

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/06/2021.

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas



**Estudo de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico  
incorporado a um sistema emulsionado**

Alessandra Aparecida Cruz Custodio

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Correa

**Araraquara- SP**

**2019**

**unesp**  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

**Estudo de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico  
incorporado a um sistema emulsionado**

Alessandra Aparecida Cruz Custodio

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Correa

**Araraquara- SP**

**2019**

---

**C987e**

Custodio, Alessandra Aparecida Cruz.

Estudo de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico incorporado a um sistema emulsionado / Alessandra Aparecida Cruz Custodio. – Araraquara, 2019.  
105 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antônio Correa.

1. Ácido gálico. 2. Emulsão. 3. Permeação Cutânea. 4. Antioxidante. 5. Antimicrobiano.  
I. Correa, Marcos Antônio, 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 de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico incorporado a um sistema emulsionado

**AUTORA: ALESSANDRA APARECIDA CRUZ CUSTÓDIO**

**ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA**

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



Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA

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



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI

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



Profa. Dra. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO

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

Araraquara, 25 de junho de 2019

## ***Dedicatória***

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, por me guiar, zelar por mim e me indicar os melhores caminhos a seguir.

Dedico em especial aos meus pais e à minha irmã. À minha mãe que sempre foi um exemplo de fortaleza, de amor e dedicação, nunca mediu esforços para realizar e apoiar os meus maiores sonhos; meu pai que mesmo distante se faz presente, apoiando-nos e nos amando incondicionalmente; e minha doce e singela irmã que me traz uma paz imensurável com suas palavras, nos momentos de angústia e desafios.

Dedico à minha madrinha e avó querida Maria das Dores Moreira, que mesmo distante sempre demonstrou muito carinho e orgulho das minhas decisões e conquistas.

Dedico em memória do meu avó e padrinho Pedro Cordeiro da Cruz, que na sua simplicidade sempre soube enxergar o melhor nas pessoas e fazer diferença com suas atitudes generosas.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”*

*Cora Coralina*

## ***Agradecimentos***

Ao meu orientador Prof.<sup>a</sup> Dr. ***Marcos Antônio Correa***, por toda paciência, compreensão e apoio. Obrigada pelo conhecimento compartilhado, ensinamentos e amizade.

À minha querida amiga e na verdade uma grande coorientadora do meu trabalho, Dra. ***Caroline Magnani Spagnol***, pelo incentivo, paciência e colaboração. Obrigada pelo apoio incondicional e pelo empenho diário em ajudar a todos que te rodeiam.

À toda minha família, em especial minha mãe ***Maria Lucia da Cruz Custodio***, meu pai ***Jose Custodio*** e minha irmã ***Angélica Cristina Cruz Custodio***, sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus colegas de laboratório, ***Bia, Dani, Gabi, Bruna e Wagner***, por todos os trabalhos em equipe, pela paciência em executá-los e por toda ajuda.

À técnica do Laboratório de Cosmetologia ***Ilza***, por toda ajuda, carinho e apoio.

À todos os professores envolvidos no decorrer do desenvolvimento do meu trabalho, Prof.<sup>a</sup> Dra. ***Vera Lucia Borges Isaac***, Prof.<sup>a</sup> Dra. ***Hérida Regina Nunes Salgado***, Prof. Dr. ***Andrei Moroz*** e Prof.<sup>a</sup> Dra. ***Maria Virgínia Scarpa***.

Aos pós-graduandos de outros laboratórios que estavam sempre dispostos a ajudar, ***Ligia, Marina e Francine***.

À secretaria de pós-graduação, em especial a Cláudia e Aniele.

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

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

A CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro concedido.

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

## RESUMO

A busca por ativos naturais que apresentem mais de uma função em uma única formulação é pautada em um novo conceito de praticidade e economia, estando em acordo com a visão crítica do consumidor moderno. Neste contexto, a presença dos compostos fenólicos em plantas tem sido estudada por estes apresentarem diversas atividades farmacológicas e cosméticas. Os ácidos hidroxibenzoicos fazem parte desse grupo de compostos orgânicos, sendo o ácido gálico um de seus representantes, conhecido principalmente por sua atividade antioxidante. Um grande número de formulações tópicas contendo antioxidantes tem sido lançado nos últimos anos. O objetivo deste trabalho foi estudar a eficácia do ácido gálico para uso cosmético. Para escolha dos solventes utilizados no estudo levou-se em consideração o desenvolvimento sustentável da pesquisa, ou seja a utilização de solventes verdes. Para a avaliação da atividade antioxidante foram utilizados dois métodos diferentes o DPPH e o ABTS. Também foi realizada a avaliação das atividades despigmentantes, antimicrobiana, citotóxica, bem como estudos da formulação desenvolvida, como: estabilidade, liberação, permeação e retenção, através de experimentos *in vitro*. Os resultados demonstram que o ácido gálico é um potente antioxidante, suas ações despigmentante e antimicrobiana também foram comprovadas. Pelos estudos de citotoxicidade *in vitro* pode-se constatar que a porcentagem de ácido gálico utilizada na emulsão desenvolvida é segura. A validação da metodologia por CLAE garantiu todos os parâmetros necessários para a quantificação segura do ácido gálico na emulsão, sendo eles, a seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção e quantificação, exatidão e robustez. Através dos ensaios de liberação, permeação e retenção cutânea, foi possível constatar que ocorreu a liberação de 50% do ácido gálico presente na formulação em 4h e a maior quantidade permeada do ácido gálico se encontrou retida na epiderme e derme, local em que se pretende que atue. A emulsão manteve-se estável ao longo dos 90 dias de análise, suportando diferentes condições de estresse, garantindo a qualidade e suas características iniciais. Conclui-se, portanto que o ácido gálico pode ser utilizado como um ativo multifuncional, por ter todas as atividades propostas comprovadas.

