de significância estatística especificada para o trabalho no item 4.2.11, deve-se rejeitar H_0 caso os valores de p sejam menores que 0,05. No entanto, a análise dos resultados demonstra que não existe evidência para a rejeição de H_0 ,

logo, os resíduos da regressão linear da Figura 5.3-6 são homocedásticos, o que atinge o critério estabelecido no item 4.2.3.2.

5.3.3 Avaliação da normalidade dos resíduos

A verificação de outro pressuposto do modelo de regressão linear é a análise da normalidade dos resíduos entre os valores medidos e os previstos pelo modelo. A análise encontra-se na Tabela 5.3-3. Onde pelo número de observações que são 7 o teste mais adequado seria o Shapiro-Wilk. Pode-se notar que a significância estatística não atingiu o estabelecido no item 4.2.11, assim mantem-se H_0 , ou seja, não existe evidências para deixar de entender que os resíduos atendem a distribuição normal.

Tabela 5.3-3 Resultados dos testes de normalidade para os resíduos.

Teste de normalidade	Estatística	p
Shapiro-Wilk	0,9241	0,50221
Kolmogorov-Smirnov	0,1842	0,93817

Fonte: o autor.

Assim, após as verificações dos itens 5.3.1, 5.3.2 e neste último 5.3.3 atende-se os requisitos de linearidade previsto na Seção II da RDC 166, (ANVISA, 2017).

5.3.4 Limites de quantificação e detecção

Os limites foram calculados segundo as equações (9) e (10) onde σ é igual 3,5777 que foi obtido pelo erro padrão do coeficiente linear, “a” é o coeficiente angular que é 11655,132, vide ambos na Tabela 5.3-1. Aplicando-se os termos nas equações citadas obtém-se:

Limite de Detecção (LD): 0,00101 mg/L ou 1,01 $\mu\text{g/L}$.

Limite de Quantificação (LQ): 0,00307 mg/L ou 3,07 $\mu\text{g/L}$.

5.3.5 Especificidade ou seletividade

Os parâmetros de especificidade foram avaliados segundo método descrito no item 4.2.3.3 e os resultados encontram-se na Tabela 5.3-4.

Tabela 5.3-4 Resultado do ensaio de especificidade ou seletividade do método de espectrofotometria de fluorescência.

Substância Contaminante	Concentração Nominal	Amostra ($\mu\text{g/L}$)			Média ($\mu\text{g/L}$)	DP ($\mu\text{g/L}$)	DPR %
		1	2	3			
Ácido Clorídrico 1 mM	200	199,5	198,8	198,7	199,0	0,441	0,222
Peróxido de Hidrogênio 3%	200	195,1	196,6	195,8	195,9	0,745	0,381

Nota: o DPR é o desvio padrão relativo. Fonte: o autor.

Os resultados da Tabela 5.3-4 mostram que os requisitos de especificidade foram atingidos visto o desvio padrão relativo ser menor que 2%, (ANVISA, 2017; ICH, 1995, 2022).

5.3.6 Precisão

A precisão foi avaliada segundo método descrito no item 4.2.3.5 e os resultados encontram-se na Tabela 5.3-5.

Tabela 5.3-5 Precisão do método de espectrofotometria de fluorescência por faixa de concentração.

Faixa	Analista	Concentração ($\mu\text{g/L}$)		DP	DPR (%)	VAR	F	Fc	p
		Medido	Média						
Alta	1	200,5	200,5	0,175	0,087	0,031	1,454	19	0,407
		200,3							
		200,7							
	2	200,3	200,4	0,145	0,072	0,021			
		200,3							
		200,6							
Média	1	150,7	149,9	0,753	0,502	0,567	2,712	19	0,267
		150,0							
		149,1							
	2	149,7	150,0	0,457	0,305	0,209			
		150,5							
		149,8							
Baixa	1	30,1	30,1	0,057	0,189	0,003	4,546	19	0,180
		30,1							
		30,2							
	2	30,1	30,1	0,027	0,089	0,001			
		30,1							
		30,1							

Nota: DP é desvio padrão, VAR é variância, F é o valor do teste F e Fc é o valor crítico. Fonte: o autor.

As faixas de concentrações avaliadas como alta, 200 µg/L, média 150 µg/L e baixa 30 µg/L da Tabela 5.3-5 apresentam valores da estatística F sempre menor que F crítico (Fc), assim não havendo evidência para refutar a hipótese que não existe variação significativa associada aos analistas. O maior desvio padrão relativo (DPR) está abaixo de 2% indicando que o método é adequado em termos de precisão, (ANVISA, 2017; ICH, 1995, 2022)

5.3.7 Exatidão

O ensaio de exatidão foi realizado segundo método descrito no item 4.2.3.4, onde emulsões com ácido gntísico, que tem seu desenvolvimento relatado no item 5.7 Os resultados da Tabela 5.3-6 permitem avaliar que a porcentagem de recuperação está dentro dos limites de 98% e 102% e do desvio padrão relativo menor que 2%, assim atendendo os requisitos de exatidão,(ANVISA, 2017; ICH, 1995, 2022).

Tabela 5.3-6 Exatidão do método de espectrofotometria de fluorescência.

Emulsão % de AG	% medida	Recuperação (%)	DP (%)	DPR (%)
1,00	1,0129	101,29	0,01389	1,371
0,50	0,5094	101,89	0,00753	1,478
0,15	0,1494	99,57	0,00214	1,433

Nota: DP é desvio padrão, DPR é o desvio padrão relativo. Fonte: o autor.

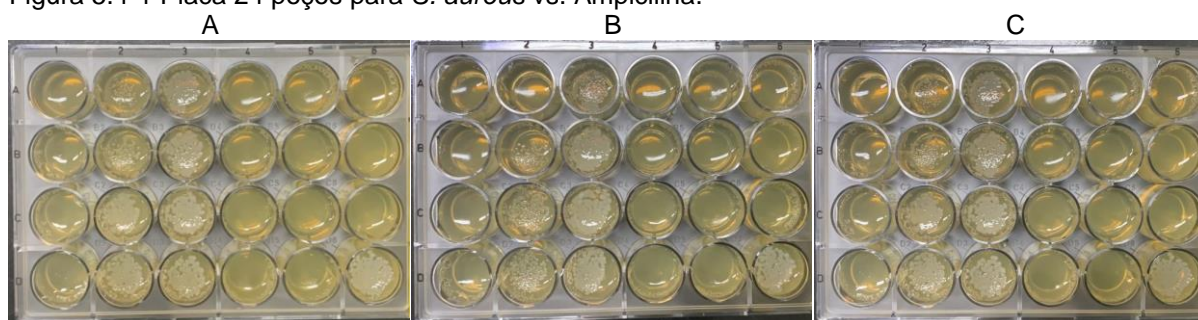
5.4 Avaliação do potencial antimicrobiano

O potencial antimicrobiano para o ácido gntísico foi avaliado segundo a metodologia descrita no item 4.2.8 para os microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cutibacterium acnes*.

5.4.1 *Staphylococcus aureus*

Os ensaios para *S. aureus* podem ser verificados por meio da Figura 5.1-4 A, B e C como visto abaixo.

Figura 5.4-1 Placa 24 poços para *S. aureus* vs. Ampicilina.



Concentração Inibitória para AG de 4,20 mg/mL e menor que 3,5 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG de 4,05 mg/mL e menor que 3,5 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG de 4,20 mg/mL e menor que 3,5 µg/mL para Ampicilina

Fonte: o autor com colaboração da equipe do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR.

Nota-se por meio da análise visual que a menor concentração de ácido gentísico que inibiu o crescimento do *Staphylococcus aureus* 4,15 e desvio padrão de 0,09 mg/mL. No entanto, todas as concentrações de ampicilina testadas inibiram o crescimento do *S. aureus*, logo considera-se que a concentração de inibição é menor que 3,5 µg/mL.

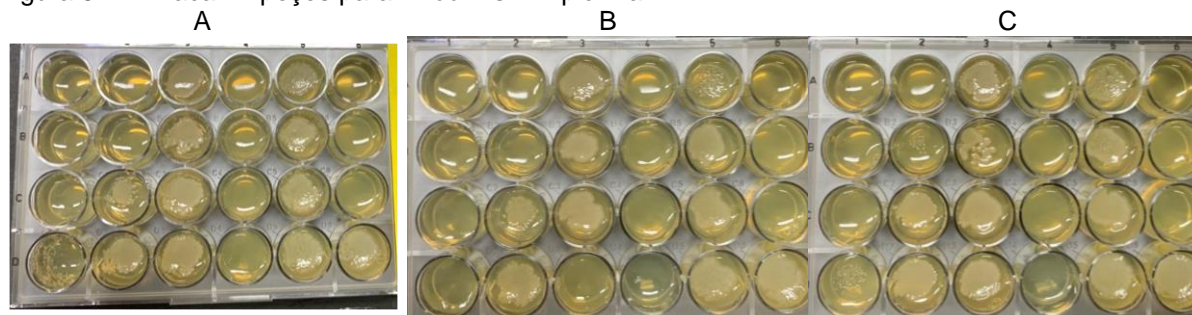
No item 2.4.1 pode-se verificar que dois autores apresentam dados diferentes para a MIC do *S. aureus*, sendo Kalinowska *et al.* (2021) utilizando-se de método semelhante obteve 5 mg/mL, no entanto, Feldeková *et al.* (2022) apresenta 5 mM, o que convertendo para a mesma unidade obtém-se 0,77 mg/mL. O resultado aqui obtido de 4,15 mg/mL está em consonância com o primeiro grupo de pesquisa, mas a consideravelmente diferente do segundo grupo.

Investigando um pouco mais o método utilizado por Feldeková *et al.* (2022) entende-se que primeiramente o grupo adicionou o ácido gentísico ao meio de cultura e depois o esterilizou. Aqui e em Kalinowska *et al.* (2021) a mistura ocorre após a esterilização do meio. Uma possível evidência seria o fato que Vandal *et al.* (2015) utilizou soluções de ácido gentísico até 1 mg/mL e não encontrou atividade microbiana.

5.4.2 *Escherichia coli*

Os ensaios para *E. coli* podem ser verificados por meio da Figura 5.4-2 A, B e C como visto abaixo.

Figura 5.4-2 Placa 24 poços para *E. coli* vs. Ampicilina.



Concentração Inibitória para AG
de 3,6 mg/mL e
14 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG
de 3,60 mg/mL e
14 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG
de 4,80 mg/mL e
14 µg/mL para Ampicilina

Fonte: o autor com colaboração da equipe do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR.

Note-se por meio da análise visual que a menor concentração de ácido gentísico que inibiu o crescimento do *Escherichia coli* foi de 4,00 e desvio padrão de 0,69 mg/mL. Já para a ampicilina obteve-se concentração de inibição de 14 µg/mL nas três repetições testadas o que geraria um desvio padrão de 0 µg/mL. Desta forma o teste demonstra uma MIC de 4,00 mg/mL e 0,14 µg/mL para o ácido gentísico e ampicilina respectivamente.

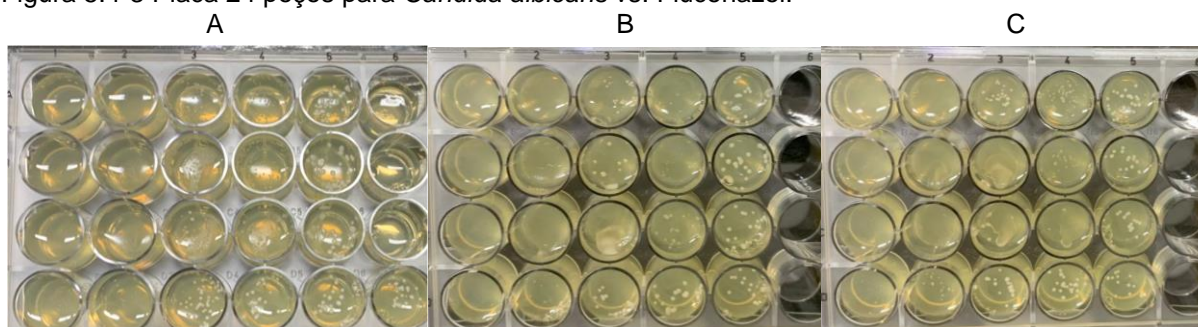
No entanto, um olhar um pouco mais detalhado demonstra que nas células A2 em todas as repetições, vide Figura 5.4-2, não houve crescimento de microrganismo. A célula D1 propiciou o crescimento da *E. coli*, mesmo com concentração de ácido gentísico maior que A2. Este fato pode indicar uma questão na execução do experimento, sendo uma hipótese que a célula A2 não foi inoculada com o microrganismo.

Na comparação dos resultados pode-se utilizar os dados da Tabela 2.4-2 onde os autores apresentaram MIC entre 3 e 5 mg/mL, o que está em consonância com o resultado aqui obtido de 4,0 mg/mL.

5.4.3 *Candida albicans*

Os ensaios para *C. albicans* podem ser verificados por meio da Figura 5.4-3 A, B e C como visto abaixo. Note-se por meio da análise visual que a menor concentração de ácido gentísico que inibiu o crescimento da *Candida albicans* foi de 3,00 e desvio padrão de 0,26 mg/mL. Já para o fluconazol não foi capaz de inibir o crescimento da *C. albicans*, como a maior concentração testada foi de 8 µg/mL, aponta-se concentração de inibição sendo maior que essa. Desta forma o teste demonstra uma MIC de 3,00 mg/mL para o ácido gentísico.

Figura 5.4-3 Placa 24 poços para *Candida albicans* vs. Fluconazol.



Concentração Inibitória para AG de 2,70 mg/mL e maior que 8 µg/mL para Fluconazol

Concentração Inibitória para AG de 3,15 mg/mL e maior que 8 µg/mL para Fluconazol

Concentração Inibitória para AG de 3,15 mg/mL e maior que 8 µg/mL para Fluconazol

Fonte: o autor com colaboração da equipe do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR.

Também pode-se verificar na Figura 5.4-3 B e C que a coluna de controles está vazia. Isto deve-se ao fato que o ágar estéril havia acabado sendo possível realizar a coluna de controles apenas na Figura 5.4-3 A. Visto que os controles estão adequados e as placas foram executadas no mesmo dia, assume-se que o resultado deste controle também se aplica as outras duas placas restantes.

O grupo de Kalinowska *et al.* (2021), que usa método semelhante, apresentou o MIC para o ácido gentísico de 5 mg/mL contra a *C. albicans*, no entanto não apresentaram a taxa de diluição seriada. Supondo-se que o próximo poço do trabalho referenciado seja 2,5 mg/mL o resultado estaria totalmente coerente com o obtido

neste experimento aqui apresentado, 3,00 mg/mL, uma vez que não haveria resolução suficiente para detectar esse valor no experimento do grupo citado.

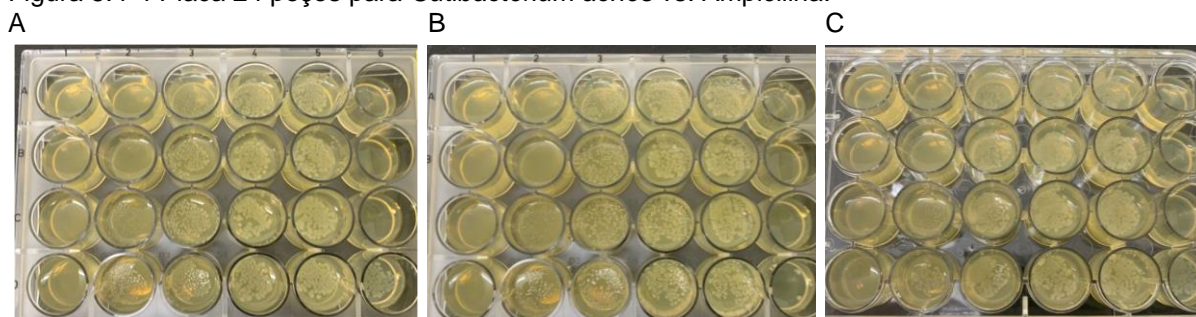
Já Vandal *et al.* (2015) utilizando o método de determinação de MIC por diluição seriada em placa de 96 poços, (SARKER *et al.*, 2007), obteve MIC de 1 mg/mL para a mesma cepa ATCC. Vistos os resultados de literatura variando entre 1 e 5 mg/mL, entende-se coerente o MIC de 3,00 mg/mL aqui apresentado.

5.4.4 *Cutibacterium acnes*

Os ensaios para *C. acnes* podem ser verificados por meio da Figura 5.4-4 A, B e C. Onde a imagem elucida que a menor concentração de ácido gentísico que inibiu seu crescimento foi de 3,60 mg/mL para as três repetições, gerando uma média aritmética de 3,60 e desvio padrão de 0 mg/mL. A ampicilina não foi capaz de inibir o crescimento da *Cutibacterium acnes*, como a maior concentração testada foi 0,5 µg/mL, aponta-se concentração de inibição sendo maior que essa. Desta forma o teste demonstra uma MIC de 3,60 mg/mL para o ácido gentísico.

Até a data de redação não foi possível encontrar referências, logo podendo o resultado para o *C. acnes* ser um dado inédito.

Figura 5.4-4 Placa 24 poços para *Cutibacterium acnes* vs. Ampicilina.



Concentração Inibitória para AG de 3,60 mg/mL e maior que 0,5 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG de 3,60 mg/mL e maior que 0,5 µg/mL para Ampicilina

Concentração Inibitória para AG de 3,60 mg/mL e maior que 0,5 µg/mL para Ampicilina

Fonte: o autor com colaboração da equipe do Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica do Departamento de Fármacos e Medicamentos da FCFAR.

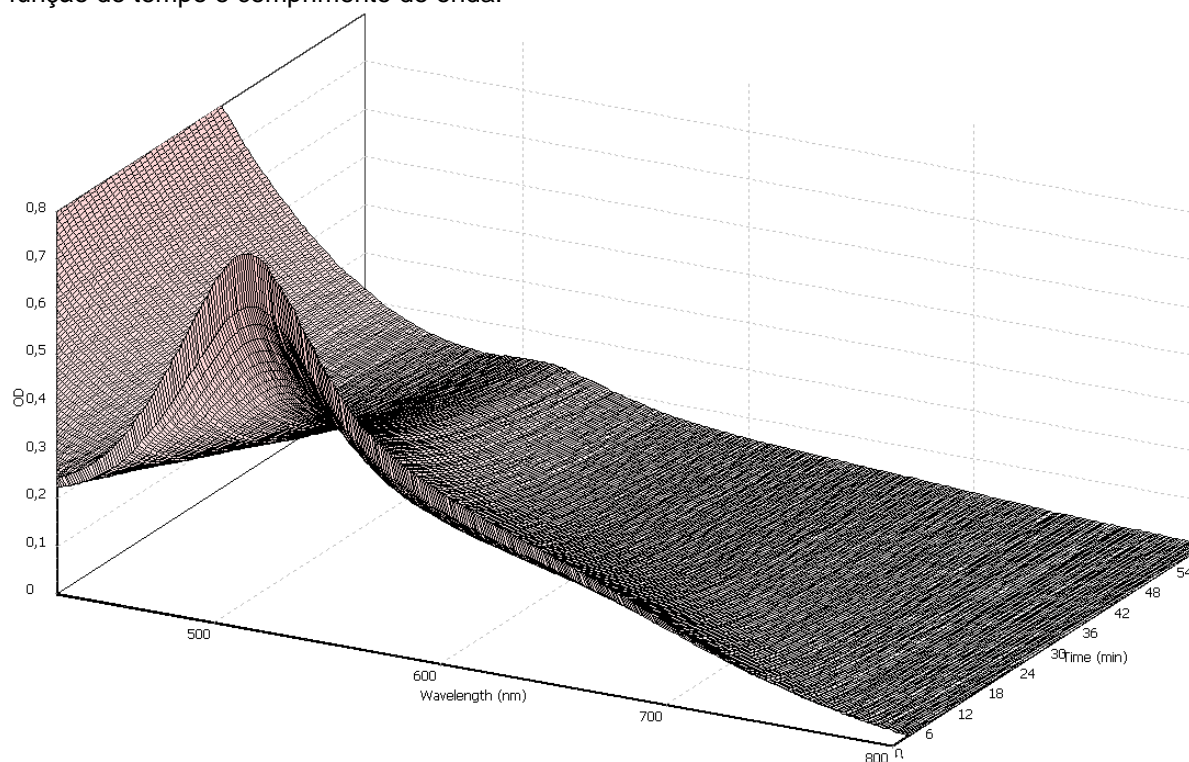
5.5 Avaliação do potencial antioxidante

No intuito de medir o potencial antioxidante do ácido gentísico aplicou-se o método cinético descrito no item 4.2.7 obtendo-se uma superfície de resposta que representa a intensidade de absorção de luz em função de duas variáveis: o comprimento de onda e o tempo de reacional.

A primeira superfície representa a concentração inicial de 170 μM de ácido gentísico e pode ser observada por meio da Figura 5.5-1. A curva em primeiro plano é relacionada à concentração de DPPH no início da reação que possui seu pico de absorção em 515 nm . Ao longo do tempo, que pode ser acompanhado no sentido da profundidade da imagem, vê-se que a curvatura se reduz gradualmente com o decorrer da reação. Já que a absorção neste comprimento de onda é da forma radicalar, a menor elevação da superfície no sentido do tempo reacional demonstra que essa forma está deixando de existir, ou seja, está sendo sequestrada pelo outro reagente, no caso, o ácido gentísico.

Nota-se que no período reacional avaliado não se alcançou um patamar estável para esta condição reacional, Figura 5.5-1. Indicação de que o estado de equilíbrio ou estado estacionário não foi alcançado mesmo após 60 minutos de acompanhamento do meio.

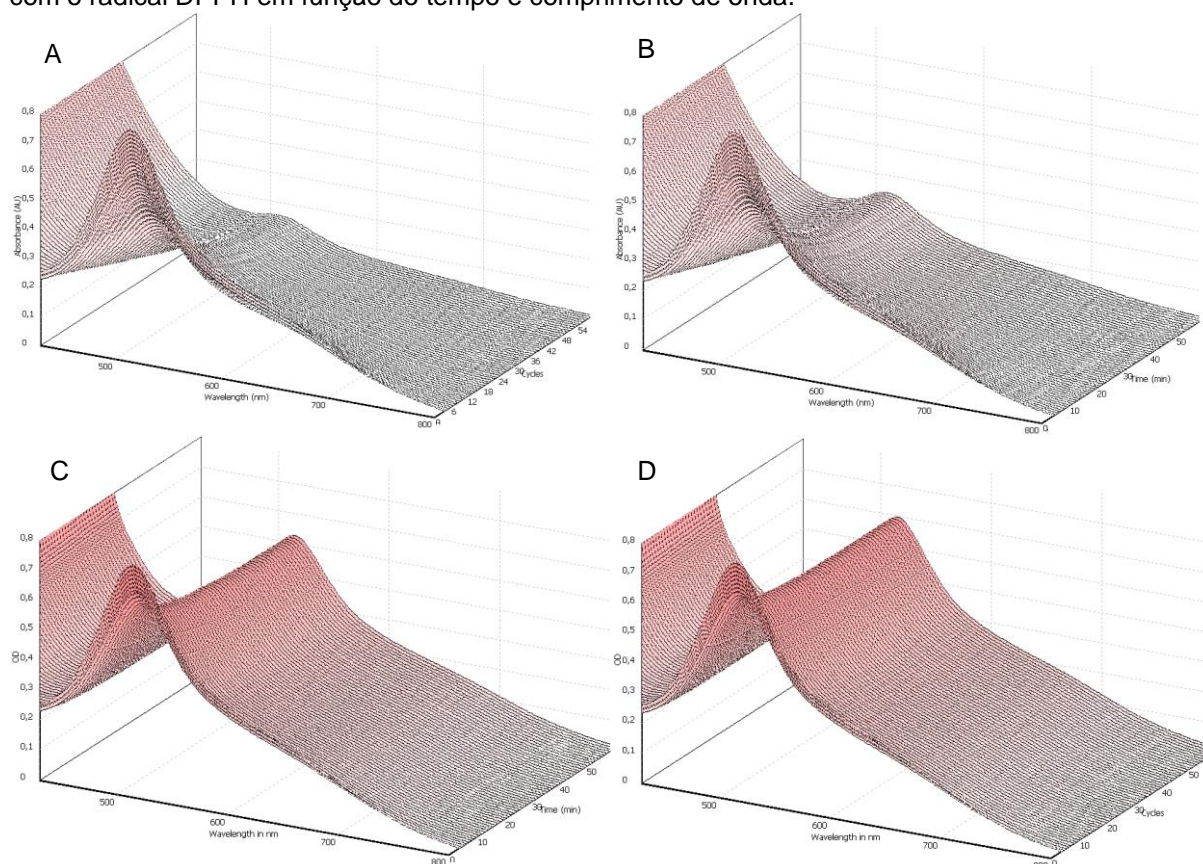
Figura 5.5-1 Superfície de resposta da absorção da reação de ácido gentísico 170 μM com DPPH em função do tempo e comprimento de onda.



Fonte: o autor.

