

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

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

SAMANTA DE MATOS SILVA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Ana Maria Fusco Almeida

COORIENTADORA: Dra. Junya de Lacorte Singulani

ARARAQUARA – SP

2020

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

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

SAMANTA DE MATOS SILVA

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

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

ARARAQUARA - SP
2020

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

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

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

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: SAMANTA DE MATOS SILVA

ORIENTADORA: ANA MARISA FUSCO ALMEIDA

COORDINADORA: JUNYA DE LACORTE SINGULANI

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

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

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

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

Araraquara, 29 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

LISTA DE SÍMBOLOS

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo pretendeu analisar a viabilidade de métodos e modelos alternativos aos mamíferos para avaliação da toxicidade do AG em solução e em uma formulação cosmética.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade do AG em diferentes linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT), fibroblastos de derme humana (HDFa) e hepatocarcinoma humano (HepG2);
- Avaliar a toxicidade do AG no modelo animal alternativo *C. elegans*;
- Avaliar a toxicidade do AG em solução no modelo animal alternativo *G. mellonella*, quando tratada por via injetável (VI), através dos parâmetros de sobrevivência, resposta imune celular e humoral;
- Determinar uma formulação farmacêutica adequada para incorporação do AG para testes de toxicidade do AG por via tópica (VT) com modelo animal alternativo *G. mellonella*, através dos critérios de sobrevivência, resposta imune celular e humoral.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Envelhecimento cutâneo e novas perspectivas de tratamentos cosméticos

Ao longo da vida, a pele passa por mudanças perceptíveis em sua aparência como a perda de elasticidade e firmeza, aparecimento de rugas e marcas de expressão, bem como manchas de coloração mais escuras que o tom da pele. Não se pode atribuir uma única causa ao envelhecimento, já que se trata de um processo multifatorial e complexo do ponto de vista clínico (GILCHREST, 1996; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; NAYLOR; WATSON; SHERRATT, 2011).

As alterações ocorridas na pele ao longo do tempo, órgão mais extenso e visível do corpo humano, se devem a fatores intrínsecos (internos ou cronológicos) e extrínsecos (externos). Os fatores intrínsecos decorrem da passagem do tempo por si só, o envelhecimento inicia a partir do momento em que uma pessoa nasce e as mudanças fisiológicas na pele ocorrem desde então. Tais alterações estão diretamente relacionadas aos fatores genéticos, à perda da capacidade de o organismo equilibrar o estresse oxidativo, às alterações hormonais, aos processos inflamatórios, aos danos ao DNA e mutações, à diminuição dos telômeros, à senescência celular e ao aumento da glicação de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos. Já os fatores extrínsecos estão diretamente relacionados à dieta, à exposição à luz UV, ao fumo, à poluição, aos gases naturais deletérios como o ozônio, às doenças de causas microbiológicas e ao estresse (GILCHREST, 1996; MAKRANTONAKI; ZOUBOULIS, 2007; D'ORAZIO *et al.*, 2013; McDANIEL; FARRIS; VALACCHI, 2018).

Dentre os fatores relacionados ao envelhecimento, a perda da capacidade do organismo em combater as EROs é um dos principais, já que estas espécies por serem muito reativas podem provocar danos ao DNA, à estrutura das proteínas, lipídeos e nucleotídeos. Além disso, a exposição ao sol e ao fumo desencadeiam o aumento das EROs no organismo. Sendo assim, uma estratégia adotada para amenizar os sinais do envelhecimento precoce seria a utilização de antioxidantes que atuem no equilíbrio de produção e neutralização dessas moléculas reativas (CAVINATO *et al.*, 2017). Uma perspectiva de novos cosméticos tem como alvo a ampliação dos estudos relacionados aos antioxidantes naturais presentes nos vegetais, a fim de empregá-los em produtos eficazes no combate ao envelhecimento (PETRUK *et al.*, 2018; LOURENÇO; MOLDÃO-MARTINS; ALVES, 2019).

3.2 Antioxidantes naturais

Entende-se por antioxidante qualquer molécula capaz de neutralizar EROs diretamente ou agir indiretamente na regulação dos sistemas de regulação da produção de EROs, ou ainda, qualquer substância que possua capacidade de neutralizar substâncias muito reativas, após eliminá-las, formando novos radicais estáveis através de ligações de hidrogênio intramoleculares (HALLIWELL, 1990; KHLEBNIKOV *et al.*, 2007).