**Palavras-chave:** Ácido gálico. Emulsão. Permeação Cutânea. Antioxidante. Antimicrobiano.

## ABSTRACT

The search for natural assets that present more than one function in a single formulation is based on a new concept of practicality and economy, being in agreement with the critical view of the modern consumer. In this context, the presence of phenolic compounds in plants has been studied because they present several pharmacological and cosmetic activities. Hydroxybenzoic acids are part of this group of organic compounds, and gallic acid is one of its representatives, known mainly for its antioxidant activity. A large number of topical formulations containing antioxidants have been launched in recent years. The objective of this work was to study the efficacy of gallic acid for cosmetic use. To choose the solvents used in the study took into consideration the sustainable development of the research, ie the use of green solvents. For the evaluation of the antioxidant activity, two different methods were used: DPPH and ABTS. The evaluation of depigmenting activities, antimicrobial, cytotoxic, as well as studies of the developed formulation, such as: stability, release, permeation and retention, were carried out through in vitro experiments. The results demonstrate that gallic acid is a potent antioxidant, its depigmenting and antimicrobial actions have also been proven. By in vitro cytotoxicity studies it can be verified that the percentage of gallic acid used in the developed emulsion is safe. The validation of the methodology by HPLC ensured all parameters necessary for the safe quantification of gallic acid in the emulsion, being: selectivity, linearity, precision, limit of detection and quantification, accuracy and robustness. Through the release, permeation and skin retention tests, it was possible to verify that 50% of the gallic acid present in the formulation was released in 4h and the greater permeate of gallic acid was found in the epidermis and dermis, where it is intended that acts. The emulsion remained stable throughout the 90 days of analysis, supporting different stress conditions, guaranteeing the quality and its initial characteristics. It is concluded, therefore, that gallic acid can be used as a multifunctional active, because all proposed activities are proven.

**Keywords:** Gallic acid. Emulsion. Cutaneous Permeation. Antioxidant. Antimicrobial.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos.....	17
<b>Figura 2</b> - Estrutura do Ácido Gálico .....	20

## **LISTA DE QUADROS**

<b>Quadro 1</b> – Alterações cutâneas causadas pelo envelhecimento intrínseco e extrínseco. .....	16
<b>Quadro 2</b> - Parâmetros a serem considerados na validação analítica.....	23

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AA: ácido ascórbico

Abs: Absorbância

ABTS: Radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid

AG: ácido gálico

ANOVA: *Analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de variação

DMEM: meio de cultura (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DPR: Desvio padrão relativo

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HDFa: Fibroblastos

IC<sub>50</sub>: Concentração inibitória 50%

INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

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

PBS: Tampão fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

pH: potencial hidrogeniônico

r: Coeficiente de correlação linear

r<sup>2</sup>: Coeficiente de determinação

RL – Radicais Livres

UV- ultravioleta

v/v: Volume por volume

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1	Envelhecimento .....	15
2.2	Ácido Gálico.....	17
2.3	Atividade Antioxidante.....	18
2.4	Atividade Despigmante .....	20
2.5	Atividade Antimicrobiana .....	21
2.6	Citotoxicidade.....	21
2.7	Testes de segurança e eficácia .....	22
2.8	Métodos Analíticos.....	22
2.9	Sistemas de veiculação de ativos para a pele .....	24
2.10	Permeação e retenção cutânea .....	25
3	CONCLUSÃO .....	26
	REFERÊNCIAS .....	27

## 1 INTRODUÇÃO

O segmento da Indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos se mantém em constante expansão, e o Brasil ocupa a 4<sup>o</sup> posição na lista dos 10 maiores consumidores Mundiais de Cosméticos. Os cuidados preventivos e tratamentos que objetivam retardar o envelhecimento da pele tornaram-se uma realidade e apresentam indicativos comerciais que revigoram suas perspectivas de expansão para os próximos anos (ABIHPEC; SEBRAE, 2019).

A alta demanda por produtos ou preparações que ofereçam mais de um benefício tornou-se uma realidade ao mercado cosmético global. Do ponto de vista tecnológico muitos materiais têm sido introduzidos com objetivo de facilitar as técnicas de produção e também tem permitido desenvolver produtos adequados a atender estas multifunções (SATHLER, 2018).

Se tratando de preparações antienvelhecimento, destaca-se a possibilidade de conseguir-se a multifuncionalidade não apenas pela associação de ativos, mas fundamentalmente pela possibilidade de um único ativo apresentar mais de uma atividade, de tal forma, que possa conduzir suas propriedades a uma preparação multifuncional. Tal perspectiva evita muitos problemas técnicos impostos com a associação de diferentes ativos com funções específicas para desenvolver-se uma preparação multifuncional. Além disso, observa-se uma crescente demanda por cosméticos seguros, baseada na presença de ativos eficazes para a pele, impulsionados por empresas do setor capazes de investir no desenvolvimento de produtos e técnicas de produção com conceitos inovadores e que objetivam atender a estas específicas necessidades ou demandas de mercado.

O ácido gálico foi escolhido por se tratar de um poderoso antioxidante, podendo ser utilizado em preparações antienvelhecimento, além disso, é um composto naturalmente presente em plantas e frutas, dessa forma sua extração e seu consumo se torna acessível. A proposta de estudar diferentes atividades em um único composto gera um conceito inovador, prático e de excelente custo benefício.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Envelhecimento

O organismo, em sua totalidade, possui um envoltório que têm a função de protegê-lo, delimitando sua forma e mantendo o controle da entrada e saída de várias substâncias. Esse envoltório é a pele, maior órgão do corpo humano, o qual serve para proteger contra agressões físicas, químicas e biológicas. A pele também é responsável pela proteção à radiação UV proveniente dos raios solares, formação de vitamina D, termorregulação, regulação da perda de água, secreção de ferormônios, percepção, sensibilidade e defesa imunológica (MAIO, 2012).