Já a Figura 5.5-2 mostra o efeito de menores concentrações do ácido gentísico ao longo de seus quadrantes. Percebe-se que na concentração de 150 μM , quadrante A, o comportamento é semelhante ao da Figura 5.5-1. Já no quadrante B, 100 μM , a absorvância no período final da reação é maior do que no quadrante A, ou seja, menor quantidade de radical convertido e começa-se a notar a criação de um patamar de absorvância nos minutos finais da reação. Esse comportamento fica mais evidente no quadrante C, 50 μM , onde observa-se um patamar estável de absorvância bem estabelecido, o que indica que a reação atingiu seu estado estacionário. No quadrante D, 30 μM , percebe-se o mesmo comportamento com o patamar de estabilidade em uma absorvância maior, indicando que a reação atingiu seu estado de equilíbrio com uma menor quantidade de radical sequestrada, visto a menor quantidade de ácido gentísico adicionado.

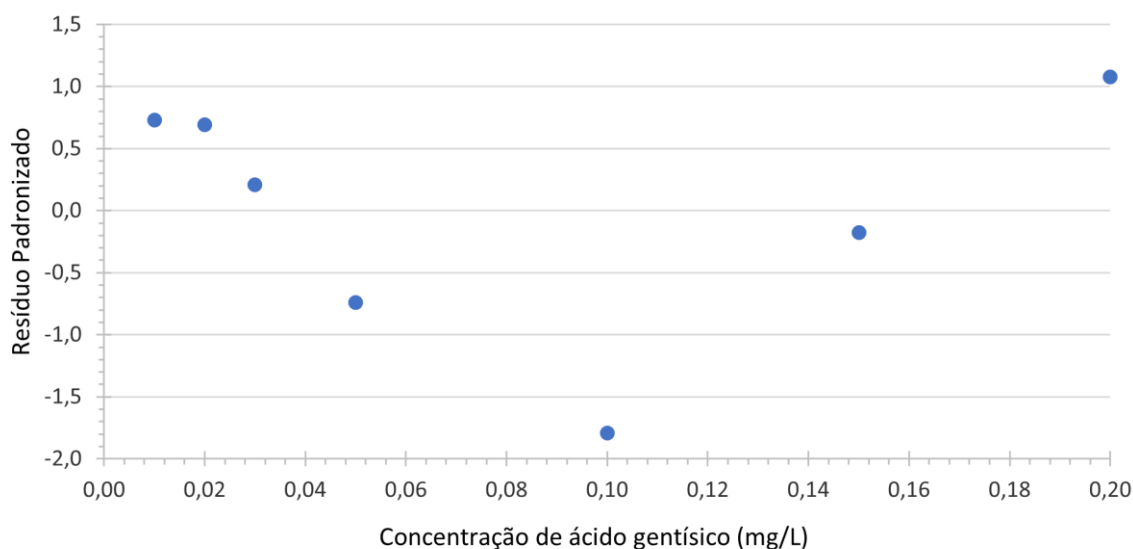
Figura 5.5-2 Superfície de resposta para diferentes concentrações de ácido gentsico em meio reacional com o radical DPPH em função do tempo e comprimento de onda.



Cada letra refere-se a uma concentração de ácido gentsico, sendo: A 150 μM , B 100 μM , C 50 μM e D 30 μM . Fonte: o autor.

Aplicando-se a equação (12) ao conjunto de dados, obteve-se a porcentagem de inibição relativa à quantidade inicial de DPPH (RSA) e elaborou-se a Figura 5.5-3. Percebe-se ao longo do tempo reacional que o comportamento da variável de resposta RSA está em sintonia com as avaliações dos espectros de absorção até então apresentados. As concentrações de 30, 50 e 100 μM de ácido gentsico atingiram o estado estacionário no período avaliado. No entanto, a primeira com 38 mim e a segunda e terceira com aproximadamente 55 mim. Já no caso das concentrações de 150 e 170 μM não alcançou-se o equilíbrio reacional no tempo de monitoramento.

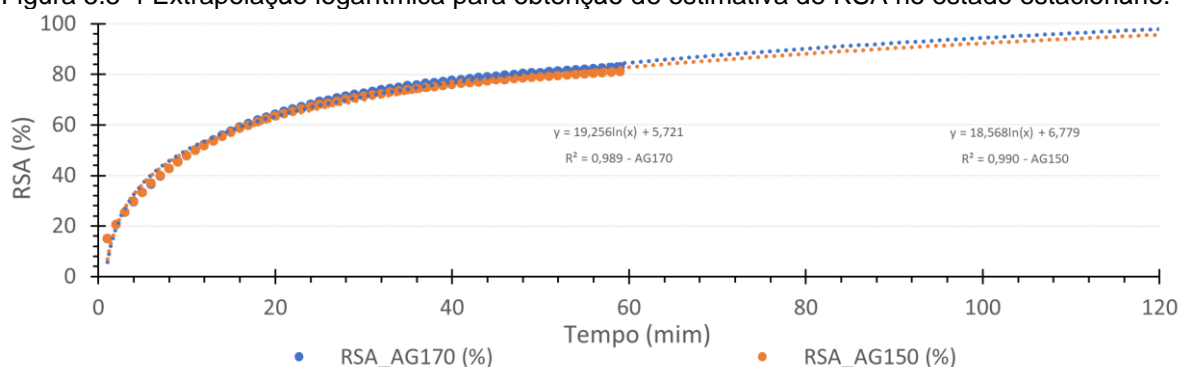
Figura 5.5-3 Inibição percentual do radical em função do tempo de reação.



Onde: RSA é *radical scavenging activity* que é a porcentagem de inibição da quantidade inicial de radical. Na legenda RSA_AG é seguida da concentração de ácido genticílico adicionado em μM . Fonte: o autor.

É importante obter-se a porcentagem de inibição radicalar (RSA) após a reação alcançar o estado estacionário, segundo a recomendação dos criadores do método adotado, (BONDET *et al.*, 1997; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995), o que também é apreciado por aqueles que fazem uma revisão crítica da metodologia, (KEDARE; SINGH, 2011; SCHAICH *et al.*, 2015; XIE; SCHAICH, 2014). No entanto, existem métodos que negligenciam essa recomendação, (GHASEMZADEH *et al.*, 2018a, 2018b; LEBEAU *et al.*, 2000; MENSOR *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2018). Assim, não seria recomendado considerar o parâmetro RSA para as concentrações de 150 e 170 μM sem ao menos uma estimativa do que seria a inibição mais à frente no tempo reacional. Portanto, aplicou-se uma extrapolação logarítmica, Figura 5.5-4, para obter-se uma estimativa da porcentagem de inibição do DPPH no estado estacionário.

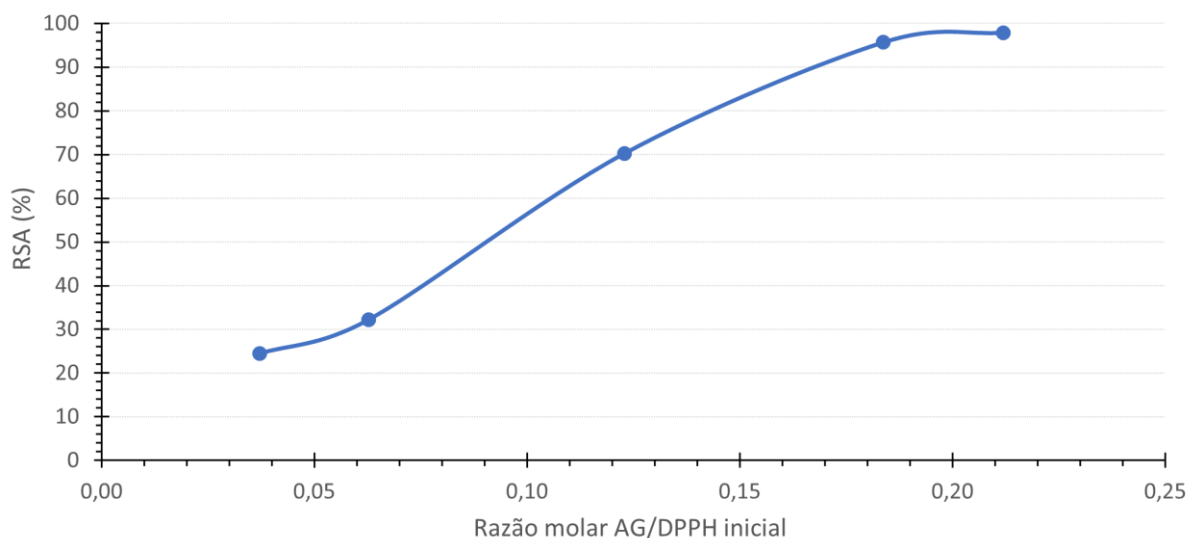
Figura 5.5-4 Extrapolação logarítmica para obtenção de estimativa de RSA no estado estacionário.



Onde: RSA é *radical scavenging activity* que é a porcentagem de inibição da quantidade inicial de radical. Na legenda RSA_AG é seguida da concentração de ácido gentísico adicionado em μM . Linha pontilhada representa o ajuste de uma função logarítmica para cada concentração. Fonte: o autor.

Uma vez de posse das estimativas, aplica-se a equação (13) para cada concentração testada, resultando nos pontos para a representação gráfica da porcentagem de inibição do radical em função da razão molar da concentração inicial de DPPH e ácido gentísico, Figura 5.5-5.

Figura 5.5-5 Porcentagem de Inibição do DPPH em função da razão molar.



Fonte: o autor, onde RSA é a porcentagem de inibição do radical DPPH no estado de equilíbrio.

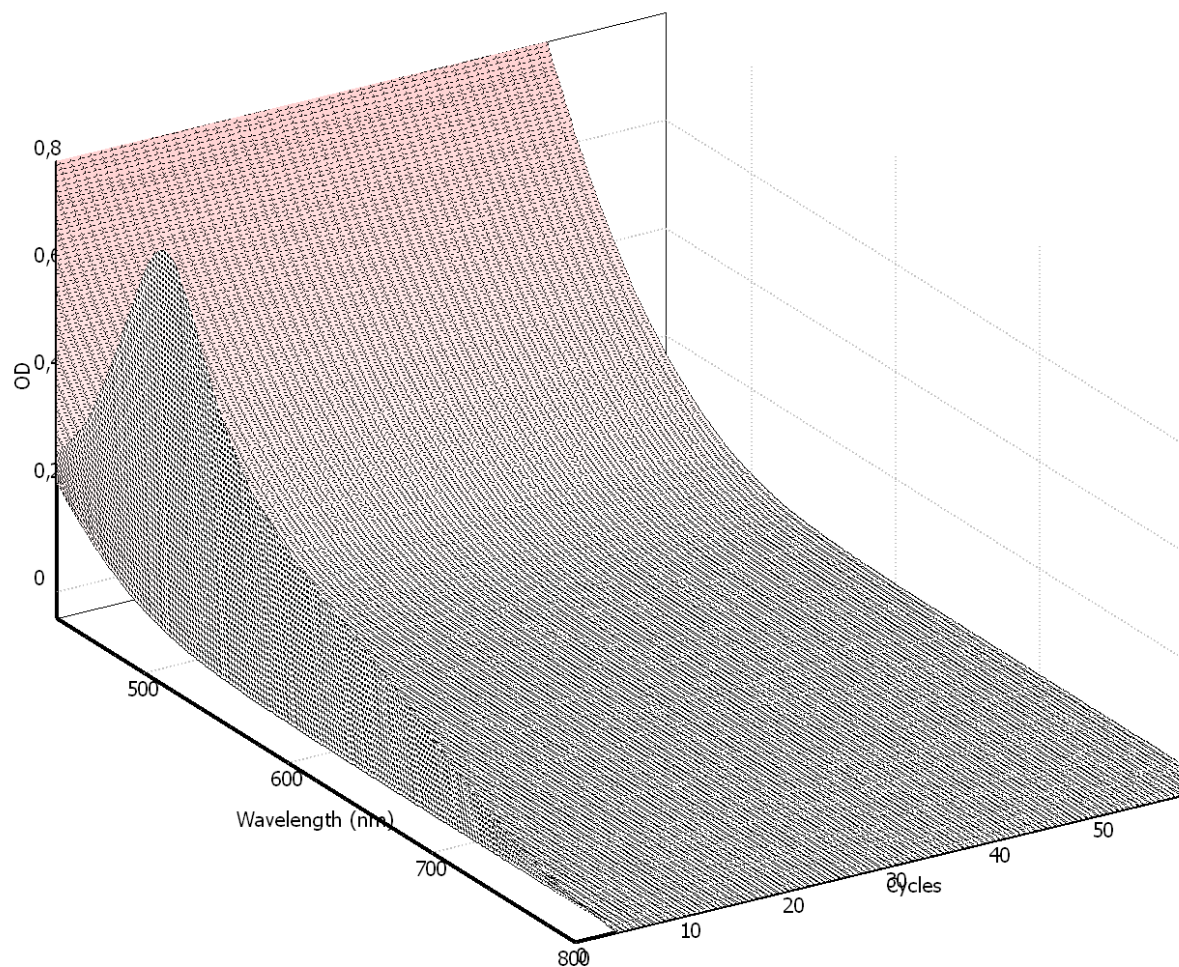
Obtém-se, por meio da Figura 5.5-5, a razão molar necessária para a inibição de 50% do radical inicialmente presente, sendo 0,09, esse parâmetro também conhecido como EC_{50} . Aplicando-se a equação (14) chega-se no *antioxidant reducing*

power (ARP) de 11,1 e o valor estequiométrico 5,6, sendo definido no item 4.2.7.3 como o dobro de EC₅₀.

Os resultados obtidos são exatamente os mesmos que os apresentados nos experimentos dos proponentes do método, (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995), assim demonstrando a coerência da execução e premissas adotadas.

Aplicou-se o mesmo procedimento para o ácido ascórbico. Contudo o comportamento cinético é bem diferente quando comparado ao ácido gentísico. Atinge-se o equilíbrio em menos de um minuto, o que pode ser observado por meio da Figura 5.5-6 onde apenas a primeira leitura detecta absorvância em 0,74 OD já a segunda, 1 minuto após, obtém leitura de 0,03 OD e mantém-se neste patamar até o final do período observado.

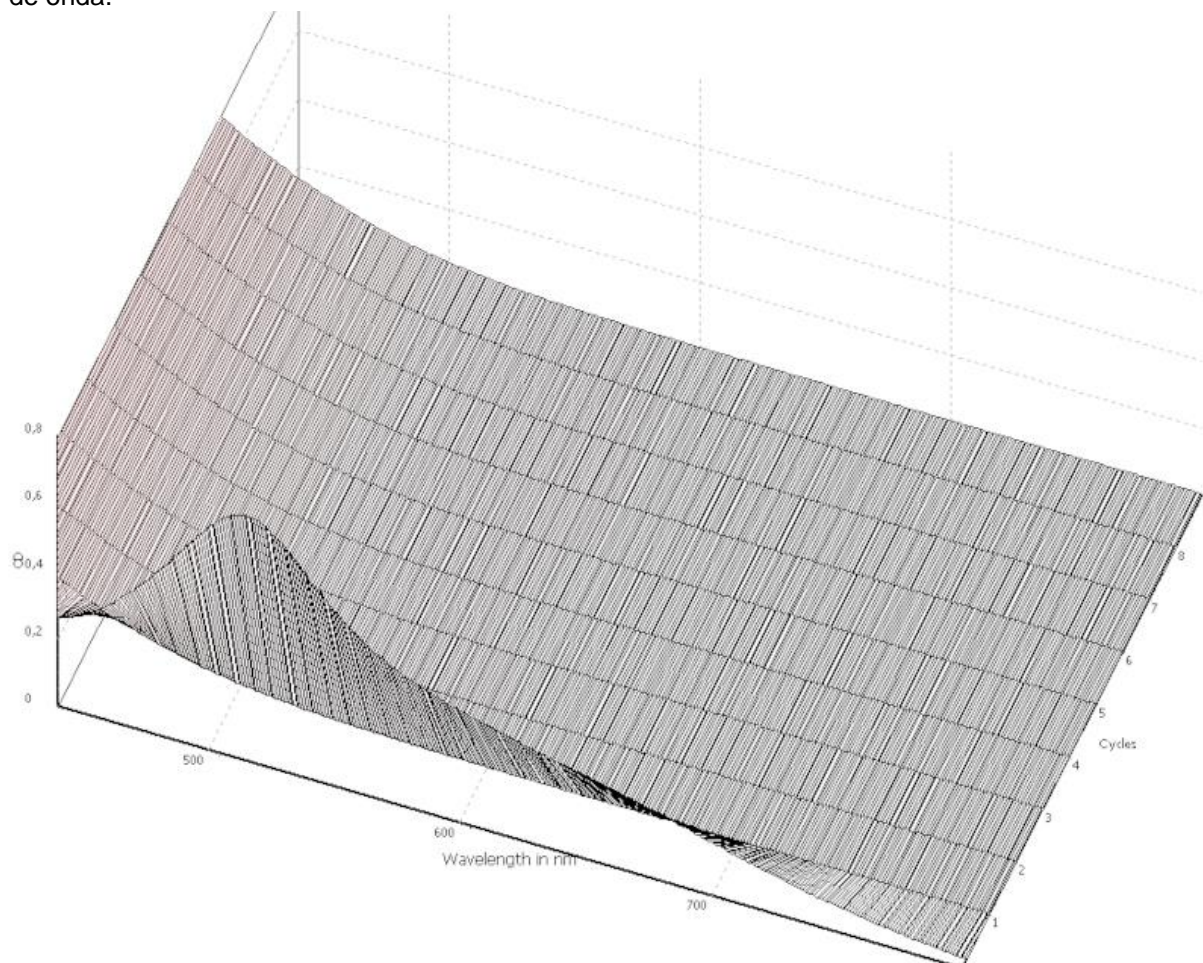
Figura 5.5-6 Superfície de resposta da reação do DPPH com ácido ascórbico 180 mM pelo tempo e comprimento de onda.



Fonte: o autor, onde OD é a absorbância. "Cycles" representa o tempo.

No intuito de melhor explorar o comportamento do ácido ascórbico em função do tempo de reação, principalmente nos primeiros minutos tentou-se diversas concentrações, mas todas demonstraram o mesmo comportamento, como o exemplo da Figura 5.5-7.

Figura 5.5-7 Superfície de resposta do DPPH com ácido ascórbico 180 mM vs. Tempo vs. Comprimento de onda.

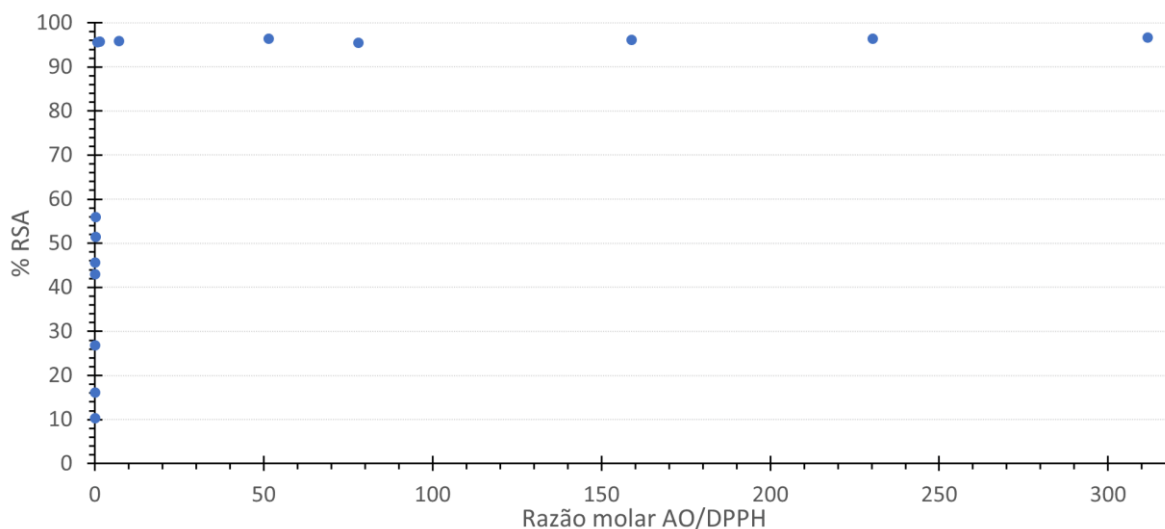


Fonte: o autor.

A diferença de comportamento cinético é explicada pela diferença de mecanismo reacional. A redução do radical por meio de transferência eletrônica é rápida, mas quando envolve a transferência de um átomo de hidrogênio requer mais tempo, lógica que se aplica a reação do ácido ascórbico, no primeiro caso, e ao ácido genticônico no segundo, (SCHAICH *et al.*, 2015; XIE; SCHAICH, 2014).

Ao todo foram testadas 15 concentrações diferentes de ácido ascórbico e a aplicação das equações (12) e (13) aos dados permitiu calcular os elementos para a representação da porcentagem de radical reduzido (RSA) pela razão molar de antioxidante como na Figura 5.5-8.

Figura 5.5-8 Porcentagem de inibição do radical DPPH para 15 razões molares testadas.



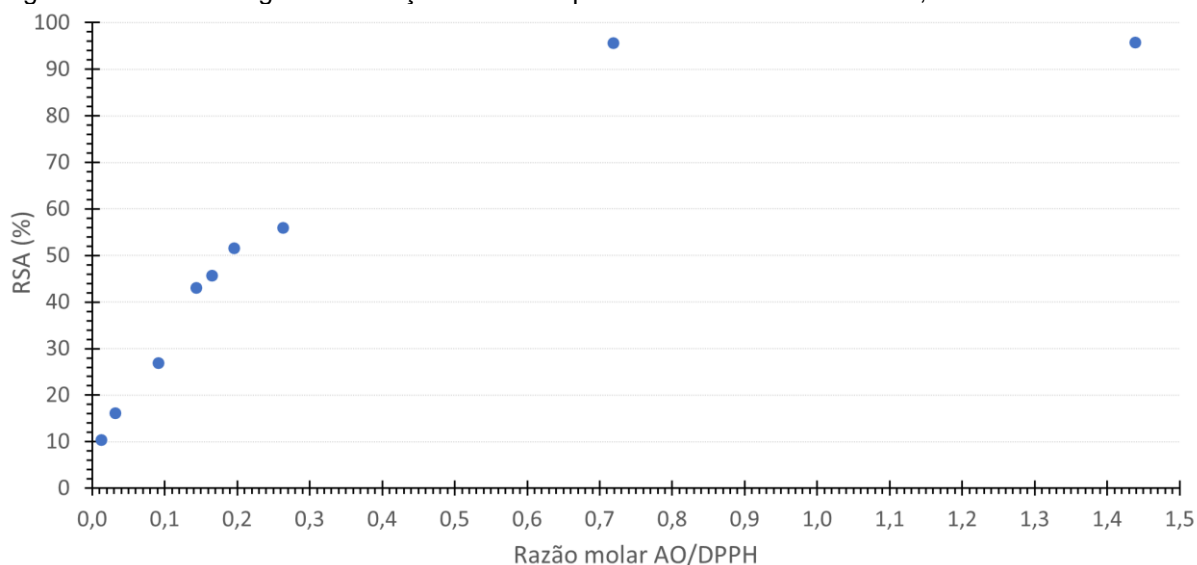
Onde: AO refere-se a antioxidante em questão. Fonte: o autor.

A análise da Figura 5.5-8 traz a percepção que existe um limite de inibição do DPPH com o uso do ácido ascórbico. A máxima porcentagem de inibição do radical, em torno de 95%, torna-se independente da concentração, pelo menos até o limiar testado de 310 vezes.

Investigando melhor as razões molares menores com até 1,5, elaborou-se a Figura 5.5-9, onde nota-se o comportamento não linear da porcentagem de inibição em função da porcentagem de inibição. A figura não demonstra exatamente a partir de qual razão começa-se a atingir o limite de inibição, visto pela falta de pontos entre 0,26 e 0,72, mas visualmente estima-se que esteja próximo de 0,7.

A Figura 5.5-9 também propicia a estimativa do EC_{50} , onde obtém-se 0,185. Tal situação permite aplicar a equação (14) chegando-se no *antioxidant reducing power* (ARP) de 5,4 e o valor estequiométrico de 0,37, como definido no item 4.2.7.3.

Figura 5.5-9 Porcentagem de Inibição do DPPH para razões molares de até 1,5 vezes.



Onde: AO refere-se ao antioxidante, neste caso ácido ascórbico. Fonte: o autor.

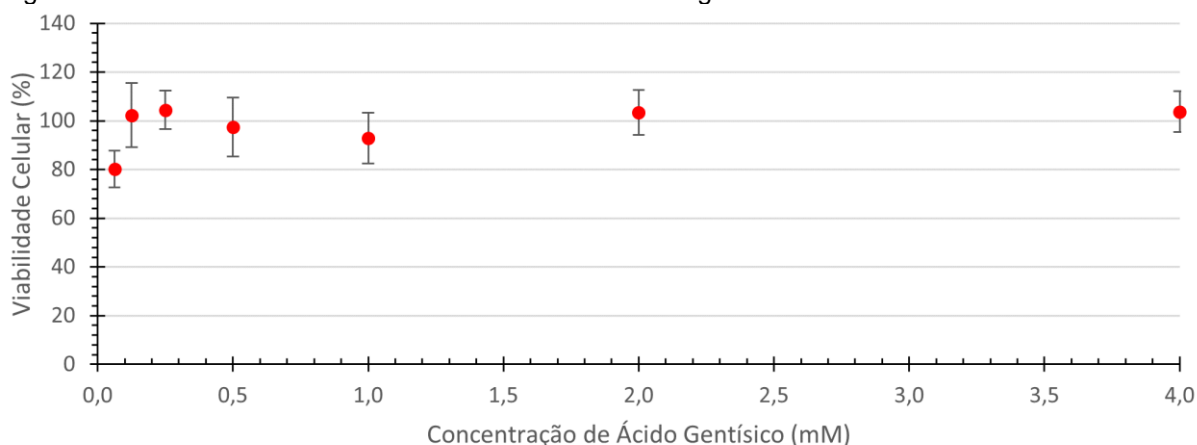
Verificando-se qual o resultado o proponente do método obteve para o ácido ascórbico. Tem-se um ARP de 3,7 e valor estequiométrico de 0,54, que calculando chega-se a um EC_{50} de 0,27. Ao comparar-se com os resultados aqui obtidos percebe-se que a substância apresentou uma maior capacidade antioxidante, (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Já Mishra; Ojha e Chaudhury, (2012), encontraram EC_{50} de 0,17, ARP de 5.9 e valor estequiométrico de 0.34, logo, valores bem mais próximos dos aqui obtidos.