Atualmente, a utilização de antioxidantes está amplamente difundida na ciência graças ao seu potencial benéfico como anti-inflamatório e anti-idade, tendo grande importância nas áreas médica, cosmética e de alimentos (ZEHIROGLU; OZTURK SARIKAYA, 2019). Sua atividade contribui para a proteção do organismo frente aos riscos acarretados pelos radicais livres em diversas doenças, tais como câncer, doenças cardiovasculares, envelhecimento, doenças neurológicas e aterosclerose (KENNETH; BRUCE, 1998; BIRBEN *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2017; UCHMANOWICZ, 2020).

Os antioxidantes podem ser classificados como naturais ou sintéticos referentes à sua fonte de obtenção, como enzimáticos ou não-enzimáticos dependendo de sua atividade, endógenos ou exógenos a partir de sua obtenção pelo organismo, e ainda podem ser classificados como solúveis ou insolúveis em água (ZEHIROGLU; OZTURK SARIKAYA, 2019).

Os antioxidantes naturais são aqueles obtidos de origem vegetal ou animal, podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos e endógenos ou exógenos. Os antioxidantes enzimáticos dividem-se entre os grupos de enzimas primárias e secundárias, e os antioxidantes não enzimáticos se dividem nos grupos de cofatores, vitaminas e seus derivados, minerais, compostos organossulfurados, carotenoides, componentes não dependentes de nitrogênio e ácidos fenólicos (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

O corpo humano possui um sistema antioxidante para se proteger do estresse oxidativo que ocorre naturalmente, ele pode ser enzimático ou não-enzimático. O primeiro se refere ao sistema antioxidante que ocorre através da ação enzimática endógena e o segundo se refere aos mecanismos exógenos, em sua maioria, que são adquiridos principalmente através da dieta (LOBO *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos fazem parte do grupo dos antioxidantes naturais exógenos, são um grupo de metabólitos secundários das plantas e possuem grande

importância para a reprodução dos vegetais, o desenvolvimento morfológico e processos fisiológicos. São sintetizados através das vias da pentose fosfatase, do chiquimato e dos fenilpropanoides. Sua estrutura química é composta por um ou mais anéis fenólicos e variam de acordo com os substituintes. Atualmente, a literatura descreve aproximadamente 8.000 estruturas diferentes de compostos fenólicos que possuem diferentes funções para as plantas, sendo mais comum sua classificação como flavonoides e não-flavonoides (DZIALO *et al.*, 2016).

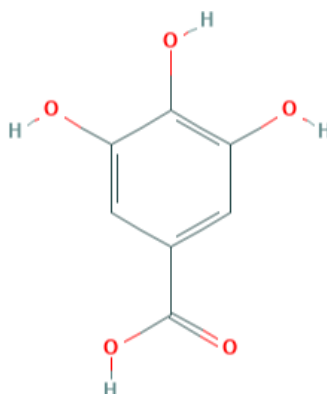
Os flavonoides pertencem à classe de polifenóis fitoquímicos que estão presentes em alimentos de origem vegetal. Sua atividade anti-inflamatória acontece por mecanismos diretos e indiretos e contribuem para a diminuição do estresse oxidativo promovendo benefícios à saúde de indivíduos com diabetes, inflamação gastrointestinal, câncer de cólon, doença inflamatória do intestino, doenças cardiovasculares e Alzheimer. Além de tratar, a ingestão de flavonoides age na prevenção de tais doenças (PEI; LIU; BOLLING, 2020).

Os ácidos fenólicos fazem parte da classificação dos compostos fenólicos não-flavonoides e se dividem em duas classes de substâncias, os ácidos hidroxibenzóicos e os ácidos hidroxicinâmicos. São comumente encontrados em frutas e vegetais, especialmente em substâncias que possuem os substituintes ($-OH$ e $-OCH_3$) nas posições C3 e C4 do anel aromático. Possuem importante atividade antioxidante que protege as células do dano causado pelos radicais livres, agem como quelantes e neutralizam os radicais hidroxil e peroxil, ânions superóxidos e peroxinitritos. Essas substâncias são de suma importância para o crescimento normal e para a defesa das plantas contra infecções e ferimentos que possam sofrer. O ácido gálico, pertencente ao grupo dos ácidos hidroxibenzóicos, é o de maior importância do grupo e o mais estudado dentre eles (KAHKONEN *et al.*, 1999; KRIMMEL *et al.*, 2010; CAROCHO; FERREIRA, 2013; DZIALO *et al.*, 2016).