O processo de envelhecimento da pele envolve diversos fatores e é dividido em envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco é determinado geneticamente e caracterizado pela degeneração celular a qual ocorre progressivamente desde o nascimento, como resultado da ação de fatores genéticos e hormonais (BATISTEL et al., 2007; CUNHA et al., 2015).

No envelhecimento intrínseco o tecido perde a elasticidade, a capacidade de regular a perda de água, a hidratação e a reparação do tecido se torna menos eficiente. Oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de radicais livres (RL) aceleram o processo de envelhecimento (HIRATA et al., 2004).

Já no envelhecimento extrínseco os resultados são as alterações induzidas principalmente pela exposição crônica à radiação ultravioleta (UV), tendo em vista que outros fatores como tabagismo, poluição e má nutrição também tem influência. Este é mais agressivo à superfície da pele, sendo o responsável pelas rugas, manchas e o próprio câncer de pele (BATISTEL et al., 2007).

O Quadro 1 apresenta as principais alterações cutâneas que caracterizam o envelhecimento intrínseco e extrínseco.

**Quadro 1** – Alterações cutâneas causadas pelo envelhecimento intrínseco e extrínseco.

	<b>Envelhecimento intrínseco (Cronológico)</b>	<b>Envelhecimento extrínseco (Fotoenvelhecimento)</b>
<b>Rugas</b>	Finas	Profundas
<b>Camada Córnea</b>	Inalterada	Afinada
<b>Células Displásicas</b>	Poucas	Muitas
<b>Fibras de Colágeno</b>	Pequena alteração no tamanho e organização	Grande alteração no tamanho e organização
<b>Fibras Elásticas</b>	Reorganizadas	Diminuição da produção e aumento da degeneração
<b>Folículos pilosos</b>	Diminui número e afinamento dos fios	Diminui número e estrutura: perda capilar
<b>Melanócitos</b>	Normal	Diminui número e melanina
<b>Glândulas sebáceas e sudoríparas</b>	Diminui número: pele seca	Diminui número: pele seca
<b>Junção dermoepidérmica</b>	Leve achatamento	Importante achatamento
<b>Microvasculatura</b>	Área reduzida	Telangiectasias, equimoses, infiltrado inflamatório perivascular.

Fonte: FONTES, 2013.

Com o processo de envelhecimento, tanto intrínseco quanto extrínseco, inevitavelmente, ocorre uma diminuição na síntese de colágeno. A derme vai perdendo com o tempo seu suporte estrutural, de modo que a pele torna-se menos elástica, mais fina e menos hábil para resistir a alterações mecânicas (COUTO, 2007).

Dessa forma, a busca por cosméticos que desacelerem o processo de envelhecimento cresce a cada dia, e esse mercado destinado a produtos de beleza tem

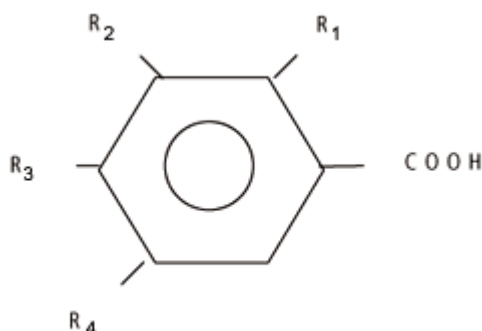
como objetivo facilitar a vida das pessoas, introduzindo cosméticos com propriedades multifuncionais, cujo apelo principal é a facilidade no transporte, praticidade na aplicação e um melhor custo benefício.

## 2.2 Ácido Gálico

Os compostos fenólicos são muito estudados por apresentarem diversas atividades farmacológicas, entre elas: a inibição da oxidação lipídica e da proliferação de fungos. Também, são muito estudados pela indústria alimentícia por participarem de processos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (SOARES, 2002).

O ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) é um representante dos derivados do ácido hidroxibenzoico, possui um anel benzênico, um grupamento carboxílico e três hidroxilas na molécula (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos.



Fonte: SOARES, 2002.

Com base na figura 1, os radicais existentes nesta estrutura básica em seus derivados representantes são: Ácido gálico:  $R_2=R_3=R_4=OH$ ; Ácido salicílico:  $R_1=OH$ ; Ácido Gentísico:  $R_1=R_4=OH$ ; Ácido p-hidroxibenzoico:  $R_3=OH$ ; Ácido Protocatequínico:  $R_2=R_3=OH$ ; Ácido Vanílico:  $R_2=OCH_3$  e  $R_3=OH$ ; Ácido Siríngico:  $R_2=R_4=OCH_3$  e  $R_3=OH$  (SOARES, 2002).

Caracteriza-se como um sólido branco cristalino, cuja fórmula molecular é  $C_7H_6O_5$  e sua massa molar é de 170.11954 g/mol, possui densidade de 1,69 kg/L (20 °C), seu pKa é de 4,40 e o Log P de 0,70 (20 °C). O ponto de fusão é de 210 °C com decomposição entre 235 a 240 °C, produzindo dióxido de carbono e monóxido de

carbono. É solúvel em álcool etílico, água, glicerina e praticamente insolúvel em clorofórmio, benzeno e éter de petróleo (PUBCHEM, 2018).

Encontra-se em plantas lignificadas e folhas de chá, em uvas, lúpulo, casca de carvalho, hamamélis e outras plantas, podendo ser encontrado livre ou como parte de taninos (GOMES, 2015; PUBCHEM, 2018).

O ácido gálico é considerado um poderoso antioxidante natural capaz de sequestrar as espécies de oxigênio reativas, tais como os ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. Além da atividade antioxidante, vários estudos têm relatado propriedades anticâncer, anti-angiogênica, antimicrobiana, antiulcerogênica, anti-inflamatória, antifúngica e outras (FERNANDES; SALGADO, 2015).