5.6 Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico foi estudado frente as linhagens celulares: queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat), dermo fibroblastos humanos (HDFa) e hepatocarcinoma humano (HepG2) utilizando-se da metodologia descrita no item 4.2.9.1.

Primeiramente testou-se o ácido gentísico contra as células HaCat nas concentrações variando de 0,0625 a 4 mM via utilização do método *neutral red uptake* (NRU), obtendo-se os dados representados por meio da Figura 5.6-1.

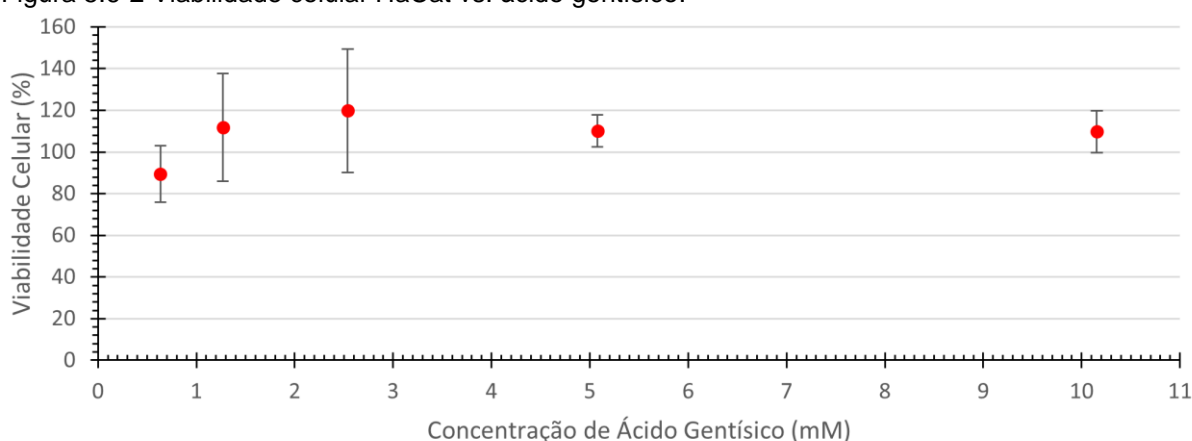
Figura 5.6-1 Viabilidade das células HaCat frente ao ácido gentísico.



Onde: os pontos representam a média de 9 repetições, as barras de erro representam o intervalo de confiança de cada média calculado ao nível de 95% utilizando-se distribuição normal e $n=9$. Fonte: o autor.

Nota-se uma alta taxa de viabilidade no geral, ou seja, sobrevivência celular, um certo grau de variabilidade e ausência de um comportamento que possa indicar uma tendência citotóxica do ácido gentísico. No intuito de melhor investigar testou-se concentrações mais altas no intervalo de 0,635 mM até 10,15 mM os dados podem ser avaliados por meio da Figura 5.6-2.

Figura 5.6-2 Viabilidade celular HaCat vs. ácido gentísico.



Onde: os pontos representam a média de 9 repetições, as barras de erro representam o intervalo de confiança de cada média calculado ao nível de 95% utilizando-se distribuição normal e $n=9$. Fonte: o autor.

A análise da Figura 5.6-2 demonstra comportamento parecido da Figura 5.6-1, com uma média ligeiramente acima que a da primeira figura, mas observando-se bem é possível verificar que a alteração encontra-se dentro do intervalo de confiança, logo

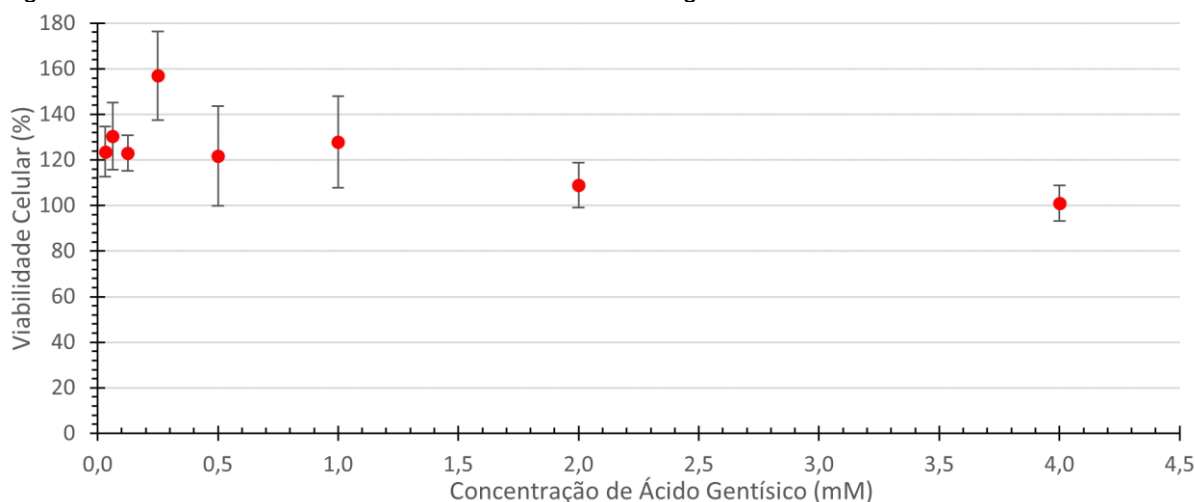
não sendo possível tecer afirmação referente às diferenças entre os experimentos, no entanto, pode-se afirmar que no espectro de concentração avaliado existe alta viabilidade celular, ou seja, o ácido gentísico não demonstra característica citotóxica neste range de concentração.

Não encontrou-se na literatura dados de toxicidade do ácido gentísico utilizando a metodologia NRU referente as células HaCat, sendo os dados possivelmente inéditos.

No entanto, Kim *et al.* (2020) utilizando outra metodologia, a MTT, encontrou aumento da taxa de proliferação celular de queratinócitos humanos em baixas concentrações de ácido gentísico, na faixa de 50 a 100 $\mu\text{g/mL}$, que nas unidades usadas na Figura 5.6-2, seria uma faixa de 0,4 a 0,7 mM. A comparação não é totalmente assertiva visto o nível de variabilidade nesta faixa na Figura 5.6-2. As médias na figura indicam que existe uma tendência que a proliferação celular ser positiva em concentrações maiores, mas não sendo estatisticamente significativa visto a sobreposição dos intervalos de confiança da média e a inclusão da linha de 100%. Os autores não testaram concentrações maiores do ativo para propiciar a comparação se dados apresentados estariam consonantes.

Ainda utilizando a metodologia NRU, testou-se os fibroblastos HDFa, obtendo-se a Figura 5.6-3.

Figura 5.6-3 Viabilidade das células HDFa contra o ácido gentísico.

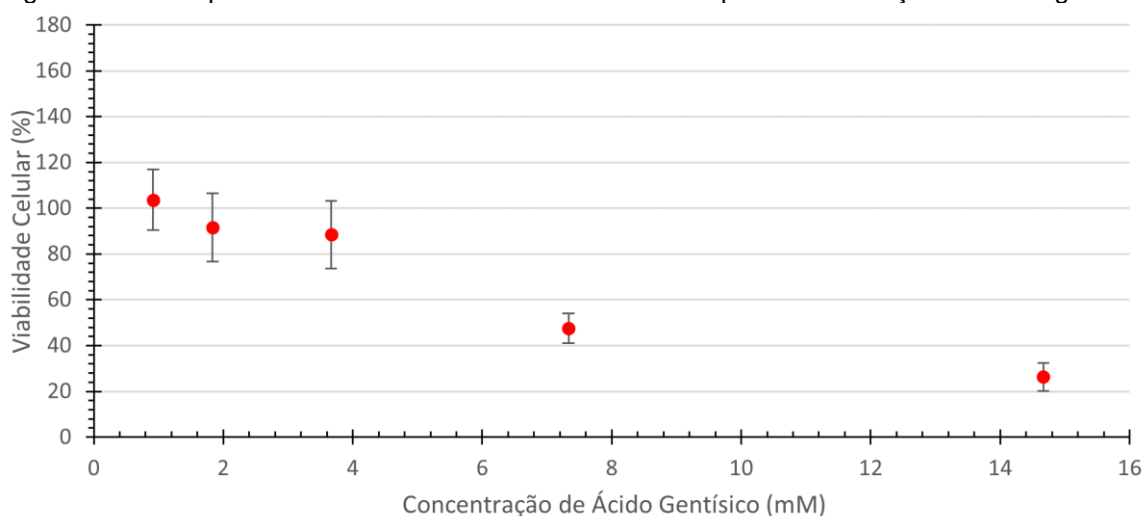


Onde: os pontos representam a média de 6 repetições, as barras de erro representam o intervalo de confiança de cada média calculado ao nível de 95% utilizando-se distribuição normal e $n=6$. Fonte: o autor.

Verificando-se a figura percebe-se um comportamento de crescimento celular em baixas concentrações até 1 mM, visto que as médias estão acima de 100% e o intervalo de confiança inferior no máximo tangencia esse valor. Já para proporções maiores do ativo nota-se uma levada manutenção da viabilidade celular.

Assim como nas células HaCat, também averiguou-se o comportamento para maiores quantidades do ácido gentísico, o que pode ser visualizado por meio da Figura 5.6-4.

Figura 5.6-4 Comportamento da viabilidade celular de HDFa pela concentração de ácido gentísico



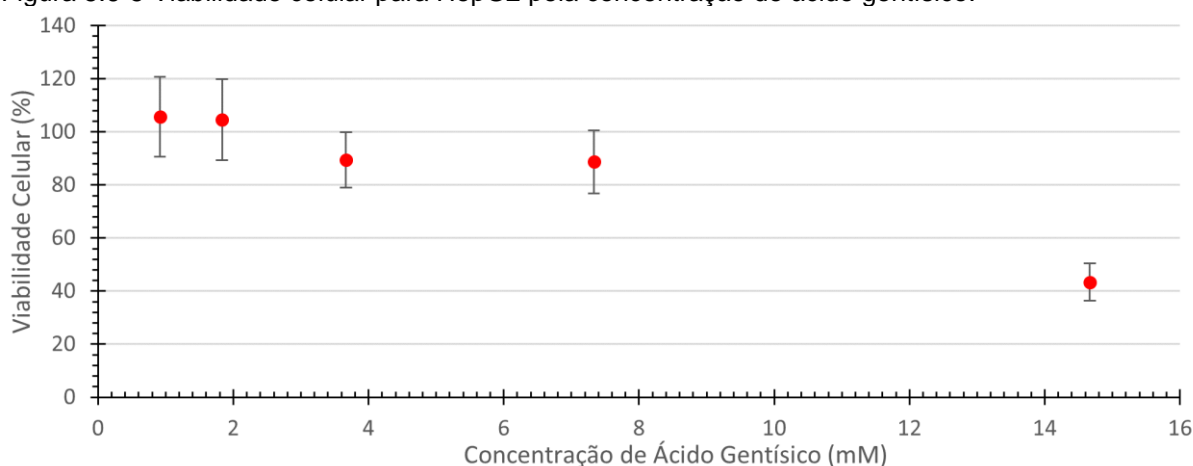
Onde: os pontos representam a média de 8 repetições, as barras de erro representam o intervalo de confiança de cada média calculado ao nível de 95% utilizando-se distribuição normal e $n=8$. Fonte: o autor.

A figura acima possibilita verificar um comportamento de citotoxicidade em concentrações mais elevadas do ativo. A ausência de pontos no intervalo de 3,7 e 7,3 mM não faculta a identificação em qual concentração tal efeito inicia-se, mas, no entanto, pode-se afirmar que a partir de 7,3 mM esse comportamento existe.

Não foram encontrados dados na literatura da exposição do de HDFa ao ácido gentísico, podendo ser esses inéditos.

Visto o comportamento de manutenção celular no caso da HaCat. A citotoxicidade para HDFa apenas em concentração maiores, optou-se para o estudo do hepatocarcinoma, HepG2, elucidar o potencial citotóxico já em concentrações maiores, de 0,9 a 14,7 mM, do ácido gentísico gerando-se os dados para a confecção da Figura 5.6-5.

Figura 5.6-5 Viabilidade celular para HepG2 pela concentração de ácido gentísico.



Onde: os pontos representam a média de 8 repetições, as barras de erro representam o intervalo de confiança de cada média calculado ao nível de 95% utilizando-se distribuição normal e $n=8$. Fonte: o autor.

O hepatocarcinoma apresentou alta viabilidade celular até concentrações de 7,3 mM, os dois pontos correspondentes à concentração de 3,7 a 7,3 mM possuem seu intervalo de confiança superior tangenciando a viabilidade celular de 100% não podendo-se afirmar com o nível de confiança definido para o trabalho, item 4.2.11, que exista comportamento citotóxico até a concentração de 7,3 mM, não obstante,

isso não acontece no ponto 14,7 mM, assim nesta concentração podendo-se sustentar a existência de citotoxicidade.

Não foram encontrados dados na literatura da exposição da HepG2 ao ácido gentísico, podendo ser esses inéditos. No entanto, no intuito de obter-se ao menos algum grau de comparação Carmo *et al.* (2019), usando célula HCT8, que não são humanas e sim de ratos, associa a propriedade hepatoprotetora do extrato de *Myrciaria dubia* a presença do ácido gentísico. Os autores não apontam uma referência, mas a associação se dá pelo fato do ácido gentísico estar presente em apenas umas das extrações testadas pelos autores.

5.7 Desenvolvimento das emulsões

O processo de desenvolvimento de formulações levou em conta três principais pilares:

1. Facilidade de formulação e disponibilidade das matérias primas para uma possível aplicação no mercado;
2. Estrutura de fórmula que possibilite o ativo ser avaliado como um item multifuncional;
3. Compatibilidade com possíveis metodologias analíticas;
4. Aspecto visual e sensorial geral agradável.

A maioria das emulsões de aplicação cutânea são emulsões óleo em água (O/W), sendo que 45,8% costumam ter menos de 25% em massa de elementos graxos, (WILKINSON; MOOR, 1990). Levando em conta que esse tipo de emulsão traz maior facilidade de estabilização, visto a maior disponibilidade de surfactantes, (AKHLAGHI *et al.*, 2020).

Como discutido no parágrafo anterior junto ao processo de desenvolvimento optou-se pela emulsão óleo em água (O/W) usando-se como inspiração inicial as

apresentadas em Corrêa (2012). No entanto, retirou-se da formulação conservantes, antioxidantes e corretores de pH no intuito de satisfazer o pilar número 2 da lista cima, chegando-se na fórmula inicial F1 que não possui ácido gentísico, vide Tabela 5.7-1, e as fórmulas F2 e F3 que possuem o ativo.

Tabela 5.7-1 Fórmulas inicialmente testadas.

Reagente (INCI Name)	Fase	Formulações		
		F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
<i>Cetearyl Alcohol</i>	O	5,0	5,0	5,0
<i>Sodium Cetearyl Sulfate</i>	A	1,0	1,0	1,0
Isopropyl Myristate	O	1,5	1,5	1,5
<i>Ethylhexyl Stearate</i>	O	1,2	1,2	1,2
<i>Glycerin</i>	A	3,0	3,0	3,0
<i>Ricinus Communis (Castor) Seed Oil</i>	O	0,4	0,4	0,4
<i>Disodium EDTA</i>	A	0,05	0,05	0,05
<i>Gentisic acid</i>	O	0,0	1,0	0,5
<i>Water</i>	A	qsp 100	qsp 100	qsp 100

Fonte: O autor com base em Corrêa (2012).

Após a manipulação notou-se que a adição do ácido gentísico gerou uma queda aparente na viscosidade, ou seja, F2 com viscosidade menor que F1. A solubilidade das emulsões em etanol foi baixa.

Visto a necessidade de solubilização em etanol por questões analíticas, optou-se por alterar o álcool cetoestearílico (*Cetearyl Alcohol*) por álcool cetílico (*Cetyl Alcohol*) e o óleo de rícino (*Ricinus Communis (Castor) Seed Oil*) por óleo de jojoba (*Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil*), que são mais solúveis em etanol. Gerando as formulações F4 e F5 da Tabela 5.7-2.

A viscosidade das emulsões F4 e F5 não estavam adequadas por uma análise visual, logo foi elevada a concentração de álcool cetílico que é considerado um doador de viscosidade ao sistema, (CORRÊA, 2012), assim obtendo-se as formulações F6 e F7 da Tabela 5.7-2.

Tabela 5.7-2 Formulações geradas para maior solubilidade em etanol e maior viscosidade.

Reagente (INCI Name)	Fase	Formulações			
		F4 (%)	F5 (%)	F6 (%)	F7(%)
<i>Cetyl Alcohol</i>	O	5,0	5,0	6,0	6,0
<i>Sodium Cetearyl Sulfate</i>	A	1,0	1,0	1,0	1,0
Isopropyl Myristate	O	1,5	1,5	1,5	1,5
<i>Ethylhexyl Stearate</i>	O	1,2	1,2	1,2	1,2
<i>Glycerin</i>	A	3,0	3,0	3,0	3,0
<i>Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil</i>	O	0,4	0,4	0,4	0,4
<i>Disodium EDTA</i>	A	0,05	0,05	0,05	0,05
<i>Gentisic acid</i>	O	0,0	1,0	0,0	1,0
<i>Water</i>	A	qsp 100	qsp 100	qsp 100	qsp 100

Fonte: O autor com base em Corrêa (2012).

A solubilidade em etanol de F6 e F7 foi medida e obteve-se aproximadamente 157,8±4,0 mg/mL, (média ± desvio padrão amostral), o que equivale aproximadamente a 20% (m/m) de solubilidade da emulsão em etanol. Esse resultado é um parâmetro de segurança que permite adequar métodos analíticos sem comprometer a solubilidade.

Assim, a estrutura das formulações F6 e F7 atende o pilar de desenvolvimento em termos de compatibilidade analítica, visto a solubilidade em etanol. As fórmulas foram avaliadas de forma visual. Os requisitos de aspecto da emulsão e sensorial na aplicação, que é o pilar número 4 exposto no início deste item, demonstraram-se aceitáveis, logo estando em conformidade com a estratégia de desenvolvimento.

As fórmulas F8, F9, F10 e F11 que possuem respectivamente 1%, 0,5%, 0,15% e 0,0% de ácido gentísico, foram utilizadas para os demais ensaios e sua composição encontra-se descrita no item 4.2.4 por meio da Tabela 4.2-1, e seguem a mesma estrutura de formulação de F6 e F7.

5.8 Estudo de liberação *in vitro* (IVRT)

O estudo de liberação *in vitro* baseou-se no método descrito no item 4.2.10, onde o primeiro passo é investigar a solubilidade do ácido gentísico no meio receptor.

5.8.1 Solubilidade do ativo investigação de *sink condition*

A substância foi diluída em cada concentração de etanol até obter-se a saturação, centrifugada a 3500 rpm por 30 min, o sobrenadante deixado em repouso por 24h e inspecionado e não houve precipitação. Sendo então submetido a metodologia analítica do item 4.2.2, Resultados encontram-se na Tabela 5.8-1.

Tabela 5.8-1 Resultado do ensaio de solubilidade do ácido gentísico para concentrações de etanol.

Etanol (%)	Ensaio de solubilidade (g/L)			Média (g/L)	IC95% (g/L)
	S1	S2	S3		
30	75,52	76,18	75,53	75,74	0,43
40	125,94	127,77	126,84	126,84	1,04
50	188,08	191,35	190,06	189,82	1,86

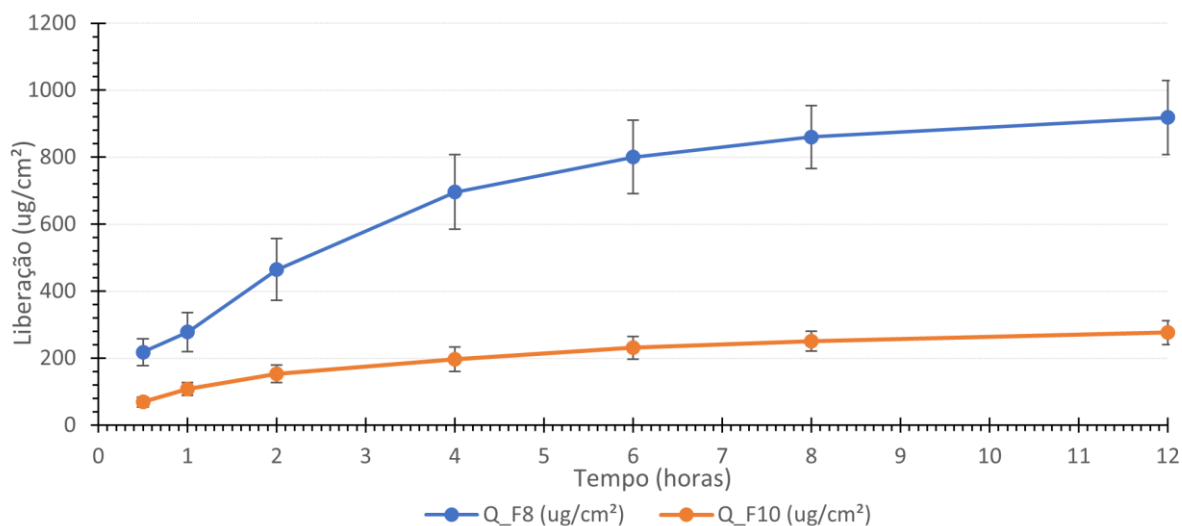
Onde: S1 a S3 é o resultado de cada ensaio de solubilidade. Metodologia de quantificação por espectrofotometria de fluorescência. Porcentagem de etanol é relativa à proporção volumétrica. Fonte: o autor.

Utilizando-se os dados da Tabela 5.8-1, para uma concentração de etanol de 50%, condição do meio receptor, assegura-se afirmar que em uma célula de Franz de 7 mL, vide item 4.2.10.3, pode-se solubilizar entre 1,3157 e 1,3418 g/(7 mL). No entanto, a formulação mais concentrada testada, em 300 mg de amostra adicionada, teria 0,003 g de ácido gentísico para liberar em 7 mL, ou seja, fazendo-se a razão entre a quantidade mássica de ativo a ser liberada e o limite inferior, pior caso, da solubilidade mássica em 7 mL, obtém-se $2,28 \times 10^{-3}$, ou seja, uma utilização de 0,228% do potencial de solubilidade, frente ao limite superior recomendado de 10%, (USP, 2009), logo condição de *sink condition* garantida.

5.8.2 Ensaio de emulsões de ácido gentísico em célula de Franz

As formulações F8 e F10 foram submetidas ao ensaio de liberação, IVRT, segundo metodologia do item 4.2.10. A concentração de ácido gentísico foi quantificada por meio da espectrofotometria de fluorescência seguindo o método do item 4.2.2 onde o resultado do desenvolvimento da metodologia está discutido no item 5.3. O comportamento da liberação do ácido gentísico ao longo do tempo pode ser observado por meio da Figura 5.8-1.

Figura 5.8-1 Liberação mássica do ácido gentísico em função do tempo para formulações F8 e F10.

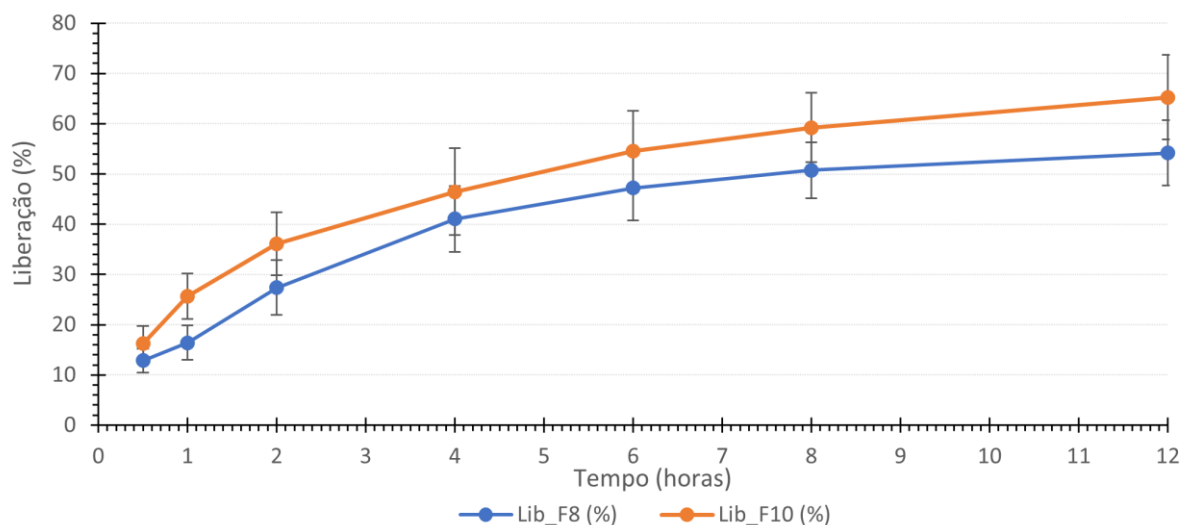


Onde: cada ponto representa a média aritmética da quantidade liberada de 6 células de Franz. A barra de erro corresponde ao intervalo de confiança em 95%. Fonte: o autor.

Percebe-se pela Figura 5.8-1 que a liberação mássica da formulação F8 foi maior que F10, isso explica-se pela maior concentração do ativo em F8, já que possui 1% de ativo contra 0,25% em F10.

No entanto, a porcentagem de liberação, que é a quantidade liberada em um determinado instante dividido pela quantidade inicial adicionada no compartimento doador da célula de Franz, não segue essa lógica. Houve uma ligeira inversão, já que a liberação relativa de F10 foi maior que F8, como pode-se constatar na Figura 5.8-2.

Figura 5.8-2 Liberação percentual das emulsões de ácido gentísico em função do tempo.



Onde: cada ponto representa a média aritmética da porcentagem liberada de 6 células de Franz. A barra de erro corresponde ao intervalo de confiança em 95%. Fonte: o autor.

Chama-se a atenção a alta porcentagem de liberação obtida. Após 12 h cerca de 65 e 54% para F10 e F8 respectivamente, o que demonstra uma alta capacidade de entrega do ativo para o meio receptor, Figura 5.8-2.

Na intenção de elucidar qual o melhor modelo cinético aplica-se ao processo de difusão do ativo pela membrana, como revisado no item 2.5.2, aplica-se a projeção dos dados no plano ordenado segundo a operação algébrica necessária para linearizar as equações (3), (6), (7) a (8).

No caso do modelo de ordem zero, equação (6), a representação gráfica necessária é igual a já disponível Figura 5.8-2. Logo aplicando-se a regressão linear dos dados, chega-se aos parâmetros da Tabela 5.8-2.

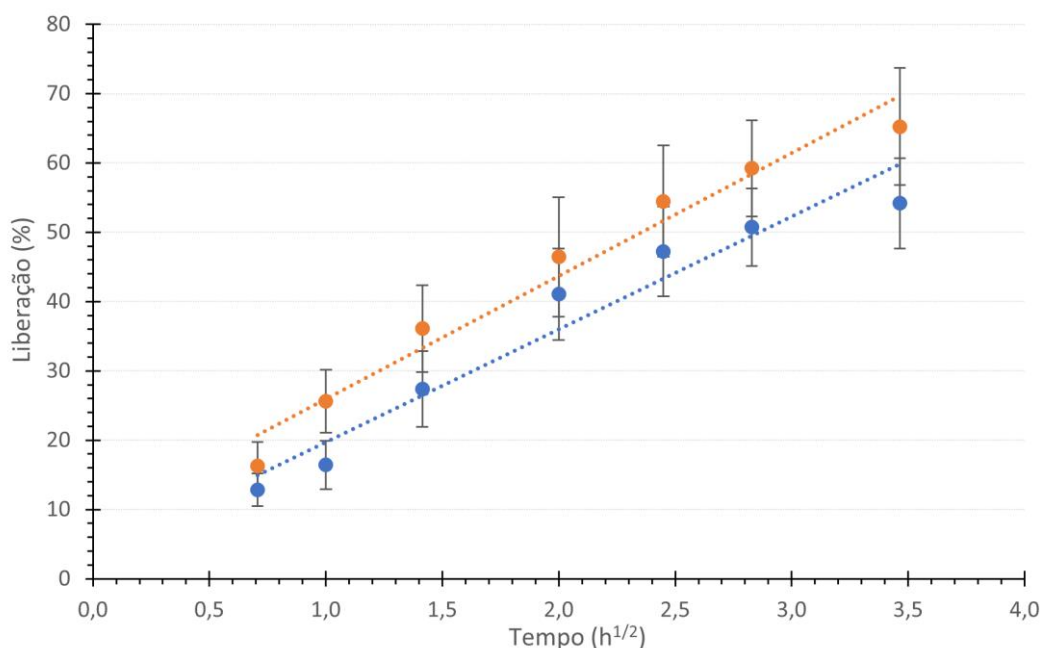
Tabela 5.8-2 Resultado da regressão linear para modelo de ordem zero.

Parâmetro	Emulsão	
	F8	F10
K	3,6752	4,0368
R ²	0,8372	0,8698

Fonte: o autor

O modelo de Higuchi, requer a representação no plano cartesiano da liberação percentual pela raiz quadrada do tempo, logo gera-se a Figura 5.8-3.

Figura 5.8-3 Representação da liberação percentual em função da raiz quadrada do tempo.



Onde: cada ponto representa a média aritmética da porcentagem liberada de 6 células de Franz. A barra de erro corresponde ao intervalo de confiança em 95%. Fonte: o autor.

Vale ressaltar que um dos pressupostos deste modelo é a concentração no compartimento doador muito maior que no compartimento receptor, vide item 2.5.2. No entanto o experimento demonstra uma alta liberação percentual e o modelo não se aplica tão bem para liberações acima de 30 a 35%, (OLEJNIK *et al.*, 2012; THAKKER; KLEIN, 2020; ZATZ; SEGERS, 1998). Assim, calculou-se a regressão linear para o conjunto de dados como um todo e considerando apenas os pontos até 2 h de ensaio no intuito de comprovar tal pressuposto, como disponível na Tabela 5.8-3.

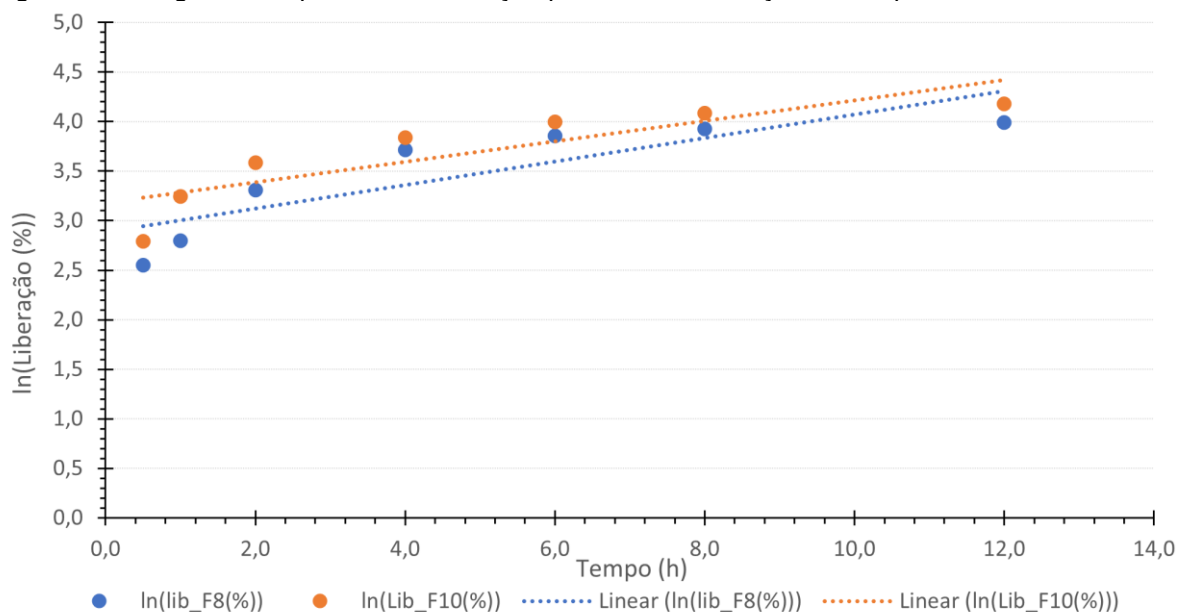
Tabela 5.8-3 Resultado da regressão linear para modelo de Higuchi para liberação percentual para dois períodos de liberação.

Parâmetro	Liberação de 0,5 a 12 h		Liberação de 0,5 a 2 h	
	Emulsão			
	F8	F10	F8	F10
K	16,2826	17,7410	22,5314	27,8265
R ²	0,9466	0,9677	0,9900	0,9957

Fonte: o autor

Já para averiguar a aplicação do modelo de primeira ordem, representa-se o logarítmico neperiano da liberação percentual pelo tempo obtendo-se o plano cartesiano da Figura 5.8-4.

Figura 5.8-4 Logaritmo neperiano da liberação percentual em função do tempo.



Onde: cada ponto representa o logaritmo neperiano da média da porcentagem liberada de 6 células de Franz. Fonte: o autor.

O processo de regressão linear dos pontos da figura acima apresenta os parâmetros da Tabela 5.8-4.

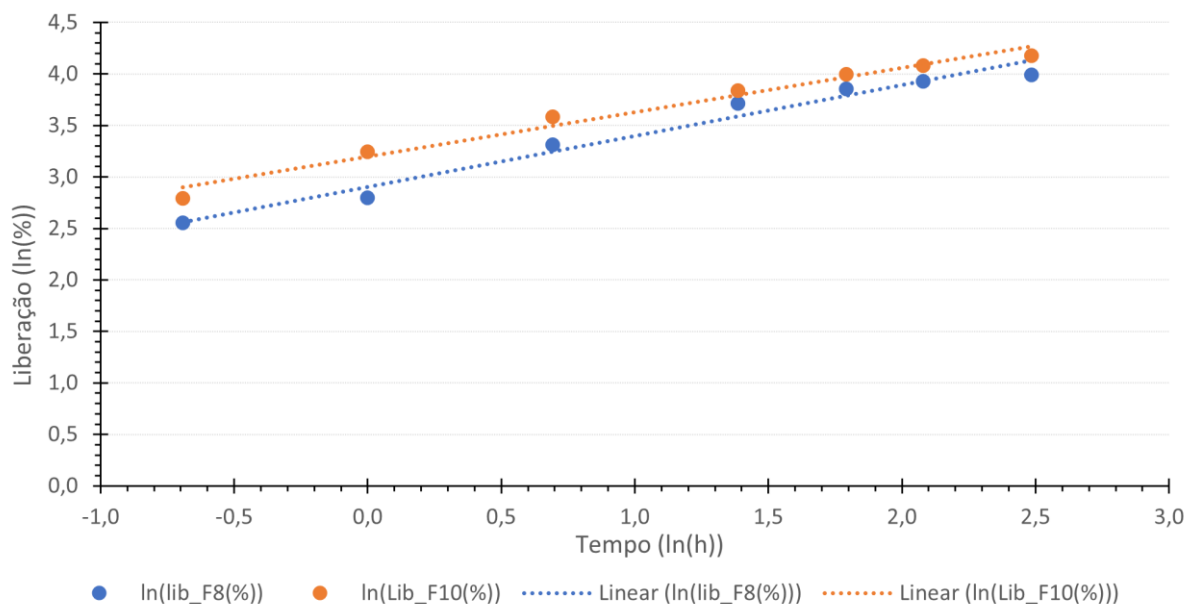
Tabela 5.8-4 Parâmetros da regressão linear para o modelo de primeira ordem.

Parâmetro	Emulsão	
	F8	F10
K	0,1185	0,1037
R ²	0,7346	0,7383

Fonte: o autor

A elucidação do modelo de Korsmeyer-Peppas requer a elaboração do plano cartesiano com cada variável apresentada por logaritmo neperiano em ambos os eixos, o que gera a Figura 5.8-5.

Figura 5.8-5 Representação bilogarítmico neperiano da liberação percentual em função do tempo para verificação do modelo de Korsmeyer-Peppas.



Fonte: o autor

Os parâmetros da regressão linear do plano bilogarítmico acima para o modelo de Korsmeyer-Peppas encontram-se na Tabela 5.8-5.

Tabela 5.8-5 Parâmetros da regressão linear para verificação do modelo de Korsmeyer-Peppas.

Parâmetro	Emulsão	
	F8	F10
K	18,2529	24,4382
n	0,4930	0,4315
R ²	0,9726	0,9784

Fonte: o autor

Após a aplicação das ferramentas matemáticas para identificação de qual modelo melhor representa o ensaio de liberação do ácido genticóico das emulsões testadas, nota-se que o modelo de Korsmeyer-Peppas é o que melhor ajusta-se ao experimento considerando sua duração integral e onde são vistos os maiores valores de R² dentre todas as cinéticas avaliadas, no entanto, os dados da Tabela 5.8-3 chamam a atenção.

Pode-se considerar que a liberação é explicada pelo modelo cinético de Higuchi até por volta de 2 horas de liberação, sendo governada pelo modelo de Korsmeyer-Peppas deste ponto em diante.

5.9 Estudo de estabilidade físico-química

O estudo de estabilidade foi conduzido segundo o item 4.2.5 onde avaliou-se os parâmetros físico-químicos: pH, viscosidade, densidade e concentração de ácido genticônico, além das características organolépticas: aparência, cor e odor. A seguir encontra-se a avaliação de cada variável onde primeiramente faz-se um estudo descritivo e verifica-se os pressupostos para aplicação da ferramenta de análise estatística ANOVA pareada. Caso ocorra violação da condição de esfericidade demanda-se a aplicação de uma correção sobre o grau de liberdade. Os métodos comumente usados para essa correção são o de Greenhouse-Geisser (GREENHOUSE; GEISSER, 1959) e de Huynh-Field (HUYNH; FELDT, 1976).

5.9.1 Estabilidade dos parâmetros físico-químicos

5.9.1.1 pH

Avaliou-se o pH das emulsões F8 a F11 por meio do método do item 4.2.5.1. Pode-se observar as medidas de resumo e a verificação do grau de assimetria e desvio dos dados da distribuição normal por meio da Tabela 5.9-1.

Tabela 5.9-1 Dados descritivos do pH das emulsões F8 a F11 por condição ambiental e tempo de estudo.

Tempo (d)	Emulsão	Condição	N	Média	95% IC		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	EP	W	p
1	F8	Geladeira	3	2,80	2,69	2,91	2,78	0,044	1,630	1,225	0,842	0,2196
		Ambiente	3	2,80	2,69	2,91	2,78	0,044	1,630	1,225	0,842	0,2196
		Estufa	3	2,70	2,22	3,19	2,78	0,197	-1,488	1,225	0,886	0,3419
	F9	Geladeira	3	2,97	2,72	3,23	2,92	0,101	1,713	1,225	0,792	0,0944
		Ambiente	3	2,97	2,72	3,23	2,92	0,101	1,713	1,225	0,792	0,0944
		Estufa	3	2,97	2,72	3,23	2,92	0,101	1,713	1,225	0,792	0,0944
	F10	Geladeira	3	3,52	3,14	3,90	3,44	0,153	1,724	1,225	0,778	0,0624
		Ambiente	3	3,52	3,14	3,90	3,44	0,153	1,724	1,225	0,778	0,0624
		Estufa	3	3,52	3,14	3,90	3,44	0,153	1,724	1,225	0,778	0,0624

Tempo (d)	Emulsão	Condição	N	Média	95% IC		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	EP	W	p
16	F11	Geladeira	3	4,49	4,21	4,76	4,45	0,110	1,336	1,225	0,916	0,4391
		Ambiente	3	4,52	4,31	4,72	4,49	0,083	1,293	1,225	0,923	0,4633
		Estufa	3	4,52	4,31	4,72	4,49	0,083	1,293	1,225	0,923	0,4633
	F8	Geladeira	3	2,55	2,29	2,81	2,58	0,104	-1,293	1,225	0,923	0,4633
		Ambiente	3	2,59	2,51	2,68	2,59	0,035	0,423	1,225	0,993	0,8428
		Estufa	3	2,47	2,28	2,66	2,51	0,078	-1,700	1,225	0,803	0,1224
	F9	Geladeira	3	2,76	1,99	3,54	2,84	0,312	-1,039	1,225	0,955	0,5906
		Ambiente	3	2,70	2,52	2,88	2,72	0,072	-1,152	1,225	0,942	0,5367
		Estufa	3	2,81	2,62	3,00	2,82	0,076	-0,586	1,225	0,987	0,7804
F10	Geladeira	3	3,75	3,64	3,86	3,73	0,044	1,630	1,225	0,842	0,2196	
	Ambiente	3	3,77	3,66	3,88	3,77	0,045	-0,331	1,225	0,996	0,8777	
	Estufa	3	3,65	3,28	4,02	3,73	0,147	-1,723	1,225	0,779	0,0648	
30	F11	Geladeira	3	4,90	4,80	5,00	4,91	0,040	-0,722	1,225	0,980	0,7262
		Ambiente	3	4,99	4,70	5,29	4,94	0,119	1,610	1,225	0,850	0,2408
		Estufa	3	5,09	4,84	5,35	5,05	0,102	1,566	1,225	0,865	0,2815
	F8	Geladeira	3	2,64	2,05	3,22	2,62	0,235	0,317	1,225	0,996	0,8828
		Ambiente	3	2,61	2,51	2,71	2,59	0,040	1,732	1,225	0,750	<,0001
		Estufa	3	2,62	1,94	3,30	2,67	0,274	-0,843	1,225	0,972	0,6764
	F9	Geladeira	3	2,92	2,66	3,18	2,91	0,105	0,423	1,225	0,993	0,8428
		Ambiente	3	2,75	2,15	3,34	2,87	0,240	-1,702	1,225	0,802	0,1194
		Estufa	3	2,73	2,45	3,00	2,78	0,110	-1,668	1,225	0,824	0,1736
F10	Geladeira	3	3,71	3,47	3,96	3,69	0,097	1,019	1,225	0,957	0,5997	
	Ambiente	3	3,72	3,37	4,08	3,78	0,144	-1,499	1,225	0,883	0,3341	
	Estufa	3	3,64	3,29	4,00	3,72	0,142	-1,722	1,225	0,780	0,0675	
F11	Geladeira	3	5,00	4,65	5,35	4,99	0,140	0,423	1,225	0,993	0,8428	
	Ambiente	3	4,90	4,57	5,24	4,95	0,136	-1,361	1,225	0,912	0,4244	
	Estufa	3	5,05	4,82	5,28	5,09	0,093	-1,642	1,225	0,837	0,2060	
60	F8	Geladeira	3	2,47	2,27	2,67	2,52	0,081	-1,732	1,225	0,750	<,00001
		Ambiente	3	2,56	2,39	2,73	2,54	0,068	1,361	1,225	0,912	0,4244
		Estufa	3	2,39	2,17	2,62	2,40	0,090	-0,331	1,225	0,996	0,8777
	F9	Geladeira	3	2,82	2,21	3,43	2,96	0,245	-1,729	1,225	0,767	0,0389
		Ambiente	3	2,79	2,50	3,08	2,78	0,115	0,387	1,225	0,994	0,8565
		Estufa	3	2,81	2,71	2,91	2,80	0,040	0,722	1,225	0,980	0,7262
	F10	Geladeira	3	3,68	3,34	4,02	3,74	0,137	-1,638	1,225	0,839	0,2103
		Ambiente	3	3,77	3,65	3,88	3,75	0,047	1,390	1,225	0,907	0,4072
		Estufa	3	3,63	3,24	4,01	3,69	0,155	-1,532	1,225	0,875	0,3093
F11	Geladeira	3	4,89	4,58	5,19	4,86	0,122	0,935	1,225	0,964	0,6369	
	Ambiente	3	5,03	4,86	5,19	5,06	0,067	-1,688	1,225	0,812	0,1436	
	Estufa	3	4,95	4,63	5,28	4,94	0,131	0,455	1,225	0,992	0,8308	
90	F8	Geladeira	3	2,59	2,56	2,62	2,58	0,012	1,732	1,225	0,750	<,00001
		Ambiente	3	2,56	2,45	2,68	2,56	0,045	0,331	1,225	0,996	0,8777
		Estufa	3	2,32	2,08	2,56	2,27	0,095	1,711	1,225	0,794	0,1002
	F9	Geladeira	3	2,75	2,58	2,92	2,75	0,070	0,000	1,225	1,000	1,0000
		Ambiente	3	2,90	2,55	3,26	2,96	0,144	-1,499	1,225	0,883	0,3341
		Estufa	3	2,47	2,10	2,85	2,43	0,150	1,193	1,225	0,937	0,5163
	F10	Geladeira	3	3,69	3,51	3,86	3,70	0,071	-0,816	1,225	0,974	0,6878
		Ambiente	3	3,70	3,17	4,23	3,66	0,213	0,816	1,225	0,974	0,6878

Tempo (d)	Emulsão	Condição	N	Média	95% IC		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	EP	W	p
		Estufa	3	3,46	3,22	3,70	3,50	0,096	-1,545	1,225	0,871	0,2983
		Geladeira	3	4,96	4,63	5,30	4,89	0,136	1,722	1,225	0,781	0,0704
	F11	Ambiente	3	4,86	4,58	5,15	4,92	0,116	-1,674	1,225	0,821	0,1650
		Estufa	3	5,41	4,80	6,02	5,28	0,246	1,703	1,225	0,801	0,1166

Onde: N é o número de amostras em cada grupo, IC refere-se ao intervalo de confiança calculado com o número de amostras, a distribuição t de *Student* e significância de 0,05%. DP é p desvio padrão amostral, EP é p erro padrão. Cálculo por meio do software Jamovi. Fonte: o autor.

Nota-se por meio dos parâmetros do teste de normalidade de Shapiro-Wilk que, em geral, os dados nos subgrupos seguem uma distribuição próxima a normal, existem apenas duas exceções onde existe significância para recusar a hipótese de normalidade, no entanto, a estatística F, a qual a ANOVA é baseada, ainda apresenta-se robusta para desvios deste nível incluindo um número de amostras baixo em cada subgrupo n=3, (BLANCA *et al.*, 2017; KHAN; RAYNER, 2003).

Outro ponto é a verificação de esfericidade nos dados onde usa-se o teste de Mauchly, (MAUCHLY, 1940). Os resultados de sua aplicação estão na Tabela 5.9-2, que demonstra que existe evidência para descartar a hipótese que os dados atendam a condição de esfericidade, visto nível de significância estabelecido no item 4.2.11, sendo necessário a aplicação de uma correção sobre os graus de liberdade no cálculo da ANOVA de Greenhouse-Geisser sobre os graus de liberdade.

A correção de Greenhouse-Geisser é mais conservadora no sentido de evitar erros de análise do que a correção de Huynh-Feldt, (HAVERKAMP; BEAUDUCEL, 2017). Comparando os ϵ de Greenhouse-Geisser que é 0,7683 com o de Huynh-Feldt que é 0,8666 percebe-se que o Greenhouse-Geisser oferece uma maior correção.

Tabela 5.9-2 Teste de esfericidade para o pH.

Variável	Mauchly's W	Aprox. X ²	df	p-value	Greenhouse-Geisser ϵ	Huynh-Feldt ϵ	Lower Bound ϵ
Tempo	0,5233	18,4006	9	0,0311	0,7683	0,8666	0,2500

Cálculo por meio do software JASP. Fonte: o autor.

Logo tem-se as condições para aplicação da ANOVA 3x4x5 com observações pareadas, também conhecida como rANOVA 3x4x5. Assim, calcula-se as interações

da variável pareada, pH, para o tempo, emulsão e condição do teste. Os principais parâmetros podem ser verificados na Tabela 5.9-3.

Tabela 5.9-3 Resultado rANOVA do tempo de estabilidade com a variável pH.

Interação	Correção de Esfericidade	Soma dos Quadrados	df	Média Quadrada	F	p	η^2_p
Tempo	G-G	0,1377	3,7034	0,0448	1,667	0,1784	0,0526
Tempo - Emulsão	G-G	2,8249	9,2201	0,3064	11,399	5,76×10 ⁻¹⁵	0,5327
Tempo - Condição	G-G	0,1034	6,1467	0,0168	0,626	0,7129	0,0401
Resíduos	G-G	2,4782	92,2010	0,0269			

Usada soma dos quadrados tipo III. G-G: Correção de Greenhouse-Geisser. Cálculo utilizando software JASP. Fonte: o autor.

A análise dos parâmetros fornecidos na Tabela 5.9-3 demonstra que existe apenas uma interação significativa, que é o tempo de estabilidade com a emulsão, visto que essa interação atingiu o nível de significância estabelecido no item 4.2.11. Logo, pode-se afirmar que o tempo de estabilidade acelerado não é relevante frente ao pH. A interação com a emulsão, detecta pelo teste estatístico, faz todo sentido, visto que as emulsões possuem diferentes concentrações do ativo, que é um ácido, desta forma, gerando emulsões com diferença de pH significativa. Esperava-se esse resultado.

5.9.1.2 Densidade

A densidade foi avaliada por meio do método do item 4.2.5.2. Pode-se observar as medidas de resumo por meio da Tabela 5.9-4.

Tabela 5.9-4 Dados descritivos da densidade (g/cm³) das emulsões F8 a F11 por condição ambiental e tempo de estudo.