Muito utilizado em pesquisa, como padrão para a quantificação de compostos fenólicos, principalmente na determinação da atividade antioxidante desses compostos, utilizando reagentes como o de Folin Ciocalteu, ou os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) e o 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS<sup>+</sup>) (GOMES, 2015).

Na indústria farmacêutica utiliza-se para a produção de trimetoprim e na fabricação de tintas, podendo ser utilizado para sintetizar o propil galato (3,4,5-tri-hidroxibenzoato de propil), um antioxidante geralmente utilizado em alimentos gordurosos (ROCHA *et al.*, 2015).

### **2.3 Atividade Antioxidante**

Os antioxidantes são compostos capazes de estabilizar os radicais livres antes mesmo que ataquem os alvos biológicos nas células. Sua produção é controlada nos seres vivos por diversos compostos, seja por origem endógena ou exógena, sendo que a falta desses compostos pode gerar lesões oxidativas de caráter cumulativo (SOUSA *et al.*, 2007).

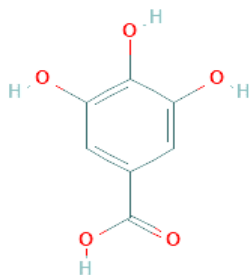
Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, que mesmo em baixas concentrações podem prevenir o dano oxidativo de membranas celulares e de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos, lipídeos, açúcares poli-insaturados), provocado por reações mediadas por radicais livres produzidos pelo metabolismo natural das células ou em resposta a fatores externos (GOMES, 2015).

Os antioxidantes fenólicos atuam na etapa de iniciação e na propagação do processo oxidativo, funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metal. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias (SOARES, 2002).

Dentre os compostos fenólicos, o ácido gálico tem sido descrito como um forte antioxidante. Segundo Kim (2007), ele é considerado naturalmente um composto antioxidante e devido a essa ação pode atuar na cadeia de produção da melanina, na etapa da oxidação de L-Dopa em Dopaquinona, inibindo essa transformação e a formação dos pigmentos responsáveis pela hiperpigmentação da pele.

Lu e colaboradores (2005) analisaram a relação estrutura e atividade da capacidade antioxidante dos derivados do ácido gálico incorporados em lipossomas e avaliaram seus efeitos sobre os radicais livres e atividades anti-apoptóticas em células SH-SY5Y humanas que são utilizadas em modelos *in vitro* de função e diferenciação neuronal. Constataram que o ácido gálico poderia atravessar a membrana lipossômica para reagir com o radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) atuando como um potente antioxidante e que compostos com alta atividade antioxidante e hidrofobicidade adequada são eficazes como neuroprotetores por atuarem na prevenção da lesão do estresse oxidativo.

A atividade antioxidante do ácido gálico se dá devido a sua estrutura, onde uma das hidroxilas se encontra em posição *para* (posição 4), por esse motivo é mais ativo do que aqueles substituídos em *orto* ou *meta* (posições 1 e 2, respectivamente). Possui também três hidroxilas no anel benzênico o que confere uma maior atividade antioxidante em comparação aos compostos que possuem somente uma hidroxila, como apresentado na Figura 2 (PANNALA *et al.* 2001; CHENG *et al.*, 2002, 2003).

**Figura 2** - Estrutura do Ácido Gálico

Fonte: PUBCHEM, 2018.

## 2.4 Atividade Despigmmentante

O envelhecimento cronológico gera várias mudanças corporais, uma delas é o aparecimento de manchas que surgem ao longo do tempo por diversos fatores, tais como, o envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais e exposição ao sol em diferentes graus (NICOLETTI *et al.*, 2002).

A tirosinase é a enzima-chave na biossíntese da melanina, pigmento endógeno preto-acastanhado, formado quando esta enzima catalisa a oxidação da tirosina em 3,4 diidroxifenilalanina (L-DOPA), reação esta que ocorre nos melanócitos de mamíferos. A função da melanina é proteger a pele dos danos causados pela absorção dos raios Ultravioleta. Se há excesso na produção de melanina, surgem as desordens de hiperpigmentação, tais como as sardas, o melasma ou patologias mais graves, como o melanoma maligno (OYAMA *et al.*, 2016).

A tirosinase catalisa duas reações diferentes: a hidroxilação da tirosina e a oxidação do produto L-DOPA em dopaquinona. A dopaquinona será transformada nos pigmentos de melanina, conhecidos como feumelanina e eumelanina, responsáveis pela pigmentação da pele (MIOT *et al.*, 2009).

Kim (2007) comprovou a atividade antimelanogênica do ácido gálico, em um estudo comparativo feito com o ácido kójico, onde o ácido gálico apresentou uma maior atividade de inibição da enzima tirosinase. No estudo ele afirma que a atividade antimelanogênica do ácido gálico pode ser atribuída a sua estrutura fenólica e

principalmente a sua atividade antioxidante, onde irá atuar diretamente na etapa da oxidação da L-DOPA prejudicando a formação de dopaquinona.

## **2.5 Atividade Antimicrobiana**

A pesquisa por novos antimicrobianos pode contribuir significativamente no desenvolvimento de novos produtos que sejam mais eficazes e menos tóxicos (OSTROSKY *et al.*, 2008).

A ação de antimicrobianos pode ser exercida por três diferentes formas: podendo ocorrer a destruição ou inativação funcional do material genético; a inativação de sistemas enzimáticos ou enzimas essenciais; e a reação com a membrana celular, gerando aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares (BRANEN; DAVIDSON, 1997).