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	EP	W	p
1	F8	Geladeira	3	0,736	0,677	0,795	0,731	0,024	0,829	1,225	0,973	0,6822
		Ambiente	3	0,736	0,677	0,795	0,731	0,024	0,829	1,225	0,973	0,6822
		Estufa	3	0,736	0,677	0,795	0,731	0,024	0,829	1,225	0,973	0,6822
1	F9	Geladeira	3	0,757	0,713	0,800	0,748	0,018	1,679	1,225	0,818	0,1582
		Ambiente	3	0,757	0,713	0,800	0,748	0,018	1,679	1,225	0,818	0,1582
		Estufa	3	0,757	0,713	0,800	0,748	0,018	1,679	1,225	0,818	0,1582
1	F10	Geladeira	3	0,855	0,777	0,934	0,869	0,032	-1,596	1,225	0,855	0,2544
		Ambiente	3	0,855	0,777	0,934	0,869	0,032	-1,596	1,225	0,855	0,2544
		Estufa	3	0,855	0,777	0,934	0,869	0,032	-1,596	1,225	0,855	0,2544
1	F11	Geladeira	3	0,779	0,763	0,794	0,780	0,006	-0,690	1,225	0,982	0,7391
		Ambiente	3	0,779	0,763	0,794	0,780	0,006	-0,690	1,225	0,982	0,7391

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	EP	W	p
16	F8	Estufa	3	0,779	0,763	0,794	0,780	0,006	-0,690	1,225	0,982	0,7391
		Geladeira	3	0,831	0,793	0,869	0,826	0,015	1,339	1,225	0,916	0,4375
		Ambiente	3	0,852	0,801	0,902	0,856	0,020	-0,999	1,225	0,959	0,6086
	F9	Estufa	3	0,821	0,688	0,955	0,793	0,054	1,712	1,225	0,793	0,0978
		Geladeira	3	0,890	0,852	0,927	0,883	0,015	1,632	1,225	0,842	0,2179
		Ambiente	3	0,876	0,844	0,908	0,882	0,013	-1,685	1,225	0,814	0,1480
	F10	Estufa	3	0,802	0,745	0,860	0,814	0,023	-1,674	1,225	0,821	0,1654
		Geladeira	3	0,944	0,880	1,008	0,954	0,026	-1,485	1,225	0,887	0,3444
		Ambiente	3	0,890	0,864	0,916	0,887	0,010	1,325	1,225	0,918	0,4454
	F11	Estufa	3	0,860	0,730	0,990	0,885	0,052	-1,652	1,225	0,832	0,1939
		Geladeira	3	0,774	0,721	0,827	0,769	0,021	0,924	1,225	0,965	0,6420
		Ambiente	3	0,776	0,730	0,823	0,769	0,019	1,507	1,225	0,881	0,3286
30	F8	Estufa	3	0,773	0,760	0,786	0,770	0,005	1,729	1,225	0,767	0,0368
		Geladeira	3	0,836	0,817	0,854	0,836	0,008	-0,178	1,225	0,999	0,9343
		Ambiente	3	0,830	0,711	0,950	0,822	0,048	0,781	1,225	0,976	0,7021
	F9	Estufa	3	0,784	0,726	0,843	0,784	0,023	0,160	1,225	0,999	0,9412
		Geladeira	3	0,872	0,808	0,936	0,865	0,026	1,050	1,225	0,954	0,5852
		Ambiente	3	0,874	0,829	0,918	0,874	0,018	-0,109	1,225	1,000	0,9601
	F10	Estufa	3	0,858	0,792	0,923	0,872	0,026	-1,729	1,225	0,766	0,0361
		Geladeira	3	0,926	0,906	0,946	0,930	0,008	-1,725	1,225	0,776	0,0593
		Ambiente	3	0,897	0,888	0,907	0,897	0,004	0,555	1,225	0,988	0,7922
	F11	Estufa	3	0,849	0,846	0,852	0,849	0,001	0,130	1,225	0,999	0,9521
		Geladeira	3	0,781	0,736	0,826	0,778	0,018	0,837	1,225	0,972	0,6788
		Ambiente	3	0,736	0,677	0,795	0,724	0,024	1,690	1,225	0,811	0,1408
60	F8	Estufa	3	0,792	0,762	0,822	0,797	0,012	-1,394	1,225	0,906	0,4043
		Geladeira	3	0,863	0,838	0,887	0,868	0,010	-1,712	1,225	0,793	0,0966
		Ambiente	3	0,868	0,849	0,887	0,872	0,008	-1,720	1,225	0,783	0,0751
	F9	Estufa	3	0,795	0,755	0,834	0,794	0,016	0,329	1,225	0,996	0,8784
		Geladeira	3	0,871	0,770	0,972	0,885	0,041	-1,399	1,225	0,905	0,4015
		Ambiente	3	0,908	0,871	0,945	0,902	0,015	1,555	1,225	0,868	0,2902
	F10	Estufa	3	0,876	0,842	0,910	0,871	0,014	1,451	1,225	0,894	0,3676
		Geladeira	3	0,950	0,880	1,020	0,955	0,028	-0,687	1,225	0,982	0,7402
		Ambiente	3	0,928	0,916	0,941	0,928	0,005	0,180	1,225	0,999	0,9339
	F11	Estufa	3	0,874	0,844	0,903	0,877	0,012	-1,096	1,225	0,949	0,5638
		Geladeira	3	0,810	0,780	0,841	0,804	0,012	1,724	1,225	0,778	0,0618
		Ambiente	3	0,819	0,752	0,886	0,830	0,027	-1,483	1,225	0,887	0,3453
90	F8	Estufa	3	0,815	0,755	0,874	0,813	0,024	0,269	1,225	0,997	0,9007
		Geladeira	3	0,858	0,821	0,896	0,852	0,015	1,516	1,225	0,879	0,3213
		Ambiente	3	0,846	0,843	0,850	0,847	0,001	-0,935	1,225	0,964	0,6369
	F9	Estufa	3	0,808	0,792	0,824	0,806	0,006	1,381	1,225	0,908	0,4128
		Geladeira	3	0,909	0,893	0,924	0,906	0,006	1,670	1,225	0,823	0,1704
		Ambiente	3	0,898	0,880	0,917	0,897	0,007	0,856	1,225	0,971	0,6710
	F10	Estufa	3	0,912	0,882	0,942	0,907	0,012	1,613	1,225	0,849	0,2373
		Geladeira	3	0,946	0,915	0,976	0,953	0,012	-1,732	1,225	0,754	0,0078
		Ambiente	3	0,931	0,896	0,965	0,926	0,014	1,392	1,225	0,906	0,4055
	F11	Estufa	3	0,890	0,787	0,993	0,881	0,041	0,921	1,225	0,966	0,6430
		Geladeira	3	0,819	0,816	0,823	0,819	0,002	-0,200	1,225	0,999	0,9265
		Ambiente	3	0,817	0,798	0,836	0,812	0,008	1,732	1,225	0,750	<,0001
		Estufa	3	0,766	0,713	0,819	0,776	0,021	-1,626	1,225	0,844	0,2237

Onde: N é o número de amostras em cada grupo, IC refere-se ao intervalo de confiança calculado com o número de amostras, a distribuição t de *Student* e significância de 0,05%. DP é o desvio padrão amostral, EP é o erro padrão. Cálculo por meio do software Jamovi. Fonte: o autor.

Os parâmetros do teste de normalidade de Shapiro-Wilk demonstram que os dados nos grupos seguem de forma aproximada a distribuição normal. Existem apenas três exceções onde ocorre significância para recusar a hipótese de normalidade. Seguindo o mesmo raciocínio do item anterior: a estatística F é robusta o suficiente para suportar desvios deste nível, (BLANCA *et al.*, 2017; KHAN; RAYNER, 2003).

No entanto, a verificação de esfericidade pelo mesmo método do item anterior, teste de Mauchly, (MAUCHLY, 1940), Tabela 5.9-5. Apresentou significância, de acordo com o estabelecido no item 4.2.11. Logo decidiu-se aplicar a correção de Greenhouse-Geisser, sobre os graus de liberdade da ANOVA de medidas repetidas, Tabela 5.9-6.

Tabela 5.9-5 Análise de esfericidade para densidade

Variável	Mauchly's W	Aprox. X^2	df	p-value	Greenhouse-Geisser ϵ	Huynh-Feldt ϵ	Lower Bound ϵ
Tempo	0,4729	21,2816	9	0,0116	0,7687	0,8678	0,2500

Cálculo por meio do software JASP. Fonte: o autor.

Tabela 5.9-6 Resultado da rANOVA do tempo de estabilidade para densidade

Interação	Correção de Esfericidade	Soma dos Quadrados	DF	Soma das Médias	F	p	η^2_G
Tempo	G-G	0,1699	3,079	0,0552	75,9126	$3,77 \times 10^{-25}$	0,7167
Tempo - Emulsão	G-G	0,0598	9,237	0,0065	8,9043	$1,11 \times 10^{-9}$	0,4710
Tempo - Condição	G-G	0,0111	6,158	0,0018	2,4793	0,0276	0,1418
Resíduos	G-G	0,0672	92,369	0,0007			

Usada soma dos quadrados tipo III. G-G: Correção de Greenhouse-Geisser. Cálculo utilizando software JASP. Fonte: o autor.

No que se refere a densidade ocorreu mudança significativa ao longo do tempo, nas condições ambientais que as amostras foram submetidas e para as emulsões. Analisando atentamente nota-se uma leve tendência de alta na densidade com o tempo, principalmente nas emulsões submetidas a estufa, Tabela 5.9-4. A hipótese física associada a esse efeito seria perda de água por processo evaporativo.

5.9.1.3 Viscosidade

Assim como no item anterior, a viscosidade foi avaliada por meio do viscosímetro Anton Paar modelo SVM 3000 a $40 \pm 0,1$ °C. Os dados para cada formulação, para cada condição ambiental, ao longo do tempo encontram-se na Tabela 5.9-7.

Tabela 5.9-7 Dados Descritivos para a Viscosidade (mPa.s).

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	SE	W	p
1	F8	Geladeira	3	1796	1465	2126	1733	133,07	1,656	1,225	0,830	0,1891
		Ambiente	3	1796	1465	2126	1733	133,07	1,656	1,225	0,830	0,1891
		Estufa	3	1796	1465	2126	1733	133,07	1,656	1,225	0,830	0,1891
	F9	Geladeira	3	2179	1930	2428	2222	100,24	-1,579	1,225	0,861	0,2695
		Ambiente	3	2179	1930	2428	2222	100,24	-1,579	1,225	0,861	0,2695
		Estufa	3	2179	1930	2428	2222	100,24	-1,579	1,225	0,861	0,2695
	F10	Geladeira	3	3377	3101	3654	3363	111,41	0,555	1,225	0,988	0,7922
		Ambiente	3	3377	3101	3654	3363	111,41	0,555	1,225	0,988	0,7922
		Estufa	3	3377	3101	3654	3363	111,41	0,555	1,225	0,988	0,7922
	F11	Geladeira	3	3487	3058	3917	3430	173,04	1,335	1,225	0,916	0,4398
		Ambiente	3	3487	3058	3917	3430	173,04	1,335	1,225	0,916	0,4398
		Estufa	3	3487	3058	3917	3430	173,04	1,335	1,225	0,916	0,4398
16	F8	Geladeira	3	2522	2265	2778	2481	103,2	1,509	1,225	0,881	0,3264
		Ambiente	3	2438	2070	2805	2416	147,82	0,639	1,225	0,984	0,7595
		Estufa	3	2484	2328	2641	2505	62,98	-1,295	1,225	0,923	0,4624
	F9	Geladeira	3	2353	2171	2535	2324	73,14	1,493	1,225	0,885	0,3386
		Ambiente	3	2178	1792	2563	2264	155,26	-1,728	1,225	0,769	0,0424
		Estufa	3	2244	1522	2966	2195	290,66	0,748	1,225	0,978	0,7158
	F10	Geladeira	3	3507	3193	3822	3454	126,68	1,559	1,225	0,867	0,2868
		Ambiente	3	3666	3034	4298	3562	254,35	1,536	1,225	0,874	0,3062
		Estufa	3	3556	3468	3644	3573	35,37	-1,654	1,225	0,831	0,1920
	F11	Geladeira	3	3731	3584	3878	3703	59,3	1,655	1,225	0,831	0,1903
		Ambiente	3	3742	3649	3835	3747	37,33	-0,569	1,225	0,988	0,7869
		Estufa	3	3597	3349	3844	3598	99,7	-0,039	1,225	1,000	0,9856
30	F8	Geladeira	3	2400	2198	2603	2429	81,56	-1,378	1,225	0,909	0,4142
		Ambiente	3	2425	1917	2933	2383	204,58	0,875	1,225	0,969	0,6630
		Estufa	3	2303	2095	2512	2308	84,03	-0,230	1,225	0,998	0,9153
	F9	Geladeira	3	2297	1843	2752	2248	182,96	1,116	1,225	0,947	0,5542
		Ambiente	3	2430	2235	2624	2390	78,14	1,692	1,225	0,809	0,1370
		Estufa	3	2171	1170	3173	2117	403,11	0,601	1,225	0,986	0,7744
	F10	Geladeira	3	3573	3300	3845	3619	109,61	-1,554	1,225	0,869	0,2912
		Ambiente	3	3654	3556	3752	3664	39,32	-1,073	1,225	0,951	0,5745
		Estufa	3	3629	3386	3871	3577	97,57	1,713	1,225	0,791	0,0940
	F11	Geladeira	3	3526	3185	3868	3568	137,47	-1,243	1,225	0,930	0,4902
		Ambiente	3	3800	3384	4217	3826	167,74	-0,664	1,225	0,983	0,7495
		Estufa	3	3479	3301	3656	3457	71,46	1,259	1,225	0,928	0,4822
60	F8	Geladeira	3	2571	2293	2848	2520	111,75	1,620	1,225	0,846	0,2304
		Ambiente	3	2571	2276	2867	2615	118,87	-1,434	1,225	0,898	0,3792
		Estufa	3	2615	2045	3186	2554	229,71	1,115	1,225	0,947	0,5548

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	DP	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Inf.	Sup.			Assimetria	SE	W	p
90	F9	Geladeira	3	2184	1977	2390	2147	83,11	1,608	1,225	0,851	0,2419
		Ambiente	3	2474	2079	2870	2473	159,25	0,037	1,225	0,999	0,9865
		Estufa	3	2487	2117	2857	2568	148,95	-1,724	1,225	0,777	0,0609
	F10	Geladeira	3	3539	2502	4576	3575	417,43	-0,379	1,225	0,995	0,8596
		Ambiente	3	3763	3694	3831	3756	27,56	1,091	1,225	0,949	0,5662
		Estufa	3	3923	3140	4705	4023	314,86	-1,290	1,225	0,924	0,4653
	F11	Geladeira	3	3518	3375	3661	3496	57,62	1,479	1,225	0,888	0,3483
		Ambiente	3	3622	3507	3737	3597	46,36	1,722	1,225	0,780	0,0680
		Estufa	3	3797	3523	4071	3755	110,31	1,472	1,225	0,890	0,3535
	F8	Geladeira	3	2513	2276	2750	2522	95,46	-0,416	1,225	0,994	0,8456
		Ambiente	3	2721	2053	3389	2803	268,84	-1,250	1,225	0,930	0,4869
		Estufa	3	2363	1702	3024	2311	266,15	0,847	1,225	0,971	0,6749
	F9	Geladeira	3	2348	2259	2438	2345	35,98	0,434	1,225	0,993	0,8389
		Ambiente	3	2338	2004	2672	2411	134,47	-1,722	1,225	0,781	0,0689
		Estufa	3	2138	1499	2776	2068	257,15	1,125	1,225	0,946	0,5501
	F10	Geladeira	3	3585	3366	3804	3573	88,22	0,580	1,225	0,987	0,7827
		Ambiente	3	3879	2860	4899	3699	410,37	1,596	1,225	0,855	0,2539
		Estufa	3	3899	2687	5112	4146	488,07	-1,692	1,225	0,809	0,1367
F11	Geladeira	3	3517	3377	3656	3546	56,22	-1,711	1,225	0,794	0,1003	
	Ambiente	3	3616	3313	3920	3681	122,23	-1,716	1,225	0,788	0,0860	
	Estufa	3	3611	3070	4152	3693	217,86	-1,458	1,225	0,893	0,3629	

Onde: N é o número de amostras em cada grupo, IC refere-se ao intervalo de confiança calculado com o número de amostras, a distribuição t de *Student* e significância de 0,05%. DP é o desvio padrão amostral, EP é o erro padrão. Cálculo por meio do software Jamovi. Fonte: o autor.

Nota-se por meio dos parâmetros do teste de normalidade de Shapiro-Wilk, Tabela 5.9-7, que os dados em cada grupos seguem uma tendência de distribuição normal. Assim, como no item anterior, aplica-se o teste de Mauchly para esfericidade, (MAUCHLY, 1940), com o resultado na Tabela 5.9-8. O teste não apresentou significância suficiente para ser considerado uma evidência para se descartar a hipótese nula, H_0 , segundo o estabelecido no item 4.2.11, logo não sendo necessária aplicação de correção na rANOVA.

Tabela 5.9-8 Teste de esfericidade para a variável viscosidade

Variável	Mauchly's W	Aprox. X^2	df	p-value	Greenhouse-Geisser ϵ	Huynh-Feldt ϵ	Lower Bound ϵ
Tempo	0,6171	13,7197	9	0,1333	0,7996	0,9062	0,2500

Cálculo por meio do software JASP. Fonte: o autor.

A análise da Tabela 5.9-9 indica que existe correlação da viscosidade com o tempo de estabilidade, a emulsão e a condição do teste.

Tabela 5.9-9 Resultado da rANOVA para o tempo de estabilidade para a variável viscosidade

Interação	Correção de Esfericidade	Soma dos Quadrados	DF	Soma das Médias	F	p	η^2_G
Tempo	Nenhuma	3,17x10 ⁶	4	7,92 x10 ⁵	24,4324	8,35x10 ⁻¹⁵	0,4489
Tempo - Emulsão	Nenhuma	1,89x10 ⁶	12	1,56 x10 ⁵	4,8575	1,78x10 ⁻⁶	0,3269
Tempo - Condição	Nenhuma	5,77x10 ⁵	8	72085	2,2229	0,0302	0,1291
Resíduos	Nenhuma	3,89x10 ⁶	120	32428			

Usada soma dos quadrados tipo III. Cálculo utilizando software JASP. Fonte: o autor.

5.9.1.4 Concentração de ácido genticóico

Utilizando-se da metodologia apresentada no item 4.2.2 para mensurar a concentração de ácido genticóico de cada formulação submetida ao estudo de estabilidade acelerado por meio da espectrofotometria de fluorescência que foi desenvolvida, item 5.3. Assim, as concentrações, reportadas na forma de teor percentual, encontram-se na Tabela 5.9-10.

Tabela 5.9-10 Dados Descritivos para a teor de ácido genticóico (%)

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	SD	Assimetria		Shapiro-Wilk	
					Lower	Upper			Assimetria	SE	W	p
1	F8	Ambiente	3	1,0322	1,0194	1,0451	1,0307	0,0052	1,2166	1,225	0,9341	0,5042
		Estufa	3	1,0322	1,0194	1,0451	1,0307	0,0052	1,2166	1,225	0,9341	0,5042
		Geladeira	3	1,0322	1,0194	1,0451	1,0307	0,0052	1,2166	1,225	0,9341	0,5042
	F9	Ambiente	3	0,5537	0,5389	0,5685	0,5550	0,0060	-0,9352	1,225	0,9643	0,6369
		Estufa	3	0,5537	0,5389	0,5685	0,5550	0,0060	-0,9352	1,225	0,9643	0,6369
		Geladeira	3	0,5537	0,5389	0,5685	0,5550	0,0060	-0,9352	1,225	0,9643	0,6369
	F10	Ambiente	3	0,1540	0,1420	0,1661	0,1527	0,0048	1,1456	1,225	0,9431	0,5399
		Estufa	3	0,1540	0,1420	0,1661	0,1527	0,0048	1,1456	1,225	0,9431	0,5399
		Geladeira	3	0,1540	0,1420	0,1661	0,1527	0,0048	1,1456	1,225	0,9431	0,5399
F11	Ambiente	3	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0002	-1,7321	1,225	0,7500	0,0000	
	Estufa	3	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0002	-1,7321	1,225	0,7500	0,0000	
	Geladeira	3	0,0000	0,0000	0,0001	0,0000	0,0002	-1,7321	1,225	0,7500	0,0000	
16	F8	Ambiente	3	1,0397	1,0237	1,0557	1,0387	0,0065	0,6801	1,225	0,9820	0,7431
		Estufa	3	1,0182	0,9979	1,0385	1,0163	0,0082	1,0049	1,225	0,9580	0,6060
		Geladeira	3	1,0289	1,0133	1,0445	1,0280	0,0063	0,6299	1,225	0,9847	0,7631
	F9	Ambiente	3	0,5480	0,5385	0,5576	0,5480	0,0039	0,0390	1,225	0,9999	0,9857
		Estufa	3	0,5507	0,5265	0,5749	0,5512	0,0098	-0,2299	1,225	0,9980	0,9152
		Geladeira	3	0,5488	0,5456	0,5520	0,5488	0,0013	0,0000	1,225	1,0000	1,0000
	F10	Ambiente	3	0,1541	0,1526	0,1556	0,1541	0,0006	0,0000	1,225	1,0000	1,0000
		Estufa	3	0,1519	0,1515	0,1522	0,1519	0,0002	-0,9352	1,225	0,9643	0,6369
		Geladeira	3	0,1526	0,1496	0,1556	0,1525	0,0012	0,4916	1,225	0,9908	0,8168
F11	Ambiente	3	0,0000	-0,0003	0,0001	0,0000	0,0002	0,9352	1,225	0,9643	0,6369	
	Estufa	3	0,0000	-0,0001	0,0001	0,0000	0,0001	1,2933	1,225	0,9231	0,4633	

Tempo	Emulsão	Condição	N	Média	IC 95%		Mediana	SD	Assimetria		Shapiro-Wilk		
					Lower	Upper			Assimetria	SE	W	p	
30	F8	Geladeira	3	0,0000	-0,0001	0,0002	0,0000	0,0001	-1,5971	1,225	0,8547	0,2530	
		Ambiente	3	1,0279	1,0203	1,0355	1,0280	0,0031	-0,1473	1,225	0,9992	0,9458	
		Estufa	3	1,0117	0,9986	1,0248	1,0098	0,0053	1,4281	1,225	0,8992	0,3829	
	F9	Geladeira	3	1,0297	1,0255	1,0339	1,0293	0,0017	1,0768	1,225	0,9508	0,5729	
		Ambiente	3	0,5507	0,5299	0,5715	0,5521	0,0084	-0,7301	1,225	0,9791	0,7230	
		Estufa	3	0,5367	0,5322	0,5412	0,5358	0,0018	1,6795	1,225	0,8176	0,1572	
	F10	Geladeira	3	0,5554	0,5086	0,6022	0,5603	0,0188	-1,0915	1,225	0,9492	0,5660	
		Ambiente	3	0,1509	0,1422	0,1595	0,1496	0,0035	1,4216	1,225	0,9005	0,3871	
		Estufa	3	0,1490	0,1487	0,1493	0,1489	0,0001	1,7321	1,225	0,7500	0,0000	
	60	F8	Geladeira	3	0,1513	0,1433	0,1593	0,1499	0,0032	1,5825	1,225	0,8596	0,2665
			Ambiente	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0001	0,0001	0,0000	1,225	1,0000	1,0000
			Estufa	3	0,0000	-0,0001	0,0000	0,0000	0,0003	-0,9352	1,225	0,9643	0,6369
F9		Geladeira	3	0,0000	-0,0001	0,0001	0,0003	0,0004	-1,1521	1,225	0,9423	0,5367	
		Ambiente	3	1,0216	1,0143	1,0289	1,0212	0,0029	0,6048	1,225	0,9859	0,7729	
		Estufa	3	1,0048	1,0004	1,0093	1,0047	0,0018	0,3308	1,225	0,9959	0,8777	
F10		Geladeira	3	1,0183	0,9985	1,0381	1,0138	0,0080	1,7308	1,225	0,7608	0,0240	
		Ambiente	3	0,5438	0,5353	0,5524	0,5420	0,0034	1,7172	1,225	0,7868	0,0833	
		Estufa	3	0,5276	0,5122	0,5431	0,5246	0,0062	1,6715	1,225	0,8223	0,1688	
F11		Geladeira	3	0,5440	0,5231	0,5650	0,5477	0,0084	-1,5879	1,225	0,8578	0,2616	
		Ambiente	3	0,1501	0,1403	0,1600	0,1480	0,0040	1,7209	1,225	0,7821	0,0724	
		Estufa	3	0,1442	0,1439	0,1446	0,1442	0,0002	0,9352	1,225	0,9643	0,6369	
90	F8	Geladeira	3	0,1510	0,1505	0,1516	0,1511	0,0002	-1,2933	1,225	0,9231	0,4633	
		Ambiente	3	0,0000	-0,0012	0,0001	0,0000	0,0003	-1,7321	1,225	0,7500	0,0000	
		Estufa	3	0,0000	-0,0017	0,0000	0,0000	0,0007	-0,2299	1,225	0,9980	0,9152	
	F9	Geladeira	3	-0,0001	-0,0001	0,0000	0,0000	0,0002	-1,2933	1,225	0,9231	0,4633	
		Ambiente	3	1,0161	1,0005	1,0316	1,0127	0,0063	1,7197	1,225	0,7837	0,0762	
		Estufa	3	0,9425	0,9301	0,9549	0,9438	0,0050	-1,0949	1,225	0,9489	0,5644	
	F10	Geladeira	3	1,0158	0,9896	1,0420	1,0108	0,0105	1,6549	1,225	0,8309	0,1907	
		Ambiente	3	0,5377	0,5070	0,5683	0,5341	0,0123	1,1918	1,225	0,9374	0,5169	
		Estufa	3	0,5144	0,5011	0,5278	0,5119	0,0054	1,6506	1,225	0,8330	0,1960	
	F11	Geladeira	3	0,5375	0,5222	0,5527	0,5404	0,0061	-1,6581	1,225	0,8293	0,1867	
		Ambiente	3	0,1452	0,1383	0,1521	0,1443	0,0028	1,3106	1,225	0,9204	0,4537	
		Estufa	3	0,1428	0,1217	0,1638	0,1420	0,0085	0,4037	1,225	0,9939	0,8502	
F8	Geladeira	3	0,1509	0,1501	0,1517	0,1510	0,0003	-1,5454	1,225	0,8710	0,2983		
	Ambiente	3	0,0000	0,0000	0,0000	0,0003	0,0002	1,2933	1,225	0,9231	0,4633		
	Estufa	3	0,0000	-0,0001	0,0000	0,0006	0,0009	-1,7078	1,225	0,7967	0,1066		
F9	Geladeira	3	0,0000	-0,0000	0,0000	0,0000	0,0006	0,7822	1,225	0,9758	0,7017		

Onde: N é o número de amostras em cada grupo, IC refere-se ao intervalo de confiança calculado com o número de amostras, a distribuição t de *Student* e significância de 0,05%. DP é o desvio padrão amostral, EP é o erro padrão. Cálculo por meio do software Jamovi. Fonte: o autor.

Na Tabela 5.9-10 acima, pode-se verificar por meio dos parâmetros do teste de normalidade de Shapiro-Wilk que na maioria dos grupos atendem os requisitos de

normalidade. Da mesma forma que em itens anteriores assume-se que a estatística F é robusta, suportando este nível de desvio mesmo com um número de amostras baixo em cada subgrupo $n=3$, (BLANCA *et al.*, 2017; KHAN; RAYNER, 2003).

A aplicação do teste de esfericidade aponta a necessidade de correção do grau de liberdade da rANOVA, Tabela 5.9-11.

Tabela 5.9-11 Teste de esfericidade para o teor de ácido gentísico.

Variável	Mauchly's W	Aprox. X^2	df	p-value	Greenhouse-Geisser ϵ	Huynh-Feldt ϵ	Lower Bound ϵ
Tempo	0,1393	56,0192	98,39	10^{-9}	0,4815	0,5139	0,2500

Cálculo por meio do software JASP. Fonte: o autor.

Tabela 5.9-12 Resultado da rANOVA para o tempo de estabilidade para a variável teor de ácido gentísico.

Interação	Correção de Esfericidade	Soma dos Quadrados	DF	Soma das Médias	F	p	η^2_G
Tempo	G-G	0,0074	1,9262	0,0039	30,1437	$1,66 \times 10^{-9}$	0,5012
Tempo - Emulsão	G-G	0,0058	5,7785	0,0001	7,8105	$4,55 \times 10^{-6}$	0,4385
Tempo - Condição	G-G	0,0031	3,8523	0,0008	6,2768	0,0003	0,2950
Resíduos	G-G	0,0074	57,78	0,0001			

Usada soma dos quadrados tipo III. G-G: Correção de Greenhouse-Geisser. Cálculo utilizando software JASP. Fonte: o autor.

A aplicação da rANOVA demonstra que houve significativa correlação com todos os fatores testados, como o tempo de estabilidade acelerada, a emulsão e a condição de teste. No fator emulsão essa interação já era esperada, pois as emulsões são formuladas com teores de ativo diferentes.

Já para em relação ao tempo de estabilidade. A diferença média do teor de ácido gentísico para as formulações F8 a F10 entre o 1º e o 90º dia do teste de estabilidade, com base na Tabela 5.9-10 é de -0,0241%, sendo essa variação do teor do ativo considerada baixa. No entanto, visto a exatidão do método analítico, a análise estatística consegue detectar que essa variação existe e não é associada a uma variação aleatória. Isso faz sentido uma vez que é esperado que o teor de ativo decaia com o tempo.

5.9.2 Estabilidade dos parâmetros organolépticos

Dentro da avaliação organoléptica foram avaliados os parâmetros odor, aspecto e cor.

5.9.2.1 Odor

Avaliação de odor foi feita seguindo o guia de estabilidade de produtos cosméticos, (ANVISA, 2004), onde retirou-se as embalagens da geladeira ou estufa deixando-as sobre a bancada até alcançar equilíbrio térmico com o ambiente. Abriu-se a embalagem e com o uso do movimento *wafting motion*, inspecionou-se o odor com o uso do olfato. Resultados estão disponíveis na Tabela 5.9-13.

Tabela 5.9-13 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico odor.

Formulação	Ambiente	Período				
		0	2S	1M	2M	3M
F8	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal

Fonte: o autor

Não ocorreu nenhuma alteração de odor para as condições testadas.

5.9.2.2 Aspecto

Avaliação de aparência também seguiu o guia de estabilidade de produtos cosméticos, (ANVISA, 2004), aproveitando o momento da realização da análise do item anterior, observou-se a amostra em busca de alterações. Resultados estão disponíveis na Tabela 5.9-14.

Não foi observado alteração significativa de aspecto. Foram consideradas normais as seguintes condições: condensação interna na tampa nas amostras que saíram da geladeira ou estufa, leve alteração de brilho da superfície devido ao desprendimento de ar emulsionado no processo de agitação ou avarias externas na embalagem não relacionadas a emulsão propriamente dita.

Houve uma ocorrência da tampa polimérica trincar-se na formulação F8 submetida a geladeira após 60 dias. A tampa foi trocada e foi observado alteração na emulsão.

Tabela 5.9-14 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico aspecto.

Formulação	Ambiente	Período				
		0	2S	1M	2M	3M
F8	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal

Fonte: o autor.

5.9.2.3 Cor

Avaliação de cor, assim como os demais parâmetros organolépticos anteriores, seguiu o guia de estabilidade de produtos cosméticos, (ANVISA, 2004, p. 32), aproveitando o momento da realização das outras análises organolépticas. Resultados estão disponíveis na Tabela 5.9-15

Tabela 5.9-15 Resultado da avaliação do parâmetro organoléptico cor.

Formulação	Ambiente	Período				
		0	2S	1M	2M	3M
F8	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F8	Estufa	normal	normal	normal	normal	modificada
F9	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F9	Estufa	normal	normal	normal	normal	modificada
F10	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F10	Estufa	normal	normal	normal	normal	modificada
F11	Geladeira	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Ambiente	normal	normal	normal	normal	normal
F11	Estufa	normal	normal	normal	normal	normal

Fonte: o autor.

Constatou-se alteração de cor nas formulações F8 a F10 submetidas a estufa no período de 90 dias, como apontado na Tabela 5.9-15. As amostras em questão passaram de uma cor branca para rosado, mas a amostra F11 também submetida a estufa, que é o controle, ou seja, sem a adição do ativo, não apresentou essa alteração, logo presume-se que a modificação de cor foi causada pelo ácido genticóico nos três níveis de concentração testados.

6 CONCLUSÃO

Os dados apresentados permitem concluir que a metodologia analítica de espectrofotometria de fluorescência validada com limites de detecção da ordem de 1 e quantificação de 3 µg/L é consideravelmente mais simples, rápida e barata quando comparada com as que se baseiam-se em HPLC. Além disso, apresenta valores de quantificação tão exatos e precisos quanto esse.

Além da metodologia escolhida o trabalho demonstra dados contundentes de espectrofotometria (UV/VIS) ou HPLC-UV que podem ser usados para análises dependendo do interesse e disponibilidade de equipamentos em trabalhos futuros.

O ativo apresenta excelente atividade antioxidante e com cinética mais lenta que o ácido ascórbico, o que pode ser interessante para o desenvolvimento de produtos com intenção de promover efeito mais duradouro.

Concentrações, por volta de 4 mM, do ácido gentísico não apresentam citotoxicidade para as células humanas estudadas e existe evidência de um provável efeito citoprotetor, o que requer um estudo específico para completa elucidação

O efeito antimicrobiano frente aos microrganismos testados está por volta de 3 a 4 mg/mL o que seria algo em torno de 20 a 25 mM. Essa concentração entra na faixa de citotoxicidade, não permitindo a aplicação cutânea com finalidade antimicrobiana. No entanto, essa é uma conclusão conservadora, pelo fato do método aqui empregado ser sensível ao pH. O possível efeito atenuador que a incorporação do ativo no sistema emulsionado proporcionaria não foi testado por restrições metodológicas.

Aplicação cutânea em baixa concentração mostra-se promissora pela excelente atividade antioxidante e um potencial para proteção celular. Outro aspecto promissor em futuras investigações é o uso de nanotecnologia objetivando a redução da dose para obter-se o efeito antimicrobiano em doses não tóxicas às células humanas.

7 REFERÊNCIAS

- ABEDI, F.; RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. A review on gentisic acid as a plant derived phenolic acid and metabolite of aspirin: Comprehensive pharmacology, toxicology, and some pharmaceutical aspects. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 729–741, 2020.
- ADHIKARI, M.; JOSHI, N. K.; JOSHI, H. C.; MEHATA, M. S.; MISHRA, H.; PANT, S. Revisiting the photochemistry 2,5-dihydroxy benzoic acid (gentisic acid): Solvent and pH effect. **Journal of Physical Organic Chemistry**, [s. l.], v. 34, n. 4, 2021.
- AHMED, I.; RABBI, Md. B.; SULTANA, S. Antibiotic resistance in Bangladesh: A systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 80, p. 54–61, 2019.
- AKBAR, A.; ANAL, A. K. Food safety concerns and food-borne pathogens, Salmonella, Escherichia coli and Campylobacter. **FUUAST journal of Biology**, [s. l.], v. 1, n. 1 June, p. 5–17, 2011. Disponível em: <https://fuuastjb.org/index.php/fuuastjb/article/view/340>. Acesso em: 3 abr. 2023.
- AKHLAGHI, S. P.; DA SILVEIRA BALESTRIN, L. B.; BRINATTI, C.; PIROLT, F.; LOH, W.; GLATTER, O. Preparation and Characterization of Stabilizer-Free Phytantriol-Based Water-in-Oil Internally Liquid Crystalline Emulsions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 2024–2032, 2020.
- ALDEHLAWI, H.; USMAN, S.; LALLI, A.; AHMAD, F.; WILLIAMS, G.; TEH, M. T.; WASEEM, A. Serum lipids, retinoic acid and phenol red differentially regulate expression of keratins K1, K10 and K2 in cultured keratinocytes. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020.
- ALONSO, C.; COLLINI, I.; CARRER, V.; BARBA, C.; MARTÍ, M.; CODERCH, L. Permeation kinetics of active drugs through lanolin-based artificial membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 192, p. 111024, 2020.
- ALTINOZ, M. A.; ELMACI, I.; CENGIZ, S.; EMEKLI-ALTURFAN, E.; OZPINAR, A. From epidemiology to treatment: Aspirin's prevention of brain and breast-cancer and cardioprotection may associate with its metabolite gentisic acid. **Chemico-Biological Interactions**, [s. l.], v. 291, p. 29–39, 2018.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.

AL-ZOREKY, N. S. Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 134, n. 3, p. 244–248, 2009.

ANSALDO, E.; FARLEY, T. K.; BELKAID, Y. Control of Immunity by the Microbiota. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 449–479, 2021.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. 1. ed. Brasília: ANVISA, 2004. 2004.

ANVISA. Ministério da Saúde. RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**.: Brasil, 2017, 2017.

ARBAB, S.; ULLAH, H.; WANG, W.; ZHANG, J. Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. **Veterinary Medicine and Science**, [s. l.], v. 8, n. 4, p. 1780–1786, 2022.

ARENS, E. A.; ZHANG, H. The skin's role in human thermoregulation and comfort. *Em*: PAN, N.; GIBSON, P. (org.). **Thermal and moisture transport in fibrous materials**. Cambridge, England: Woodhead Publishing, 2006. p. 560–577.

AZIMI, T.; MAHAM, S.; FALLAH, F.; AZIMI, L.; GHOLINEJAD, Z. Evaluating the antimicrobial resistance patterns among major bacterial pathogens isolated from clinical specimens taken from patients in Mofid Children's Hospital, Tehran, Iran: 2013–2018. **Infection and Drug Resistance**, [s. l.], v. 12, p. 2089–2102, 2019.

BAI, A. D.; LO, C. K. L.; KOMOROWSKI, A. S.; SURESH, M.; GUO, K.; GARG, A.; TANDON, P.; SENECA, J.; DEL CORPO, O.; STEFANOVA, I.; FOGARTY, C.; BUTLER-LAPORTE, G.; MCDONALD, E. G.; CHENG, M. P.; MORRIS, A. M.; LOEB, M.; LEE, T. C. Staphylococcus aureus bacteraemia mortality: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 28, n. 8, p. 1076–1084, 2022.

BAJPAI, A.; LI, R.; CHEN, W. The cellular mechanobiology of aging: from biology to mechanics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [s. l.], v. 1491, n. 1, p. 3–24, 2021.

BARRY, B. W.; EL EINI, D. I. Influence of non-ionic surfactants on permeation of hydrocortisone, dexamethasone, testosterone and progesterone across cellulose acetate membrane. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 219–227, 1976.

- BARRY, B. W.; WOODFORD, R. Comparative bio-availability and activity of proprietary topical corticosteroid preparations: vasoconstrictor assays on thirty-one ointments. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 93, n. 5, p. 563–571, 1975.
- BARRY, B. W.; WOODFORD, R. Comparative bio-availability of proprietary topical corticosteroid preparations; vasoconstrictor assays on thirty creams and gels. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 323–338, 1974.
- BAVIERA, G.; LEONI, M. C.; CAPRA, L.; CIPRIANI, F.; LONGO, G.; MAIELLO, N.; RICCI, G.; GALLI, E. Microbiota in Healthy Skin and in Atopic Eczema. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–6, 2014.
- BEILIN, A. K.; RIPPA, A. L.; SHAROBARO, V. I.; GURSKAYA, N. G.; VOROTELYAK, E. A. The reconstructed human epidermis *in vitro* - a model for basic and applied research of human skin. **Vestnik dermatologii i venerologii**, [s. l.], v. 96, n. 2, 2020.
- BEISL, S.; BINDER, M.; VARMUZA, K.; MILTNER, A.; FRIEDL, A. UV-Vis spectroscopy and chemometrics for the monitoring of organosolv pretreatments. **ChemEngineering**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 45, 2018.
- BERGER, V. W.; ZHOU, Y. Kolmogorov–Smirnov Test: Overview. *Em*: BALAKRISHNAN, N.; COLTON, T.; EVERITT, B.; PIEGORSCH, W.; RUGGERI, F.; TEUGELS, J. L. (org.). **Wiley StatsRef: Statistics Reference Online**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd, 2014. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9781118445112.stat06558>. Acesso em: 27 mar. 2022.
- BIGLER, J.; WHITTON, J.; LAMPE, J. W.; FOSDICK, L.; BOSTICK, R. M.; POTTER, J. D. CYP2C9 and UGT1A6 genotypes modulate the protective effect of aspirin on colon adenoma risk. **Cancer research**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. 3566–9, 2001.
- BIKELS-GOSHEN, T.; LANDAU, E.; SAGUY, S.; SHAPIRA, R. Staphylococcal strains adapted to epigallocatechin gallate (EGCG) show reduced susceptibility to vancomycin, oxacillin and ampicillin, increased heat tolerance, and altered cell morphology. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 138, n. 1–2, p. 26–31, 2010.
- BITSCHAR, K.; SAUER, B.; FOCKEN, J.; DEHMER, H.; MOOS, S.; KONNERTH, M.; SCHILLING, N. A.; GROND, S.; KALBACHER, H.; KURSCHUS, F. C.; GÖTZ, F.; KRISMER, B.; PESCHEL, A.; SCHITTEK, B. Lugdunin amplifies innate immune responses in the skin in synergy with host- and microbiota-derived factors. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 2730, 2019.

- BLANCA, M. J.; ALARCÓN, R.; ARNAU, J.; BONO, R.; BENDAYAN, R. Non-normal data: Is ANOVA still a valid option?. **Psicothema**, [s. l.], v. 29, n. 4, p. 552–557, 2017.
- BLASER, M. J.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G. The human microbiome before birth. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 558–560, 2016.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH· free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 30, n. 6, p. 609–615, 1997.
- BORGES, R. S.; CASTLE, S. L. The antioxidant properties of salicylate derivatives: A possible new mechanism of anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 25, n. 21, p. 4808–4811, 2015.
- BOUWSTRA, J. A.; GOORIS, G. S.; DUBBELAAR, F. E.; WEERHEIM, A. M.; PONEC, M. pH, cholesterol sulfate, and fatty acids affect the stratum corneum lipid organization. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 69–74, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BREUSCH, T. S.; PAGAN, A. R. A simple test for heteroscedasticity and random coefficient variation. **Econometrica**, [s. l.], v. 47, n. 5, p. 1287–1294, 1979.
Disponível em: <https://ideas.repec.org/a/econ/emetrp/v47y1979i5p1287-94.html>.
Acesso em: 30 jul. 2022.
- BROWN, N. M.; GOODMAN, A. L.; HORNER, C.; JENKINS, A.; BROWN, E. M. Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): updated guidelines from the UK. **JAC-Antimicrobial Resistance**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2021.
- BURDICK, K. H.; HALEBLIAN, J. K.; POULSEN, B. J.; COBNER, S. E. Corticosteroid ointments: comparison by two human bioassays. **Current Therapeutic Research, Clinical and Experimental**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 233–42, 1973.
- BYRNE, F. P.; JIN, S.; PAGGIOLA, G.; PETCHEY, T. H. M.; CLARK, J. H.; FARMER, T. J.; HUNT, A. J.; ROBERT MCELROY, C.; SHERWOOD, J. Tools and techniques for solvent selection: green solvent selection guides. **Sustainable Chemical Processes**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 7, 2016.
- CARMO, M. A. V. do; FIDELIS, M.; PRESSETE, C. G.; MARQUES, M. J.; CASTRO-GAMERO, A. M.; MYODA, T.; GRANATO, D.; AZEVEDO, L. Hydroalcoholic *Myrciaria dubia* (camu-camu) seed extracts prevent chromosome damage and act as

antioxidant and cytotoxic agents. **Food Research International**, [s. l.], v. 125, p. 108551, 2019.

CASSON, R. J.; FARMER, L. D. Understanding and checking the assumptions of linear regression: a primer for medical researchers. **Clinical & Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 42, n. 6, p. 590–596, 2014.

CAVALLO, I.; SIVORI, F.; TRUGLIO, M.; DE MAIO, F.; LUCANTONI, F.; CARDINALI, G.; PONTONE, M.; BERNARDI, T.; SANGUINETTI, M.; CAPITANIO, B.; CRISTAUDO, A.; ASCENZIONI, F.; MORRONE, A.; PIMPINELLI, F.; DI DOMENICO, E. G. Skin dysbiosis and *Cutibacterium acnes* biofilm in inflammatory acne lesions of adolescents. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 21104, 2022.

CHENG, M. P.; LAWANDI, A.; BUTLER-LAPORTE, G.; DE L'ÉTOILE-MOREL, S.; PAQUETTE, K.; LEE, T. C. Adjunctive daptomycin in the treatment of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: A randomized, controlled trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. e196–e203, 2021.

CHEUNG, G. Y. C.; BAE, J. S.; OTTO, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. **Virulence**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 547–569, 2021.

CHOI, S.-J.; SONG, M.-G.; SUNG, W.-T.; LEE, D.-Y.; LEE, J.-H.; LEE, E.-S.; YANG, J.-M. Comparison of transepidermal water loss, capacitance and pH values in the skin between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis patients. **Journal of Korean medical science**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 93–6, 2003.

CHRISTIE, G. A.; MOORE-ROBINSON, M. Vehicle assessment — Methodology and results. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 82, n. s6, p. 93–93, 1970.

CHU, D. M.; MA, J.; PRINCE, A. L.; ANTONY, K. M.; SEFEROVIC, M. D.; AAGAARD, K. M. Maturation of the infant microbiome community structure and function across multiple body sites and in relation to mode of delivery. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 314–326, 2017.

COLDMAN, M. F.; LOCKERBIE, L.; LAWS, E. A. The evaluation of several topical corticosteroid preparations in the blanching test. **British Journal of Dermatology**, [s. l.], v. 85, n. 4, p. 381–387, 1971.

CONWILL, A.; KUAN, A. C.; DAMERLA, R.; PORET, A. J.; BAKER, J. S.; TRIPP, A. D.; ALM, E. J.; LIEBERMAN, T. D. Anatomy promotes neutral coexistence of strains in the human skin microbiome. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 171–182, 2022.

CORBO, M. Techniques for conducting *in vitro* release studies on semisolid formulations. **Dissolution Technologies**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 3–6, 1995.

CORDINGLEY, L.; NELSON, P. A.; DAVIES, L.; ASHCROFT, D.; BUNDY, C.; CHEW-GRAHAM, C.; CHISHOLM, A.; ELVIDGE, J.; HAMILTON, M.; HILTON, R.; KANE, K.; KEYWORTH, C.; LITTLEWOOD, A.; LOVELL, K.; LUNT, M.; MCATEER, H.; NTAIS, D.; PARISI, R.; PEARCE, C.; RUTTER, M.; SYMMONS, D.; YOUNG, H.; GRIFFITHS, C. E. Identifying and managing psoriasis-associated comorbidities: the IMPACT research programme. **Programme Grants for Applied Research**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 1–240, 2022.

CÓRDOBA-DÍAZ, M.; NOVA, M.; ELORZA, B.; CÓRDOBA-DÍAZ, D.; CHANTRES, J. R.; CÓRDOBA-BORREGO, M. Validation protocol of an automated in-line flow-through diffusion equipment for in vitro permeation studies. **Journal of controlled release**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 357–367, 2000.

CORRÊA, M. Antonio. **Cosmetologia / ciência e técnica**. São Paulo: Livraria e Editora Medfarma, 2012.

CORVEC, S.; DAGNELIE, M.-A.; KHAMMARI, A.; DRÉNO, B. Taxonomy and phylogeny of Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes in inflammatory skin diseases. **Annales de Dermatologie et de Vénérologie**, [s. l.], v. 146, n. 1, p. 26–30, 2019.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science**, [s. l.], v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 2009.

DA SILVA, J. B.; DE BESSA, M. E.; SANTOS MAYORGA, O. A.; ANDRADE, V. T.; DA COSTA, Y. F. G.; DE FREITAS MENDES, R.; PIRES FERREIRA, A. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S. A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 123, p. 385–392, 2018.

DANBY, S. G.; CORK, M. J. pH in atopic Dermatitis. **Current problems in dermatology**, [s. l.], v. 54, p. 95–107, 2018.

DETHLEFSEN, L.; MCFALL-NGAI, M.; RELMAN, D. A. An ecological and evolutionary perspective on human–microbe mutualism and disease. **Nature**, [s. l.], v. 449, n. 7164, p. 811–818, 2007.

DOLAN, J. W. How much retention time variation is normal?. **LCGC North America**, [s. l.], v. 32, n. 8, p. 546–551, 2014. Disponível em: <https://www.chromatographyonline.com/view/how-much-retention-time-variation-normal-0>. Acesso em: 22 mar. 2023.

DONG, M. W. How to be more successful with HPLC analysis: Practical aspects in HPLC operation. *Em*: AHUJA, Satinder; DONG, Michael W. (org.). **Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC**. San Diego, CA: Academic Press, 2005.

(Separation Science and Technology). v. 6, p. 255–271. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0149639505800534>. Acesso em: 30 jul. 2022.

DORADO, J. G.; FRAILE, P. A. Anatomía y fisiología de la piel. **Pediatría Integral**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 156.e1-156.e13, 2021.

DRÉNO, B.; DAGNELIE, M. A.; KHAMMARI, A.; CORVEC, S. The skin microbiome: A new actor in inflammatory acne. **American Journal of Clinical Dermatology**, [s. l.], v. 21, n. S1, p. 18–24, 2020.

DRISKELL, R. R.; LICHTENBERGER, B. M.; HOSTE, E.; KRETZSCHMAR, K.; SIMONS, B. D.; CHARALAMBOUS, M.; FERRON, S. R.; HERAULT, Y.; PAVLOVIC, G.; FERGUSON-SMITH, A. C.; WATT, F. M. Distinct fibroblast lineages determine dermal architecture in skin development and repair. **Nature**, [s. l.], v. 504, n. 7479, p. 277–281, 2013.

DUMAS, K. J.; SCHOLTZ, J. R. The psoriasis bio-assay for topical corticosteroid activity. **Acta dermato-venereologica**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 43–8, 1972.

EGAN, K. M.; NABORS, L. B.; THOMPSON, Z. J.; ROZMESKI, C. M.; ANIC, G. A.; OLSON, J. J.; LAROCCA, R. V.; CHOWDHARY, S. A.; FORSYTH, P. A.; THOMPSON, R. C. Analgesic use and the risk of primary adult brain tumor. **European Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 917–925, 2016.

ELHASSAN, G. O. Preparation and characterization of itraconazole transdermal patches containing single-phase emulgel. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, p. 195–200, 2022.

EMA. Quality and equivalence of topical products - Scientific guideline. **European Medicines Agency**: The Netherlands, 14 Dec. 2018. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/quality-equivalence-topical-products-scientific-guideline#current-version-section>. Acesso em: 12 abr. 2023.

ERDEMGIL, F.; SANLI, S.; SANLI, N.; OZKAN, G.; BARBOSA, J.; GUITERAS, J.; BELTRAN, J. Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. **Talanta**, [s. l.], v. 72, n. 2, p. 489–496, 2007.