A atividade antimicrobiana pode ser avaliada por diferentes métodos laboratoriais que variam desde os mais modernos e automatizados, até os mais simples como o de diluição em caldo e o de difusão em ágar. Atualmente, as técnicas utilizadas para determinar a quantidade mínima necessária de antimicrobiano para inibir microrganismos, conhecida como concentração inibitória mínima, são as diluições consecutivas em caldo ou em ágar. O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, ou do poço (CHAND, 1994; MURRAY, 1999).

## **2.6 Citotoxicidade**

Com os novos regulamentos cada vez mais rigorosos em relação ao uso de animais nos experimentos em laboratório, aumenta-se a necessidade do desenvolvimento e padronização de testes *in vitro* que possam determinar a toxicidade do composto a ser estudado, sem prejudicar a saúde dos seres humanos.

Os testes de citotoxicidade consistem em colocar o ativo de interesse em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (ROGERO *et al.*, 2003).

Um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais tais como o MTT (3-

(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), que é um dos mais empregados como indicador colorimétrico da viabilidade celular, avaliando-se a função mitocondrial da célula (ROGERO *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Através desse método é possível diferenciar as células vivas, danificadas ou mortas, pela alteração visual da coloração e pela medida de intensidade de cor da cultura celular. Portanto, para ser aprovado no teste de citotoxicidade *in vitro*, o produto não deve provocar a morte das células, nem afetar suas funções celulares (ROGERO *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2008).

Kim (2007) avaliou a citotoxicidade do ácido gálico, para isso foram utilizadas células B16 de melanoma, constatando que a concentração de ácido gálico necessária para ter ação despigmentante, não é uma concentração citotóxica para a célula em questão, por esse motivo sua utilização é considerada segura.

## **2.7 Testes de segurança e eficácia**

No estado de São Paulo foi implementado a Lei Estadual n. 15.314 que dispõe da proibição da utilização de animais para desenvolvimento, experimento e teste de produtos cosméticos e de higiene pessoal, perfumes e seus componentes, conforme estabelecido em seu artigo 1º, portanto fica proibido a utilização de animais em experimentos.

Existem vários métodos utilizados *in vitro* que podem substituir o uso de animais, como por exemplo, para a avaliação da citotoxicidade um exemplo de ensaio utilizado é o do MTT ou 3-(4,5 dimethyl thiazole-20yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, onde avalia-se a porcentagem de células mortas através de um corante vital; e para a avaliação da liberação, permeação e retenção cutâneas de um ativo a partir de uma emulsão, utiliza-se células de difusão, conhecidas como células de Franz (BRASIL, 2012).

## **2.8 Métodos Analíticos**

O desenvolvimento de metodologias é fundamental para quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados para seu controle de qualidade tanto em farmácias magistrais como no âmbito da indústria farmacêutica e cosmética. Para

garantir a confiabilidade dos resultados é necessário a adoção de procedimentos de validação para a aplicação das técnicas de quantificação (SPAGNOL, 2015).

Segundo a RDC N° 166, de 24 de julho de 2017, para uma metodologia ser considerada validada e reconhecida pela ANVISA, deve-se avaliar os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

Os parâmetros a serem considerados na validação analítica se encontram no Quadro 2, segundo preconizado pela RDC 166 de 24 de julho de 2017.

**Quadro 2** - Parâmetros a serem considerados na validação analítica

Parâmetro Avaliado	Identificação	Testes de Impurezas		Doseamento -dissolução (quantificação) -uniformidade de conteúdo -potência
		Quantitativo	Ensaio Limite	
<b>Exatidão</b>	não	sim	não	Sim
<b>Precisão Repetibilidade</b>	não	sim	não	Sim
<b>Precisão Intermediária</b>	não	sim (1)	não	sim (1)
<b>Seletividade (2)</b>	sim	sim	sim	sim
<b>Limite de Detecção</b>	não	não (3)	sim	não
<b>Limite de quantificação</b>	não	sim	não	não (3)
<b>Linearidade</b>	não	sim	não	sim
<b>Intervalo</b>	não	sim	não	sim

Fonte: RDC N° 166, de 24 de julho de 2017.

(1) Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária. (2) Nos casos de ensaios de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou

mais procedimentos analíticos para atingir o nível necessário de discriminação. (3) Pode ser necessário em alguns casos (BRASIL, 2017).

## 2.9 Sistemas de veiculação de ativos para a pele

A emulsão é uma das preparações mais utilizadas no mercado de produtos cosméticos, além da praticidade do transporte, possuem um sensorial agradável, quesito fundamental para a aceitação do consumidor (MASSON, 2005). Possibilita a incorporação de ativos hidrofílicos e lipofílicos, bem como características sensoriais adaptados às necessidades da via de administração para as quais se destinam (VIANNA, 2008).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 07, de 10 de fevereiro de 2015, define que os produtos Cosméticos classificados como Grau 1, são produtos que possuem propriedades básicas ou elementares, já os cosméticos de Grau 2, exigem comprovação de segurança e/ou eficácia para serem comercializados.

Para ser considerado eficaz, o ativo aplicado por via tópica, como por exemplo, em um sistema emulsionado, deve comprovar sua atividade farmacológica, ter uma boa disponibilidade no local de ação, além de baixa toxicidade sistêmica, por isso, os componentes da formulação devem ficar retidos na pele, não alcançando a corrente sanguínea (LEONARDI, 2004).

Algumas substâncias, como filtros UV e antissépticos devem permanecer na superfície da pele para executar suas funções. Outros ativos como antioxidantes, agentes antienvhecimento, devem estar presentes na epiderme ou derme (MORGANTI *et al.*, 2001).

Existem vários trabalhos na literatura relacionados à incorporação do ácido gálico em sistemas emulsionados, com o objetivo de avaliar sua atividade antioxidante, inibindo ou retardando a deterioração oxidativa da fase orgânica (SCHWARZ *et al.*, 2000; VELASCO *et al.*, 2004; ASNAASHARI *et al.*, 2014). No entanto, até o momento, não existem estudos sobre a incorporação do ácido gálico em uma emulsão visando a avaliação de suas atividades como um ativo cosmético multifuncional.