ERNST HEUSS. Die Reaktion des Schweisses beim gesudem Menschen. **Monatsh Parkt Dermat**, [s. l.], v. 14, p. 343–349, 1892.

FAITH, J. J.; GURUGE, J. L.; CHARBONNEAU, M.; SUBRAMANIAN, S.; SEEDORF, H.; GOODMAN, A. L.; CLEMENTE, J. C.; KNIGHT, R.; HEATH, A. C.; LEIBEL, R. L.; ROSENBAUM, M.; GORDON, J. I. The long-term stability of the human gut microbiota. **Science**, [s. l.], v. 341, n. 6141, 2013.

FALCONI, G. Paper-Patch test for evaluating vasoconstrictive activity of corticosteroids. **Archives of Dermatology**, [s. l.], v. 105, n. 6, p. 856, 1972.

FDA. **Best practices for topical generic product development and ANDA submission**. Silver Spring, MD: United State Food and Drug Administration, 2022a. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/news-events-human-drugs/best-practices-topical-generic-product-development-and-anda-submission-08112022>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FDA. **In vitro bioequivalence data for a topical product: Bioequivalence review perspective**. Silver Spring, MD: United State Food and Drug Administration, 2017. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/110389/download>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FDA. *In vitro* release test studies for topical drug products submitted in ANDAs. **United States Food and Drug Administration: USA**, 2022b. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/162476/download>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FDA. Nonsterile semisolid dosage forms (SUPAC-SS) chemistry. **United States Food and Drug Administration: USA**, 1997. Disponível em: <https://www.regulations.gov/docket/FDA-1997-D-0380/document>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FDA. Topical dermatologic corticosteroids: *In vivo* bioequivalence. **United States Food and Drug Administration: USA**, 1995. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/70931/download>. Acesso em: 12 abr. 2023.

FELDEKOVÁ, E.; KOSOVÁ, M.; BERČÍKOVÁ, M.; DRAGOUN, M.; KLOJDOVÁ, I.; HRÁDKOVÁ, I.; ŠMIDRKAL, J. Antimicrobial properties of phenolic acid alkyl esters. **Czech Journal of Food Sciences**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 438–444, 2022.

FERNÁNDEZ, I. S.; CUEVAS, P.; ANGULO, J.; LÓPEZ-NAVAJAS, P.; CANALES-MAYORDOMO, Á.; GONZÁLEZ-CORROCHANO, R.; LOZANO, R. M.; VALVERDE, S.; JIMÉNEZ-BARBERO, J.; ROMERO, A.; GIMÉNEZ-GALLEGO, G. Gentisic acid, a compound associated with plant defense and a metabolite of aspirin, heads a new class of in vivo fibroblast growth factor inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 15, p. 11714–11729, 2010.

FICK, A. Ueber diffusion. **Annalen der Physik und Chemie**, [s. l.], v. 170, n. 1, p. 59–86, 1855.

FLOOD, K. S.; HOUSTON, N. A.; SAVAGE, K. T.; KIMBALL, A. B. Genetic basis for skin youthfulness. **Clinics in Dermatology**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 312–319, 2019.

FLORINDA, M. B. Barrera epidérmica en dermatitis atópica. **Rev Asoc Col Dermatol**, [s. l.], v. 16, n. 4, 2008.

FOX, J.; WEISBERG, S.; PRICE, B.; ADLER, D.; BATES, D.; BAUD-BOVY, G.; BOLKER, B.; ELLISON, S.; FIRTH, D.; FRIENDLY, M.; GORJANC, G.; GRAVES, S.; HEIBERGER, R.; LABOISSIERE, R.; MAECHLER, M.; MONETTE, G.; MURDOCH, D.; NILSSON, H.; OGLE, D.; RIPLEY, B.; VENABLES, W.; WALKER, S.; WINSEMIUS, D.; ZEILEIS, A.; R-CORE. Package 'car': Companion to applied Regression. **CRAN Repository**, [s. l.], 2021.

FRANCUZIK, W.; FRANKE, K.; SCHUMANN, R.; HEINE, G.; WORM, M. Propionibacterium acnes Abundance Correlates Inversely with Staphylococcus aureus: Data from atopic dermatitis skin Microbiome. **Acta Dermato Venereologica**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 490–495, 2018.

FRANZ, T. J. Percutaneous absorption. On the relevance of *in vitro* data. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 190–195, 1975.

FRIBERG, S. E. Micelles microemulsions liquid crystals and the structure of stratum corneum lipids. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, [s. l.], v. 41, n. 3, p. 155–172, 1990.

FRIEDMAN, D.; STOUT, J. E.; MCGARRY, S. A.; TRIVETTE, S. L.; BRIGGS, J. P.; LAMM, W.; CLARK, C.; MACFARQUHAR, J.; WALTON, A. L.; RELLER, L. B.; SEXTON, D. J. Health care – Associated bloodstream infections in adults: A reason to change the accepted definition of community-acquired infections. **Annals of Internal Medicine**, [s. l.], v. 137, n. 10, p. 791–797, 2002.

GARZÓN, A.; BRAVO, I.; CARRIÓN-JIMÉNEZ, M. R.; RUBIO-MORAGA, Á.; ALBALADEJO, J. Spectroscopic study on binding of gentisic acid to bovine serum albumin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 150, p. 26–33, 2015.

GEGGEL, C.; SIMSEK, U. B.; TURABIK, M.; OZDEMIR, S. Synthesis of titanium doped iron based metal–organic frameworks and investigation of their biological activities. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 749–757, 2020.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H.; BAGHDADI, A.; TAYEBI-MEIGOONI, A. Alpha-Mangostin-Rich extracts from Mangosteen pericarp: Optimization of green extraction protocol and evaluation of biological activity. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 1852, 2018a.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; BUKHORI, M. F. M.; RAHMAT, M. H.; RAHMAT, A. Assessment and comparison of phytochemical constituents and biological activities of bitter bean (*Parkia speciosa* Hassk.) collected from different locations in Malaysia. **Chemistry Central Journal**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 12, 2018b.

GOLDFELD, S. M.; QUANDT, R. E. Some tests for homoscedasticity. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 60, n. 310, p. 539–547, 1965.

GREENHOUSE, S. W.; GEISSER, S. On methods in the analysis of profile data. **Psychometrika**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 95–112, 1959.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 244–253, 2011.

HACHEM, J.-P.; CRUMRINE, D.; FLUHR, J.; BROWN, B. E.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion. **The Journal of investigative dermatology**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 345–53, 2003.

HACHEM, J.-P.; MAN, M.-Q.; CRUMRINE, D.; UCHIDA, Y.; BROWN, B. E.; ROGIERS, V.; ROSEEUW, D.; FEINGOLD, K. R.; ELIAS, P. M. Sustained serine proteases activity by prolonged increase in pH leads to degradation of lipid processing enzymes and profound alterations of barrier function and stratum corneum integrity. **The Journal of investigative dermatology**, [s. l.], v. 125, n. 3, p. 510–20, 2005.

HARRISON, M. J.; MCCABE, B. P. M. A test for heteroscedasticity based on ordinary least squares residuals. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 74, n. 366, p. 494, 1979.

HARRIS-TRYON, T. A.; GRICE, E. A. Microbiota and maintenance of skin barrier function. **Science**, [s. l.], v. 376, n. 6596, p. 940–945, 2022. Disponível em: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.abo0693>. Acesso em: 1 ago. 2022.

HAVERKAMP, N.; BEAUDUCCEL, A. Violation of the sphericity assumption and its effect on type-I error rates in repeated measures ANOVA and multi-level linear models (MLM). **Frontiers in psychology**, [s. l.], v. 8, p. 1841, 2017.

HENDERSON, R. K.; JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C.; CONSTABLE, D. J. C.; ALSTON, S. R.; INGLIS, G. G. A.; FISHER, G.; SHERWOOD, J.; BINKS, S. P.; CURZONS, A. D. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 854, 2011.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 50, n. 10, p. 874–875, 1961.

HIGUCHI, W. I.; HIGUCHI, T. Theoretical analysis of diffusional movement through heterogeneous barriers. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, [s. l.], v. 49, n. 9, p. 598–606, 1960.

HMDB. **Showing metabocard for Gentisic acid (HMDB0000152)**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://hmdb.ca/metabolites/HMDB0000152>. Acesso em: 8 mar. 2023.

HONARI, G.; MAIBACH, H. Skin structure and function. *Em*: MAIBACH, Howard; HONARI, Golará (org.). **Applied Dermatotoxicology**. Boston: Academic Press, 2014. p. 1–10. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124201309000013>. Acesso em: 30 jul. 2022.

HUANG, H.-C.; SYU, K.-Y.; LIN, J.-K. Chemical Composition of Solanum nigrum Linn Extract and Induction of Autophagy by Leaf Water Extract and Its Major Flavonoids in AU565 Breast Cancer Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 58, n. 15, p. 8699–8708, 2010.

HUYNH, H.; FELDT, L. S. Estimation of the box correction for degrees of freedom from sample data in randomized block and split-plot designs. **Journal of Educational Statistics**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 69–82, 1976.

IBGE. **Projeções da população**. [S. l.: s. n.], 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/sociais/populacao/9109-projecao-da-populacao.html>. Acesso em: 18 jul. 2021.

ICH. Analytical procedure development Q14. **ICH Harmonised Guideline**, [s. l.], 2022. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-q14-analytical-procedure-development-step-2b_en.pdf. Acesso em: 26 jul. 2022.

ICH. Validation of analytical procedures: Text and methodology. **International Conference on Harmonization**, [s. l.], 1995. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf. Acesso em: 26 jul. 2022.

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. **Revista de ciências farmacêuticas básica e aplicada**, [s. l.], v. 29, n. 1, 2008.

ISHIDA-YAMAMOTO, A.; SENSHU, T.; TAKAHASHI, H.; AKIYAMA, K.; NOMURA, K.; IIZUKA, H. Decreased deiminated keratin K1 in psoriatic hyperproliferative epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 114, n. 4, 2000.

JASP TEAM. **JASP**. Versão 0.17.1. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://jasp-stats.org/>. Acesso em: 1 abr. 2023.

JO, J.-H.; HARKINS, C. P.; SCHWARDT, N. H.; PORTILLO, J. A.; ZIMMERMAN, M. D.; CARTER, C. L.; HOSSEN, M. A.; PEER, C. J.; POLLEY, E. C.; DARTOIS, V.; FIGG, W. D.; MOUTSOPOULOS, N. M.; SEGRE, J. A.; KONG, H. H. Alterations of human skin microbiome and expansion of antimicrobial resistance after systemic antibiotics. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 625, 2021.

KABRA, M. P.; BHANDARI, S. S.; SHARMA, A.; GUPTA, R. B. Evaluation of anti-parkinson's activity of gentisic acid in different animal models. **Journal of Acute Disease**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 141–144, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2221618914600317>. Acesso em: 30 jul. 2022.

KALINOWSKA, M.; GOŁĘBIEWSKA, E.; ŚWIDERSKI, G.; MĘCZYŃSKA-WIELGOSZ, S.; LEWANDOWSKA, H.; PIETRYCZUK, A.; CUDOWSKI, A.; ASTEL, A.; ŚWISŁOCKA, R.; SAMSONOWICZ, M.; ZŁOWODZKA, A. B.; PRIEBE, W.; LEWANDOWSKI, W. Plant-Derived and dietary hydroxybenzoic acids — A comprehensive study of structural, anti-/pro-oxidant, lipophilic, antimicrobial, and cytotoxic activity in MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 9, p. 3107, 2021.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KHAN, A.; RAYNER, G. D. Robustness to non-normality of common tests for the many-sample location problem. **Journal of Applied Mathematics and Decision Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 187–206, 2003.

KIM, M.; KIM, J.; SHIN, Y.-K.; KIM, K.-Y. Gentisic acid stimulates keratinocyte proliferation through ERK1/2 phosphorylation. **International Journal of Medical Sciences**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 626–631, 2020.

KIM, S.; SONG, H.; JIN, J. S.; LEE, W. J.; KIM, J. Genomic and phenotypic characterization of *Cutibacterium acnes* bacteriophages Isolated from acne patients. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 11, n. 8, 2022.

LAMOTH, F.; LOCKHART, S. R.; BERKOW, E. L.; CALANDRA, T. Changes in the epidemiological landscape of invasive candidiasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s. l.], v. 73, n. suppl_1, p. i4–i13, 2018.

LANGFORD, B. J.; SO, M.; LEUNG, V.; RAYBARDHAN, S.; LO, J.; KAN, T.; LEUNG, F.; WESTWOOD, D.; DANEMAN, N.; MACFADDEN, D. R.; SOUCY, J.-P. R. Predictors and microbiology of respiratory and bloodstream bacterial infection in patients with COVID-19: living rapid review update and meta-regression. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 491–501, 2022.

LEBEAU, J.; FURMAN, C.; BERNIER, J.-L.; DURIEZ, P.; TEISSIER, E.; COTELLE, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 900–912, 2000.

LEE, Y. B.; BYUN, E. J.; KIM, H. S. Potential role of the microbiome in acne: A comprehensive review. **Journal of clinical medicine**, [s. l.], v. 8, n. 7, 2019.

LEHTIMÄKI, J.; KARKMAN, A.; LAATIKAINEN, T.; PAALANEN, L.; VON HERTZEN, L.; HAAHTELA, T.; HANSKI, I.; RUOKOLAINEN, L. Patterns in the skin microbiota differ in children and teenagers between rural and urban environments. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 45651, 2017.

LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 89–121, 2022.

LU, L.; SHI, L.; ZENG, J.; WEN, Z. Aspirin as a potential modality for the chemoprevention of breast cancer: A dose-response meta-analysis of cohort studies from 857,831 participants. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 25, p. 40389–40401, 2017.

MAHMOOD, N. F.; SHIPMAN, A. R. The age-old problem of acne. **International Journal of Women's Dermatology**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 71–76, 2017.

MALLANDRICH, M.; FERNÁNDEZ-CAMPOS, F.; CLARES, B.; HALBAUT, L.; ALONSO, C.; CODERCH, L.; GARDUÑO-RAMÍREZ, M. L.; ANDRADE, B.; DEL POZO, A.; LANE, M. E.; CALPENA, A. C. Developing transdermal applications of ketorolac tromethamine entrapped in stimuli sensitive block copolymer hydrogels. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 1728–1740, 2017.

MARCHIONINI, A. Säuremantel der haut und bakterienabwehr - IV. Mitteilung. pathologische lücken des säuremantels. **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 17, p. 1831–1835, 1938.

MARCHIONINI, A.; HAUSKNECHT, W. Säuremantel der haut und bakterienabwehr. **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 17, n. 19, p. 663–666, 1938. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/BF01778645>. Acesso em: 1 ago. 2022.

MARCHIONINI, A.; SCHMIDT, R. Säuremantel der haut und bakterienabwehr - III. Mitteilung. Über die regionäre verschiedenheit des bakterienwachstums auf der hautoberfläche. **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 17, n. 22, 1938.

MARCHIONINI, A.; SCHMIDT, R. Säuremantel der haut und bakterienabwehr - V. Mitteilung der bakteriengehalt in pathologischen lücken des säuremantels. **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 18, n. 13, 1939.

MARCHIONINI, A.; SCHMIDT, R.; KIEFER, J. Säuremantel der haut und Bakterienabwehr - II. Mitteilung. Über die regionäre Verschiedenheit der

Bakterienabwehr und Desinfektionskraft der Hautoberfläche. **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 17, n. 21, 1938.

MARIEB, E.; WILHELM, P.; MALLATT, J. **Anatomia humana**. 7. ed. São Paulo: Pearson Education, 2014.

MARRAKCHI, S.; MAIBACH, H. I. Biophysical parameters of skin: map of human face, regional, and age-related differences. **Contact Dermatitis**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 28–34, 2007. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0536.2007.01138.x>. Acesso em: 30 jul. 2022.

MASSEY, F. J. The Kolmogorov-Smirnov test for goodness of fit. **Journal of the American Statistical Association**, [s. l.], v. 46, n. 253, p. 68, 1951.

MATOLTSY, A. G. Desmosomes, filaments, and keratohyaline granules: their role in the stabilization and keratinization of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 65, n. 1, 1975.

MAUCHLY, J. W. Significance test for sphericity of a normal n-variate distribution. **The Annals of Mathematical Statistics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 204–209, 1940.

MCKENZIE, A. W. Method for comparing percutaneous absorption of steroids. **Archives of Dermatology**, [s. l.], v. 86, n. 5, p. 608, 1962.

MCKNIGHT, G.; SHAH, J.; HARGEST, R. **Physiology of the skin**. Amsterdam: Elsevier Ltd, 2022.

MCLAUGHLIN, J.; WATTERSON, S.; LAYTON, A. M.; BJOURSON, A. J.; BARNARD, E.; MCDOWELL, A. Propionibacterium acnes and Acne Vulgaris: New Insights from the Integration of Population Genetic, Multi-Omic, Biochemical and Host-Microbe Studies. **Microorganisms**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 128, 2019.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C. dos; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 127–130, 2001.

MIAO, H.; DONG, R.; ZHANG, S.; YANG, L.; LIU, Y.; WANG, T. Inherited ichthyosis and fungal infection: an update on pathogenesis and treatment strategies. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 341–350, 2021.

MIAS, C.; MENGEAUD, V.; BESSOU-TOUYA, S.; DUPLAN, H. Recent advances in understanding inflammatory acne: Deciphering the relationship between *Cutibacterium acnes* and Th17 inflammatory pathway. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, [s. l.], v. 37, n. S2, p. 3–11, 2023.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 1036–1043, 2012.

MISTRETTA, N.; BROSSAUD, M.; TELLES, F.; SANCHEZ, V.; TALAGA, P.; ROKBI, B. Glycosylation of *Staphylococcus aureus* cell wall teichoic acid is influenced by environmental conditions. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 3212, 2019.

MOLINA, J.; MONTERO-MATEOS, E.; PRAENA-SEGOVIA, J.; LEÓN-JIMÉNEZ, E.; NATERA, C.; LÓPEZ-CORTÉS, L. E.; VALIENTE, L.; ROSSO-FERNÁNDEZ, C. M.; HERRERO, M.; ALLER-GARCÍA, A. I.; CANO, Á.; GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ, B.; MÁRQUEZ-GÓMEZ, I.; ÁLVAREZ-MARÍN, R.; INFANTE, C.; ROCA, C.; VALIENTE-MÉNDEZ, A.; PACHÓN, J.; REGUERA, J. M.; CORZO-DELGADO, J. E.; TORRE-CISNEROS, J.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; CISNEROS, J. M.; SOLANO, B.; GONZÁLEZ-GALÁN, V.; HINOJOSA, E.; LÓPEZ-BERNAL, F.; SUÑER, M.; NOVAL, J. Á.; GIRÁLDEZ, Á.; NAVARRO, A.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, M. J.; BORREGO, Y.; GIL, P.; LEPE, J. A.; MORALES, I.; RETAMAR, P.; DE CUETO, M.; CASTÓN, J. J.; VIDAL, E. Seven-versus 14-day course of antibiotics for the treatment of bloodstream infections by Enterobacterales: a randomized, controlled trial. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 550–557, 2022.

NAKATSUJI, T.; CHEN, T. H.; NARALA, S.; CHUN, K. A.; TWO, A. M.; YUN, T.; SHAFIQ, F.; KOTOL, P. F.; BOUSLIMANI, A.; MELNIK, A. V.; LATIF, H.; KIM, J.-N.; LOCKHART, A.; ARTIS, K.; DAVID, G.; TAYLOR, P.; STREIB, J.; DORRESTEIN, P. C.; GRIER, A.; GILL, S. R.; ZENGLER, K.; HATA, T. R.; LEUNG, D. Y. M.; GALLO, R. L. Antimicrobials from human skin commensal bacteria protect against *Staphylococcus aureus* and are deficient in atopic dermatitis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 378, 2017.

NURAL, Y.; OZDEMIR, S.; YALCIN, M. S.; DEMIR, B.; ATABEY, H.; ECE, A.; SEFEROGLU, Z. Synthesis, biological evaluation, molecular docking, and acid dissociation constant of new bis-1,2,3-triazole compounds. **ChemistrySelect**, [s. l.], v. 6, n. 28, p. 6994–7001, 2021. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/slct.202101148>. Acesso em: 3 abr. 2023.

OECD. Guidelines for the testing of chemicals. **Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD)**: France, n. 428, 13 Apr. 2004.

OH, J.; BYRD, A. L.; DEMING, C.; CONLAN, S.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Biogeography and individuality shape function in the human skin metagenome. **Nature**, [s. l.], v. 514, n. 7520, p. 59–64, 2014.

OH, J.; BYRD, A. L.; PARK, M.; KONG, H. H.; SEGRE, J. A. Temporal stability of the human skin microbiome. **Cell**, [s. l.], v. 165, n. 4, p. 854–866, 2016.

- OLEJNIK, A.; GOSCIANSKA, J.; NOWAK, I. Active compounds release from semisolid dosage forms. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 101, n. 11, p. 4032–4045, 2012.
- OSBORNE, D. W.; FRIBERG, S. E. Role of stratum corneum lipids as moisture retaining agent. **Journal of Dispersion Science and Technology**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 173–179, 1987.
- PAHARIK, A. E.; PARLET, C. P.; CHUNG, N.; TODD, D. A.; RODRIGUEZ, E. I.; VAN DYKE, M. J.; CECH, N. B.; HORSWILL, A. R. Coagulase-Negative Staphylococcal Strain Prevents Staphylococcus aureus Colonization and Skin Infection by Blocking Quorum Sensing. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 746-756.e5, 2017.
- PANG, D.; LIAO, S.; WANG, W.; MU, L.; LI, E.; SHEN, W.; LIU, F.; ZOU, Y. Destruction of the cell membrane and inhibition of cell phosphatidic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*: an explanation for the antibacterial mechanism of morusin. **Food & Function**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 6438–6446, 2019.
- PAPPAS, P. G.; LIONAKIS, M. S.; ARENDRUP, M. C.; OSTROSKY-ZEICHNER, L.; KULLBERG, B. J. Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 18026, 2018.
- PARK, J.; SCHWARDT, N. H.; JO, J.-H.; ZHANG, Z.; PILLAI, V.; PHANG, S.; BRADY, S. M.; PORTILLO, J. A.; MACGIBENY, M. A.; LIANG, H.; PENSLER, M.; SOLDIN, S. J.; YANOVSKI, J. A.; SEGRE, J. A.; KONG, H. H. Shifts in the skin bacterial and fungal communities of healthy children transitioning through puberty. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 142, n. 1, p. 212–219, 2022.
- PASCHOAL, F. M.; ISMAEL, A. P. P. B. The effect of light in the treatment of acne vulgaris. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 2, n. 2, p. 117–123, 2010. Disponível em: <http://www.surgicalcosmetic.org.br/details/67/en-US/the-effect-of-light-in-the-treatment-of-acne-vulgaris>. Acesso em: 4 abr. 2023.
- PELEG, H.; NOBLE, A. C. Perceptual properties of benzoic acid derivatives. **Chemical Senses**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 393–400, 1995.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, A.; GALANO, A.; ALVAREZ-IDABOY, J. R. Dihydroxybenzoic acids as free radical scavengers: mechanisms, kinetics, and trends in activity. **New Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 2639, 2014.
- PRAT, D.; HAYLER, J.; WELLS, A. A survey of solvent selection guides. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 4546–4551, 2014.
- PRAT, D.; WELLS, A.; HAYLER, J.; SNEDDON, H.; MCELROY, C. R.; ABOU-SHEHADA, S.; DUNN, P. J. Correction: CHEM21 selection guide of classical- and less classical-solvents. **Green Chemistry**, [s. l.], v. 17, n. 10, p. 4848–4848, 2015.

PRESCOTT, S. L.; LARCOMBE, D.-L.; LOGAN, A. C.; WEST, C.; BURKS, W.; CARABALLO, L.; LEVIN, M.; ETTEN, E. Van; HORWITZ, P.; KOZYRSKYJ, A.; CAMPBELL, D. E. The skin microbiome: impact of modern environments on skin ecology, barrier integrity, and systemic immune programming. **World Allergy Organization Journal**, [s. l.], v. 10, p. 29, 2017.

PUBCHEM. **PUBCHEM**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_5-Dihydroxybenzoic-acid. Acesso em: 8 mar. 2023.

PUJOL, M.; MIRÓ, J.-M.; SHAW, E.; AGUADO, J.-M.; SAN-JUAN, R.; PUIG-ASENSIO, M.; PIGRAU, C.; CALBO, E.; MONTEJO, M.; RODRIGUEZ-ÁLVAREZ, R.; GARCIA-PAIS, M.-J.; PINTADO, V.; ESCUDERO-SÁNCHEZ, R.; LOPEZ-CONTRERAS, J.; MORATA, L.; MONTERO, M.; ANDRÉS, M.; PASQUAU, J.; ARENAS, M.-M.; PADILLA, B.; MURILLAS, J.; JOVER-SÁENZ, A.; LÓPEZ-CORTES, L.-E.; GARCÍA-PARDO, G.; GASCH, O.; VIDELA, S.; HEREU, P.; TEBÉ, C.; PALLARÈS, N.; SANLLORENTE, M.; DOMÍNGUEZ, M.-Á.; CÀMARA, J.; FERRER, A.; PADULLÉS, A.; CUERVO, G.; CARRATALÀ, J.; SORIANO, A.; ALMELA, M.; GÓMEZ, F.; CHÁVEZ, F.; MIRELIS, B.; PADILLA, E.; DOLORES PÉREZ-RAMÍREZ, M.; ESPASA, M.; MARIA SÁNCHEZ-DÍAZ, A.; CERCENADO, E.; RUIZ DE GOPEGUI, E.; SIVERIO, A.; DE CUETO, M.; GARCÍA-GARROTE, F.; GARCIA, M.; XERCAVINS, M.; NIEVES LARROSA, M. Daptomycin Plus Fosfomycin Versus Daptomycin Alone for Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia and Endocarditis: A Randomized Clinical Trial. **Clinical Infectious Diseases**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 1517–1525, 2021.

QUAN, C.; CHEN, X.-Y.; LI, X.; XUE, F.; CHEN, L.-H.; LIU, N.; WANG, B.; WANG, L.-Q.; WANG, X.-P.; YANG, H.; ZHENG, J. Psoriatic lesions are characterized by higher bacterial load and imbalance between *Cutibacterium* and *Corynebacterium*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 82, n. 4, p. 955–961, 2020.

R CORE TEAM. **R: A Language and environment for statistical computing**. Versão 4.1. [S. l.: s. n.], 2021. Disponível em: <https://cran.r-project.org>. Acesso em: 4 jan. 2023.

RASIGADE, J.-P.; DUMITRESCU, O.; LINA, G. New epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections. **Clinical Microbiology and Infection**, [s. l.], v. 20, n. 7, p. 587–588, 2014.

RIBEIRO, B. de M.; ALMEIDA, L. M. C.; COSTA, A.; FRANCESCONI, F.; FOLLADOR, I.; NEVES, J. R.; FOLLADOR, I.; NEVES, J. R. Etiopathogeny of acne vulgaris: a practical review for day-to-day dermatologic practice. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 20–26, 2015a. Disponível em:

<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/scd1984-8773.2015731682>. Acesso em: 4 abr. 2023.

RIBEIRO, B. de M.; FOLLADOR, I.; COSTA, A.; FRANCESCONI, F.; NEVES, J. R.; ALMEIDA, L. M. C.; LUIZ, M.; ALMEIDA, cio C. Acne in adult women: a review for the daily clinical practice. **Surgical & Cosmetic Dermatology**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 10–19, 2015b. Disponível em: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/scd1984-8773.2015731680>. Acesso em: 4 abr. 2023.

RICHARDSON, M. Understanding the structure and function of the skin. **Nursing times**, [s. l.], v. 99, n. 31, p. 46–8, 2003.

RICOTTA, E. E.; LAI, Y. L.; BABIKER, A.; STRICH, J. R.; KADRI, S. S.; LIONAKIS, M. S.; PREVOTS, D. R.; ADJEMIAN, J. Invasive candidiasis species distribution and trends, United States, 2009–2017. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 223, n. 7, p. 1295–1302, 2021.

RIPPKE, F.; SCHREINER, V.; SCHWANITZ, H.-J. The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH. **American journal of clinical dermatology**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 261–72, 2002.

ROZAS, M.; HART DE RUIJTER, A.; FABREGA, M. J.; ZORGANI, A.; GUELL, M.; PAETZOLD, B.; BRILLET, F. From dysbiosis to healthy skin: Major contributions of *Cutibacterium acnes* to skin homeostasis. **Microorganisms**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 628, 2021.

SANCHES SILVEIRA, J. E. P.; MYAKI PEDROSO, D. M. UV light and skin aging. **Reviews on Environmental Health**, [s. l.], v. 29, n. 3, 2014.

SANFORD, J. A.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars in Immunology**, [s. l.], v. 25, n. 5, p. 370–377, 2013.

SANMIGUEL, A. J.; MEISEL, J. S.; HORWINSKI, J.; ZHENG, Q.; BRADLEY, C. W.; GRICE, E. A. Antiseptic Agents Elicit Short-Term, Personalized, and Body Site–Specific Shifts in Resident Skin Bacterial Communities. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 138, n. 10, p. 2234–2243, 2018.

SANTOS, S. N.; CASTANHA, R. F.; HABER, L. L.; MARQUES, M. O. M.; SCRAMIN, S.; MELO, I. S. de. Determinação quantitativa da atividade antioxidante de extratos brutos de microrganismos pelo método de captura de radical livre DPPH.

Comunicado Técnico Embrapa Meio Ambiente, [s. l.], v. 1, n. 50, p. 1–5, 2011. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/40220/1/comunicado-50.pdf>. Acesso em: 10 jul. 2022.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**, [s. l.], v. 42, n. 4, p. 321–324, 2007.

SARKER, U.; OBA, S. Phenolic profiles and antioxidant activities in selected drought-tolerant leafy vegetable amaranth. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 18287, 2020.

SBD. **Envelhecimento**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2023. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/doencas/envelhecimento/>. Acesso em: 8 mar. 2023.

SBD. **Estrutura da Pele**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2022. Disponível em: <https://www.sbd.org.br/cuidados/conheca-a-pele/>. Acesso em: 7 out. 2022.

SCHADE, H.; MARCHIONINI, A. Der Säuremantel der haut (Nach gaskettenmessungen). **Klinische Wochenschrift**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 12–14, 1928. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01711684>. Acesso em: 1 ago. 2022.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Reprint of “Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays”. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 18, p. 782–796, 2015.

SCHLOISSNIG, S.; ARUMUGAM, M.; SUNAGAWA, S.; MITREVA, M.; TAP, J.; ZHU, A.; WALLER, A.; MENDE, D. R.; KULTIMA, J. R.; MARTIN, J.; KOTA, K.; SUNYAEV, S. R.; WEINSTOCK, G. M.; BORK, P. Genomic variation landscape of the human gut microbiome. **Nature**, [s. l.], v. 493, n. 7430, p. 45–50, 2013.

SCHMID-WENDTNER, M.-H.; KORTING, H. C. The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. **Skin pharmacology and physiology**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 296–302, 2006.

SCHOLZ, C. F. P.; KILIAN, M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 11, p. 4422–4432, 2016.

SCOTTI, L.; VELASCO, M. V. R. **Envelhecimento Cutâneo à Luz da Cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003.

SEGGER, D.; ASSMUS, U.; BROCK, M.; ERASMY, J.; FINKEL, P.; FITZNER, A.; HEUSS, H.; KORTEMEIER, U.; MUNKE, S.; RHEINLÄNDER, T.; SCHMIDT-LEWERKÜHNE, H.; SCHNEIDER, W.; WESER, G. Multicenter study on

measurement of the natural pH of the skin surface. **International Journal of Cosmetic Science**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 75–75, 2008.

SEIDENARI, S.; GIUSTI, G. Objective assessment of the skin of children affected by atopic dermatitis: a study of pH, capacitance and TEWL in eczematous and clinically uninvolved skin. **Acta dermato-venereologica**, [s. l.], v. 75, n. 6, p. 429–33, 1995.

SHAH, V. P.; ELKINS, J.; LAM, S.-Y.; SKELLY, J. P. Determination of *in vitro* drug release from hydrocortisone creams. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 53, n. 1, p. 53–59, 1989.

SHAH, V. P.; SIMONA MIRON, D.; ŞTEFAN RĂDULESCU, F.; CARDOT, J.-M.; MAIBACH, H. I. *In vitro* release test (IVRT): Principles and applications. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 626, p. 122159, 2022.

SHAO, T.-Y.; HASLAM, D. B.; BENNETT, R. J.; WAY, S. S. Friendly fungi: symbiosis with commensal *Candida albicans*. **Trends in Immunology**, [s. l.], v. 43, n. 9, p. 706–717, 2022.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An analysis of variance test for normality (complete samples). **Biometrika**, [s. l.], v. 52, n. 3–4, p. 591–611, 1965.

SHARMA, Sonia; KHAN, N.; SULTANA, S. Modulatory effect of gentisic acid on the augmentation of biochemical events of tumor promotion stage by benzoyl peroxide and ultraviolet radiation in Swiss albino mice. **Toxicology Letters**, [s. l.], v. 153, n. 3, p. 293–302, 2004.

SHARMA, S.; KHAN, N.; SULTANA, S. Study on prevention of two-stage skin carcinogenesis by *Hibiscus rosa sinensis* extract and the role of its chemical constituent, gentisic acid, in the inhibition of tumour promotion response and oxidative stress in mice. **European Journal of Cancer Prevention**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 53–63, 2004.

SHRESTHA, D. C.; ACHARYA, S.; GURUNG, D. B. A Finite Element Approach to Evaluate Thermoregulation in the Human Body due to the Effects of Sweat Evaporation during Cooking, Cleaning, and Walking. **Mathematical Problems in Engineering**, [s. l.], v. 2021, p. 1–14, 2021.

SILVA, S. A. M. e; MICHNIAK-KOHN, B.; LEONARDI, G. R. An overview about oxidation in clinical practice of skin aging. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 367–374, 2017.

SILVEIRA, A. C. da; KASSUIA, Y. S.; DOMAHOVSKI, R. C.; LAZZAROTTO, M. Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível. **Comunicado técnico Embrapa Meio Ambiente**, [s. l.], v. 1, n. 421, 2018.

SITAREK, P.; SKAŁA, E.; TOMA, M.; WIELANEK, M.; SZEMRAJ, J.; SKORSKI, T.; BIAŁAS, A. J.; SAKOWICZ, T.; KOWALCZYK, T.; RADEK, M.; WYSOKIŃSKA, H.; ŚLIWIŃSKI, T. Transformed root extract of *Leonurus sibiricus* induces apoptosis through intrinsic and extrinsic pathways in various grades of human glioma cells. **Pathology & Oncology Research**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 679–687, 2017.

SIVAK-SEARS, N. R.; SCHWARTZBAUM, J. A.; MIIKE, R.; MOGHADASSI, M.; WRENSCH, M. Case-control study of use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and glioblastoma multiforme. **American Journal of Epidemiology**, [s. l.], v. 159, n. 12, p. 1131–1139, 2004.

SMACK, D. P.; KORGE, B. P.; JAMES, W. D. Keratin and keratinization. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 85–102, 1994.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0190962294700125>. Acesso em: 1 set. 2022.

SMIRNOV, N. V. Approximate distribution laws for random variables, constructed from empirical data. **Uspekhi Mat. Nauk**, [s. l.], v. 10, p. 179–2016, 1944.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3. ed. Hoboken, N.J.: Wiley, 2010. 2010.

STALLINGS, M. S.; SCHULMAN, S. G. Fluorescence of gentisic acid. **Analytica Chimica Acta**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 483–486, 1975.

STOUGHTON, R. B. Are generic formulations equivalent to trade name topical glucocorticoids?. **Archives of Dermatology**, [s. l.], v. 123, n. 10, p. 1312–1314, 1987.

SULAYYIM, H. J. Al; ISMAIL, R.; HAMID, A. Al; GHAFAR, N. A. Antibiotic resistance during COVID-19: A systematic review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 19, n. 19, p. 11931, 2022.

SUN, S.; KEE, H. J.; RYU, Y.; CHOI, S. Y.; KIM, G. R.; KIM, H.-S.; KEE, S.-J.; JEONG, M. H. Gentisic acid prevents the transition from pressure overload-induced cardiac hypertrophy to heart failure. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 3018, 2019.

SURBER, C.; HUMBERT, P.; ABELS, C.; MAIBACH, H. The acid mantle: A myth or an essential part of skin health? *Em*: BASEL, Peter Itin; ROSKILDE, Gregor B. E. Jemec (org.). **Series: Current Problems in Dermatology**. Basel, Switzerland: Karger, 2018. v. 54, p. 1–10.

SUTARIA, A. H.; MASOOD, S.; SCHLESSINGER, J. Acne vulgaris. *Em: Statpearls* [INTERNET]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459173/>. Acesso em: 2 mar. 2023.

TABAH, A.; BASSETTI, M.; KOLLEF, M. H.; ZAHAR, J.-R.; PAIVA, J.-A.; TIMSIT, J.-F.; ROBERTS, J. A.; SCHOUTEN, J.; GIAMARELLOU, H.; RELLO, J.; DE WAELE, J.; SHORR, A. F.; LEONE, M.; POULAKOU, G.; DEPUYDT, P.; GARNACHO-MONTERO, J. Antimicrobial de-escalation in critically ill patients: a position statement from a task force of the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) and European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Critically Ill Patients Study Group (ESGCIP). *Intensive Care Medicine*, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 245–265, 2020.

TABAH, A.; LAUPLAND, K. B. Update on Staphylococcus aureus bacteraemia. *Current Opinion in Critical Care*, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 495–504, 2022.

THAKKER, K. D.; CHERN, W. H. Development and validation of *In vitro* Release Tests for Semisolid Dosage Forms — Case study. *Dissolution Technologies*, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 10–15, 2003.

THAKKER, K.; KLEIN, R. Drug release: topical products. *Em: RILEY, Christopher M.; ROSANSKE, Thomas W.; REID, George (org.). Specification of drug substances and products*. 2. ed. Cambridge, MA: Elsevier, 2020. p. 505–534.

THE JAMOVI PROJECT. *Jamovi*. Versão 2.3.24. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.jamovi.org>. Acesso em: 2 abr. 2023.

TONG, S. Y. C.; DAVIS, J. S.; EICHENBERGER, E.; HOLLAND, T. L.; FOWLER, V. G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 603–661, 2015.

TONG, S. Y. C.; LYE, D. C.; YAHAV, D.; SUD, A.; ROBINSON, J. O.; NELSON, J.; ARCHULETA, S.; ROBERTS, M. A.; CASS, A.; PATERSON, D. L.; FOO, H.; PAUL, M.; GUY, S. D.; TRAMONTANA, A. R.; WALLS, G. B.; MCBRIDE, S.; BAK, N.; GHOSH, N.; ROGERS, B. A.; RALPH, A. P.; DAVIES, J.; FERGUSON, P. E.; DOTEL, R.; MCKEW, G. L.; GRAY, T. J.; HOLMES, N. E.; SMITH, S.; WARNER, M. S.; KALIMUDDIN, S.; YOUNG, B. E.; RUNNEGAR, N.; ANDRESEN, D. N.; ANAGNOSTOU, N. A.; JOHNSON, S. A.; CHATFIELD, M. D.; CHENG, A. C.; FOWLER, V. G.; HOWDEN, B. P.; MEAGHER, N.; PRICE, D. J.; VAN HAL, S. J.; O'SULLIVAN, M. V. N.; DAVIS, J. S. Effect of vancomycin or vaptomycin with vs without an Antistaphylococcal β -Lactam on mortality, bacteremia, relapse, or treatment failure in patients with MRSA bacteremia. *JAMA*, [s. l.], v. 323, n. 6, p. 527, 2020.

TSIN-JAO, J.; SOMMER, L.; OKÁČ, A. Chelate der o-dihydroxybenzoesäuren mit eisen(III). **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1171–1190, 1962.

UPADHYAY, Y.; SINGH, A. K.; MISHRA, S.; GURULE, S. J.; KHUROO, A. H.; TIWARI, N.; BEDI, S. Comparison of in vitro release rates of diclofenac topical formulations using an in-line cell automated diffusion system. **Dissolution Technologies**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 10–16, 2019.

USP. **1724 - semisolid drug products performance tests**. *Em*: UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION. Rockville, MD: The United States Pharmacopeial Convention, 2014. p. 1273–1284.

USP. Topical and transdermal drug products. **Pharmacopeial Forum**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 750–764, 2009.

UYANTO, S. S. Power comparisons of five most commonly used autocorrelation tests. **Pakistan Journal of Statistics and Operation Research**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 119–130, 2020.

VANDAL, J.; ABOU-ZAID, M. M.; FERRONI, G.; LEDUC, L. G. Antimicrobial activity of natural products from the flora of Northern Ontario, Canada. **Pharmaceutical Biology**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 800–806, 2015.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; MCNAB, I. **Basic physiology of the skin**. [S. l.: s. n.], 2010.

WANG, Y.; HOOPER, L. V. Immune control of the microbiota prevents obesity. **Science**, [s. l.], v. 365, n. 6451, p. 316–317, 2019.

WAUGH, A.; GRANT, A. **Ross & Wilson anatomy and physiology in health and illness**. 13. ed. Amsterdam: Elsevier, 2018.

WILKINSON, J. B.; MOOR, R. J. **Cosmetología de Harry**. 1. ed. Madrid: Díaz de Santos S. A., 1990.

WILLIAMS, M. R.; COSTA, S. K.; ZARAMELA, L. S.; KHALIL, S.; TODD, D. A.; WINTER, H. L.; SANFORD, J. A.; O'NEILL, A. M.; LIGGINS, M. C.; NAKATSUJI, T.; CECH, N. B.; CHEUNG, A. L.; ZENGLER, K.; HORSWILL, A. R.; GALLO, R. L. Quorum sensing between bacterial species on the skin protects against epidermal injury in atopic dermatitis. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 11, n. 490, 2019.

WILLIAMS, M. R.; GALLO, R. L. Evidence that human skin microbiome dysbiosis promotes atopic dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, [s. l.], v. 137, n. 12, p. 2460–2461, 2017.

WONG, R.; GEYER, S.; WENINGER, W.; GUIMBERTEAU, J.-C.; WONG, J. K. The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 92–98, 2016.

XIE, J.; SCHAICH, K. M. Re-evaluation of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 62, n. 19, p. 4251–4260, 2014.

YANG, Y.-S.; KORNELIUS, E.; CHIOU, J.-Y.; LAI, Y.-R.; LO, S.-C.; PENG, C.-H.; HUANG, C.-N. Low-dose aspirin reduces breast cancer risk in women with diabetes: A nationwide retrospective cohort study in Taiwan. **Journal of Women's Health**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 1278–1284, 2017.

YOUSEF, H.; ALHAJJ, M.; SHARMA, S. Anatomy, skin (integument), epidermis. *Em: Statpearls* [INTERNET]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>. Acesso em: 28 mar. 2023.

ZATZ, J. L.; SEGERS, J. D. Techniques for measuring *in vitro* release from semisolids. **Dissolution Technologies**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 3–17, 1998.

ZHANG, H. **Human thermal sensation and comfort in transient and non-uniform thermal environments**. PhD thesis - University of California, Berkeley 2003.

ZHANG, S.; DUAN, E. Fighting against skin aging. **Cell Transplantation**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 729–738, 2018.

ZHANG, X.; SMITH-WARNER, S. A.; COLLINS, L. C.; ROSNER, B.; WILLET, W. C.; HANKINSON, S. E. Use of aspirin, other nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and acetaminophen and postmenopausal breast cancer incidence. **Journal of Clinical Oncology**, [s. l.], v. 30, n. 28, p. 3468–3477, 2012.

ZHANG, N.; YUAN, R.; XIN, K. Z.; LU, Z.; MA, Y. Antimicrobial susceptibility, biotypes and phylotypes of clinical *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* strains isolated from acne patients: An observational study. **Dermatology and Therapy**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 735–746, 2019.

8 APÊNDICES

8.1 Regressão linear para calibração de calibração 1

Linear Regression 1

Model Summary - Intensidade 1 (UF)

Model	R	R ²	Adjusted R ²	RMSE
H ₀	0.0000	0.0000	0.0000	847.5076
H ₁	1.0000	1.0000	1.0000	5.3427

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
H ₁	Regression	4.3095×10 ⁺⁸	1	4.3095×10 ⁺⁸	150975.6261	2.1429×10 ⁻¹²
	Residual	142.7208	5	28.5442		
	Total	4.3096×10 ⁺⁸	6			

Note. The intercept model is omitted, as no meaningful information can be shown.

Coefficients

Model		Unstandardized	Standard Error	Standardized	t	p
H ₀	(Intercept)	938.1421	320.3278		2.9287	0.0263
H ₁	(Intercept)	3.9021	3.1399		1.2428	0.2691
	Concentração (mg/L)	11678.0003	30.0549	1.0000	388.5558	2.1429×10 ⁻¹²

8.2 Regressão linear para calibração de calibração 2

Linear Regression 2

Model Summary - Intensidade 2 (UF)

Model	R	R ²	Adjusted R ²	RMSE
H ₀	0.0000	0.0000	0.0000	845.0260
H ₁	1.0000	0.9999	0.9999	7.2012

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
H ₁	Regression	4.2842×10 ⁺⁶	1	4.2842×10 ⁺⁶	82613.4030	9.6743×10 ⁻¹²
	Residual	259.2893	5	51.8579		
	Total	4.2844×10 ⁺⁶	6			

Note. The intercept model is omitted, as no meaningful information can be shown.

Coefficients

Model		Unstandardized	Standard Error	Standardized	t	p
H ₀	(Intercept)	935.8437	319.3898		2.9301	0.0263
H ₁	(Intercept)	4.3519	4.2322		1.0283	0.3510
	Concentração (mg/L)	11643.6472	40.5101	1.0000	287.4255	9.6743×10 ⁻¹²

8.3 Regressão linear para calibração de calibração 3

Linear Regression 3

Model Summary - Intensidade 3 (UF)

Model	R	R ²	Adjusted R ²	RMSE
H ₀	0.0000	0.0000	0.0000	845.0396
H ₁	1.0000	0.9999	0.9999	8.0329

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
H ₁	Regression	4.2842×10 ⁺⁶	1	4.2842×10 ⁺⁶	66393.3919	1.6708×10 ⁻¹¹
	Residual	322.6397	5	64.5279		
	Total	4.2846×10 ⁺⁶	6			

Note. The intercept model is omitted, as no meaningful information can be shown.

Coefficients

Model		Unstandardized	Standard Error	Standardized	t	p
H ₀	(Intercept)	935.5716	319.3949		2.9292	0.0263
H ₁	(Intercept)	4.0717	4.7209		0.8625	0.4278
	Concentração (mg/L)	11643.7478	45.1888	1.0000	257.6692	1.6708×10 ⁻¹¹

8.4 Regressão linear para calibração de calibração média

Model Summary - Fluorescência Média (UF)

Model	R	R ²	Adjusted R ²	RMSE	Durbin-Watson		
					Autocorrelation	Statistic	p
H ₀	0.0000	0.0000	0.0000	845.8522	0.5643	0.2584	0.0001
H ₁	1.0000	1.0000	0.9999	6.0876	0.3242	1.0697	0.0318

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
H ₁	Regression	4.2926×10 ⁺⁶	1	4.2926×10 ⁺⁶	115831.3292	4.1562×10 ⁻¹²
	Residual	185.2957	5	37.0591		
	Total	4.2928×10 ⁺⁶	6			

Note. The intercept model is omitted, as no meaningful information can be shown.

Coefficients

Model		Unstandardized	Standard Error	Standardized	t	p	95% CI	
							Lower	Upper
H ₀	(Intercept)	936.5192	319.7021		2.9293	0.0263	154.2364	1718.8020
H ₁	(Intercept)	4.1086	3.5777		1.1484	0.3028	-5.0881	13.3053
	Concentração (mg/L)	11655.1318	34.2456	1.0000	340.3400	4.1562×10 ⁻¹²	11567.1008	11743.1628

Residuals Statistics

	Minimum	Maximum	Mean	SD	N
Predicted Value	120.6599	2335.1350	936.5192	845.8339	7
Residual	-9.9531	5.9860	-4.7575×10 ⁻¹⁶	5.5572	7
Std. Predicted Value	-0.9646	1.6535	-4.7612×10 ⁻¹⁷	1.0000	7
Std. Residual	-1.7792	1.5519	0.0831	1.1051	7

8.5 Resíduos da curva de calibração ácido gentísico por fluorescência

Tabela 8.5-1 Dados da curva de calibração da concentração de ácido gentísico em função da intensidade de fluorescência, resíduo e resíduo padronizado.

Conc. (mg/L)	Intensidade de fluorescência (UF)				Previsão pela regressão linear (UF)				Resíduo (UF)				Resíduo padronizado			
	1	2	3	Média	1	2	3	Média	1	2	3	Média	1	2	3	Média
0,01	124,4	124,1	125,6	124,7	120,7	120,8	120,5	120,7	3,71	3,30	5,13	4,05	0,76	0,50	0,70	0,73
0,02	240,6	241,3	241,3	241,1	237,5	237,2	236,9	237,2	3,09	4,05	4,40	3,85	0,63	0,62	0,60	0,69
0,03	354,5	354,6	355,7	354,9	354,2	353,7	353,4	353,8	0,27	0,92	2,31	1,17	0,06	0,14	0,31	0,21
0,05	583,5	585,5	579,3	582,8	587,8	586,5	586,3	586,9	-4,31	-1,05	-6,95	-4,10	-0,88	-0,16	-0,95	-0,74
0,10	1162,9	1154,8	1161,3	1159,7	1171,7	1168,7	1168,4	1169,6	-8,84	-13,91	-7,10	-9,95	-1,81	-2,12	-0,97	-1,79
0,15	1760,1	1751,6	1742,5	1751,4	1755,6	1750,9	1750,6	1752,4	4,46	0,68	-8,12	-0,99	0,91	0,10	-1,11	-0,18
0,20	2341,1	2339,1	2343,2	2341,1	2339,5	2333,1	2332,8	2335,1	1,62	6,00	10,34	5,99	0,33	0,91	1,41	1,08
								Média	0,000	0,000	0,000	0,000				
								Desv. A	4,877	6,574	7,333	5,557				

Onde: 1, 2 e 3 referem-se a cada curva de calibração. Previsão é o valor gerado pelo respectivo modelo de regressão linear para cada concentração. Resíduo é a diferença entre a intensidade medida menos o previsto pelo modelo linear. Resíduo padronizado é o resíduo menos a média dos resíduos da respectiva curva dividido pelo desvio padrão amostral.