## 2.10 Permeação e retenção cutânea

A permeação é caracterizada pela capacidade que uma determinada substância apresenta em atravessar as barreiras presentes entre a pele e a corrente sanguínea. Em alguns cosméticos, se espera que o ativo penetre além do extrato córneo, mas não atinja a circulação sistêmica (JATO, 1997).

A pele suína é a mais recomendada para realização dos testes *in vitro*, pois é a que mais se aproxima fisiologicamente da pele humana. A espessura da epiderme e diversas características tais como, fibras elásticas da derme, enzimas presentes da epiderme, dentre outras (FERREIRA, 2012).

O ácido gálico apesar de ser muito estudado com relação a sua atividade antioxidante, tem recebido pouca atenção no que diz respeito a sua utilização como ativo cosmético e desta forma pouca referência se tem encontrado com respeito a seu potencial antioxidante para a pele. Além disso, o ativo pode ser explorado com o apelo de ser multifuncional, porém para garantir tal afirmação foi necessária a aplicação de estudos que avaliaram todo seu potencial e que comprovaram a manutenção destas atividades, a fim de garantir a eficácia desejada.

Visto a não existência, até o momento, de um compêndio oficial que descreva a monografia do ácido gálico, incluindo, desta forma, oficialmente métodos analíticos como a cromatografia líquida de alta eficiência, e considerando-se a necessidade de garantir adequada estabilidade do ativo após sua incorporação no sistema proposto, o presente trabalho validou uma metodologia analítica confiável, sendo a principal ferramenta na garantia da realização das demais atividades ora propostas. Além disso, foram investigadas diversas atividades, dentre elas a ação antimicrobiana que neste momento de inúmeros questionamentos em relação aos conservantes antimicrobianos convencionais se faz necessário a pesquisa de novos conservantes que sejam menos tóxicos e que atendam essa importante demanda do mercado.

O trabalho contempla um tema atual que é a busca por produtos que possam garantir a eficácia em preparações destinada a tratar a pele do rosto, seja prevenindo o envelhecimento, seja apresentando outros efeitos, tais como minimizar rugas e máculas hiperocrômicas, a fim de apresentar resultados que possam ser promissores para a utilização do ácido gálico em produtos antienvhecimento.

### 3 CONCLUSÃO

O ácido gálico apresentou elevada atividade antioxidante em baixas concentrações, podendo atuar como um ativo antienvhecimento prevenindo a formação de radicais livres, que podem ser gerados através de fatores externos e internos, responsáveis pelo processo de envelhecimento precoce.

Demonstrou resultados favoráveis também em relação a sua atividade despigmentante podendo inibir a enzima tirosinase.

A atividade antimicrobiana também foi comprovada, para bactérias Gram-positivas a concentração de ácido gálico necessária para promover a inibição foi menor do que para as bactérias gram-negativas, que precisaram de uma maior concentração de ácido gálico para ter a atividade esperada.

Pelos estudos de citotoxicidade podemos concluir que a concentração de ácido gálico utilizada no estudo é segura.

No estudo de liberação, quase 50% do ativo foi liberado durante 8h e com base no modelo de liberação de Higuchi, esse processo de liberação se dá por um processo de difusão. Com isso podemos concluir que a emulsão é capaz de liberar o AG contido nela, permitindo o contato com a pele.

Com base nos resultados da permeação a concentração de 1% do AG, demonstra ser segura pois a concentração permeada é baixa e muito inferior a concentração tóxica para as células.

A porcentagem de retenção na epiderme/derme foi maior do que a retida no estrato córneo o que caracteriza resultados promissores, visto que o ativo deve atuar na epiderme/derme que é o seu principal local de ação.

A emulsão demonstrou estabilidade frente as diferentes temperaturas expostas ao longo dos 90 dias.

Com isso podemos concluir que o ácido gálico pode ser utilizado com um ativo multifuncional em uma formulação cosmética destinada a tratar a pele do rosto seja prevenindo o envelhecimento, seja apresentando outros efeitos que possam minimizar

rugas e máculas hiperocrômicas com propriedades de antienvhecimento, por ter todas as atividades no estudo comprovadas.

## REFERÊNCIAS

ABIHPEC. Associação brasileira da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos; SEBRAE. Serviço brasileiro de apoio às micro e pequenas empresas. **Caderno de tendências 2019-2020: Higiene Pessoal-Perfumaria-Cosméticos**. São Paulo, 2019. Disponível em: < <https://abihpec.org.br/publicacao/caderno-de-tendencias-2019-2020/> > Acesso em: 05 jan. 2019.

ALMEIDA, M. G. J. **Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum***. 2013. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, São Paulo, 2007.

ARAÚJO, S.A.C.; TEIXEIRA, M.F.S.; DANTAS, T.V.M.; MIRANDA, A.M.; LIMA, F.E.S.; MELO, V.S.P.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E.C. Avaliação *in vitro* da atividade citotóxica de drogas antivirais em fibroblastos caprinos. **Ciência Animal**, v. 18, n.1, p. 25-31, 2008.

ASNAASHARI, M.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A. Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion. **Food Chemistry**, v. 159, n. 0, p. 439-444, 2014.

BATISTEL, M.A; CHORILLI, M.; LEONARDI, G.R. Approach to the process knowledge of skin aging among different ethnics. - **Revista Brasileira de Farmácia**. v.88, n.2, p. 59-62, 2007.

BEZERRA, B.P. **Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de teor do ácido gálico e catequina fitoterápico Sanativo por**

**Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.** 140f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Natal, 2012.

BRANEN, A.L.; DAVIDSON, P.M. Use of antioxidants in self-preserving cosmetic and drug formulations. In: KABARA, J.J.; ORTH, D.S. (Ed.). **Preservative-free and self-preserving cosmetics and drugs: principles and practice.** New York: Marcel Dekker, 1997, cap.7, p.159-180.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.166, de 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira, 2010.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 24 nov. 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE n.899, de 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária **Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos,** 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/106351/107910/Guia+para+Avalia%C3%A7%C3%A3o+de+Seguran%C3%A7a+de+Produtos+Cosm%C3%A9ticos/ab0c660d-3a8c-4698-853a-096501c1dc7c>>. Acesso em: 02 mar. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da diretoria colegiada - RDC nº 07, de 10 de fevereiro de 2015.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 fev. 2015.

BRITO, N.M.; JUNIOR, O.P.A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M.L. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Revista Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente,** Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

BRITTAIN, H. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. **Pharmaceutical Technology.**, Ed. Bras., São Paulo, v.2, p.4-9, 1998.

CANDEIAS, L.P.; MACFARLANE, D.P.S.; MCWINNIE, S.L.W.; MAIDWELL, N.L.; ROESCHLAUB, C.A.; SAMMES, P.G.; WHITTLESEY, R. The catalysed NADH reduction of resazurin to resorufin. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions 2, n. 11, p. 2333-2334, 1998.

CARDOSO, C.; SANTANA, E.; MAYER, K.; GONÇALVES, M. **Reino Monera – Bactérias.** Disponível em: [:<http://reinomonerabacteria.blogspot.com/2011/04/bacterias-gram-positivas-e-gram.html>](http://reinomonerabacteria.blogspot.com/2011/04/bacterias-gram-positivas-e-gram.html) . Acesso em: 03 fev. 2018.

CHAND, S.; LUSUNZI, I.; VEAL, D. A.; WILLIAMS, L. R.; KARUSO, P. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **Journal of Antibiotics.** v.47, p.1295, 1994.

CHENG, Z.; REN, J.; YAN, G.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry.**, v.31, n.2, p.149-162, 2003.

CHENG, Z.; REN, J.; LI, Y.; CHANG, W.; CHEN, Z. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl radical and phenolic compounds by qualitative structure and activity relationship. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v.10, n.12, p.4067-4073, 2002.

CHIARI, B.G. **Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.** 137p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing;** Twenty -Fifth Informational

Supplemen . CLSI document M100 - S125. Clin and Laborat Stand Instit. CLSI, 2006.

CORREA, M. A. **Cosmetologia ciência e técnica**. São Paulo: Medfarma, 2012.

COUTO, A.; NICOLAU, R.A. **Estudo do envelhecimento da derme e epiderme - revisão bibliográfica**. Disponível em: [http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00392\\_01O.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00392_01O.pdf) >. Acesso em: jan., 2019.

CUNHA, M. G.: MACHADO, C.A.: PARAVIC, F.D. Alterações histológicas dos tipos de colágeno após diferentes modalidades de tratamento para remodelamento dérmico: uma revisão bibliográfica. **Revista: Surgical & Cosmetic Dermatology**. v.7, n.4, p. 285-292, 2015.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Química Verde, Economia Sustentável e Qualidade de Vida. **Revista Virtual Química**., v.6, n. 1, p. 85-111, 2014.

FERNANDES, F.H.A., SALGADO, H.R.N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. Analytical Chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**.1040-8347 (Print) 1547-6510 (Online), 2015.

FONTES, I.J.G. **Antioxidantes como substâncias cosmetologicamente activas**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. **Journal Investigative Dermatology**., v.64, n.3, p.190-195,1975.

FRANZ, T.J. The finite dose technique as a valid in vitro model for the study of percutaneous absorption in man.**Current Problems in Dermatology**, v.7, p.58-68,1978.

FRIES, A.T.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n.19, p. 17-23, 2010.

GOMES, A. **Encapsulação de ácido gálico em sistemas emulsionados: efeito da composição das fases.** 140f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos. Campinas, 2015.

GU, Y. A. S.; REGNIER, L.; McCLEMENTS, J. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin- $\ell$ -carrageenan membranes. **Journal of Colloid Interface Science**, v.286, p.551-558, 2005.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v.70, n.5, p.257-265, 2012

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**. v.23, n.3, p. 418-424, 2004.

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

ICH, INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology**, 1996.

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 Ciências Farmacêuticas Básica Aplicadas**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

JATO, J.L.V. **Tecnologia Farmacêutica: Aspectos Fundamentais de los Sistemas farmacêuticos y operaciones basicas**, Madrid: Editorial Sintesis, 1997. v. I, p. 1-362.

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

KIM, Y.J. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. **Biological Pharmaceutical Bulletin** v.30, n.3 p. 1052-1055, 2007.

KNOWLTON, J.; PEARCE, S. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Oxon: Cotswold Publishing, 1996.

LEONARDI, Gislaine Ricci. **Cosmetologia Aplicada**. São Paulo: Medfarma, 2004.

LIMA, K. G. **Avaliação do efeito do ácido gálico no tratamento de células de hepatocarcinoma HepG2**. 57f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.41, n.2, São Paulo, Apr./June 2005.

LU, Z.; NIE, G.; BELTON, P.S.; TANG, H.; ZHAO, B. Análise de relação estrutural-atividade da capacidade antioxidante e efeito neuroprotetor de derivados de ácido gálico. **Neuroquímica Internacional**. v.48, n.4, p. 263-274, 2006.

MAIO, M. **Tratado de Medicina Estética**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2012.

MASSON, D.S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes**. 163f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

MARQUELE, F. D.; OLIVEIRA, A. R. M.; BONATO, P. S.; LARA, M. G.; FONSECA, M. J. V. Propolis extract release evaluation from topical formulations by chemiluminescence and HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.41, p.461–468, 2006.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; FONSECA, Y. M.; DE FREITAS, O.; FONSECA, M. J. V. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: Stability, cutaneous absorption and *in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v.342, p.40–48, 2007.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant

activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127–130, 2001.

MIOT, L.D.B.; MIOT, H.A.; SILVA, M.G.; MARQUES, M.E.A. Fisiopatologia do melasma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.6, Rio de Janeiro, 2009.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal Science Technology**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MORGANTI, P; RUOCCO, E; WOLF, R; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 489-501, 2001.

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

MURRAY, P. R.; **Manual of Clinical Microbiology**. 7th ed. Washington, DC: ASM Press, 1999.

NICOLETTI, M.A.; ORSINE, E.M.A.; DUARTE, A.C.N.; BUONO, G.A. Hiperpigmentosidades: Aspectos Gerais e Uso de Depigmentantes Cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**. v. 14, p.46-51, São Paulo, 2002.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for the conduct of skin absorption studies**. Paris, 2004. (OECD Series on Testing and Assessment, Number 28).

OLIVEIRA, K.A.M.; OLIVEIRA, G.V.; BATALINI, C.; ROSALEM, J.A.; RIBEIRO, L.S. Atividade antimicrobiana e quantificação de Flavonoides e Fenóis totais em diferentes extratos de Própolis. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 33, n. 2, p. 211-222, Londrina, 2012.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Métodos para avaliação da atividade

antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n.2, Apr./June, João Pessoa, 2008.

OYAMA, T.; TAKAHASHI, S.; YOSHIMORI, A.; YAMAMOTO, T.; SATO, A.; KAMIYA, T.; ABE, H.; ABE, T.; TANUMA, S. Discovery of a new type of scaffold for the creation of novel tyrosinase inhibitors. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 24, p.4509–4515, julho, 2016.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J; PORTAELS, F. Resazurin Microtiter Assay Plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemistry Biophysics and Research Communications**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN J.R. **Introdução a Espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

PHARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. Rio de Janeiro: Companhia Editora Nacional, 1929. p.34-35.

PUBCHEM. **CID 370 (Ácido Gálico)**. Disponível em: [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic\\_acid](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Gallic_acid). Acesso em: 10 dez. de 2018.

RABÊLO, S.V.; COSTA, M.M.; LIBÓRIO, R.C.; ALMEIDA, J.R.G.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, edição especial, e., p.265-271, Fevereiro, 2014. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452014000500031](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452014000500031).

ROCHA, L.B.; MELO, A.M.; PAULA, S.L.A.; NOBRE S. A. M.; ABREU I.N. Ácido gálico como principal antioxidante da casca do fruto do pequi (*Caryocar*

*brasiliense Camb.*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, Oct./Dec, Botucatu, 2015.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, Apr./June, São Carlos, 2003.

ROZATTO, M.R. **Determinação da atividade antimicrobiana in vitro de extratos, frações e compostos isolados de *Arrabidaea brachypoda***. 101f. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

SANTOS, M.P. **O papel das vitaminas antioxidantes na prevenção do envelhecimento cutâneo**. 16f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, 2012.

SANTOS, L.P. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados contendo extrato padronizado de *ilex paraguariensis a. st.-hil.* visando à obtenção de produto fitoterápico tópico com atividade antioxidante**. 109f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

SATHLER, N.S. **Cosméticos Multifuncionais: aspectos históricos, características e uma proposta de formulação**. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018

SCHWARZ, K.; HUANG, S. W.; GERMAN, J. B.; TIERSCH, B.; HARTMANN, J.; FRANKEL, E. N. Activities of antioxidants are affected by colloidal properties of oil-in-water and water-in-oil emulsions and bulk oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 10, p. 4874-4882, 2000.

SCOTTI, L. **Estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia cosmética de substâncias ativas empregadas em combatê-lo**. 103f. Dissertação (Mestrado) – Pós Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. **Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia**. São Paulo: Tecnopress, 2003. 115p.

SILVA, L.M. **Encapsulação da vitamina C em lipossomas para o tratamento do envelhecimento cutâneo: desenvolvimento tecnológico, analítico e avaliação da performance biológica in vitro em modelos de permeação cutânea e em linhagens celulares de queratinócitos e fibroblastos**. 48f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal De Goiás, 2016.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Sacharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.1, n.1, p.95-100, 2005.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p.71-81, 2002, Campinas.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.S.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova.**, v. 30, n. 2, p.351-355, 2007.

SPAGNOL, C.M.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.; SALGADO, H.N. (inventores); Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho (titular); AUIN- Agencia Unesp de Inovação (depositante). **Processo de preparo de filmes poliméricos secos, formulação de filmes poliméricos secos obtida e seu uso**. Brasilpatente BR10 2015 017334-2, 21 jul, 2015.

SPAGNOL, C.M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. 148f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

VALENTINI, S.R.; SOMMER, W.A; MATIOLI, G. Validação de métodos analíticos. **Arq Mudi**. v. 11, n. 2, p. 26-31, 2007.

VANZIN, S. B.; CAMARGO, C. P. **Entendendo cosmeceuticos: diagnósticos e tratamentos**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2011.

VELASCO, J.; DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Antioxidant activity of phenolic compounds in sunflower oil-in-water emulsions containing sodium caseinate and lactose. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 5, p. 325-333, 2004.

VIANNA, R. P. Filho, **Aplicação de polissacarídeo em emulsão cosmética: análise reológica**. 123f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Curitiba, 2008.

VIEIRA, L.M.; SOUSA, M.S.B.; FILHO, J.M.; LIMA, A. FENÓLICOS TOTAIS E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE POLPAS DE FRUTOS TROPICAIS. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 33, n. 3, p. 888-897, Setembro 2011.

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