3.3 O ácido gálico (AG) e suas propriedades

O AG é composto por um anel aromático e três hidroxilas ligadas ao anel central nas posições 3,4 e 5, conforme a Figura 1. Ele possui peso molecular de 170,12 g/mol, apresenta-se em forma de pó branco em temperatura ambiente, é fotossensível e sua solubilidade em água é de 11,9 mg/mL a 20 °C (PubChem, 2020).

Figura 1 – Estrutura química do ácido gálico (AG).



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

O AG possui uma variedade de propriedades benéficas: é um poderoso antioxidante, antimicrobiano, antifúngico, antiviral, anticarcinogênico, antimutagênico e anti-inflamatório (OSBORNE; PEELER; ARCHER, 1981; KROES *et al.*, 1992; BORGES *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017). Estudos recentes apontam que o composto está possivelmente relacionado à migração de queratinócitos e fibroblastos, atuando na ativação de marcadores, tais como quinases de adesão focal (FAK), quinases reguladas por sinal extracelular (Erk) e quinases de reparação tecidual da pele de pacientes com feridas ocasionadas por complicações metabólicas (YANG *et al.*, 2016). Dois estudos distintos demonstraram a capacidade anti-hiperglicêmica e cardioprotetora do AG em ratos com diabetes mellitus induzida e sinais de disfunção do miocárdio (PATEL; GOYAL, 2011; PUNITHAVATHI *et al.*, 2011).

Um estudo recente avaliou a penetração do AG através da pele e seu efeito antioxidante concluindo que o AG incorporado a microesferas de poli-caprolactona (PLC) atinge o estrato córneo, a epiderme e chega até a derme. O composto demonstrou ter capacidade de diminuir o estresse oxidativo ocasionado pela exposição à luz UV inibindo em média 41,45% da peroxidação lipídica quando comparado ao grupo controle (ALONSO *et al.*, 2016).

Segundo Su *et al.* (2013), o AG inibe a síntese de melanina pelos melanócitos através da diminuição de proteínas associadas à melanogênese. Devido a diminuição da produção de melanina, o AG tem potencial de ser utilizado para reduzir a hiperpigmentação da pele e atuar como agente clareador em cosméticos.

Outras pesquisas científicas demonstraram que a atividade antioxidante do AG está associada à diminuição da dermatite atópica, doença alérgica de pele, caracterizada por deixar a pele seca, com coceira, espessa e inflamada. Assim, a atividade do AG está relacionada a supressão da liberação da citocina pró-inflamatória interleucina-6 (IL-6) e das quimiocinas CCL7 e CXCL8 que estão relacionadas respectivamente ao tráfego de monócitos e neutrófilos que ocasionam a inflamação da pele (KIM *et al.*, 2006; TSANG *et al.*, 2016).

Em relação ao envelhecimento cutâneo, Thamsermsang *et al.* (2017) sugerem que o AG atua como princípio ativo antioxidante, promove a diminuição de moléculas inflamatórias e aumenta a produção de colágeno da pele. Segundo o grupo de pesquisadores, a atividade antioxidante do AG está relacionada à diminuição da expressão gênica de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNA) que estão relacionados a produção de citocinas inflamatórias, como por exemplo a interleucina 1 beta (IL-1 β) e o fator nuclear kappa beta (NF-k β).

O AG aumenta a produção de colágeno tipo II em células tratadas quando comparadas a células não tratadas com o composto, sugere-se que tal aumento está relacionado ao combate das EROs e IL-6 que induzem metaloproteinases da matriz (MMPs) celular que decompõe a matriz extracelular por inibição da expressão de pró-colágeno, dessa forma, o aumento da produção de colágeno combinado ao combate às moléculas que degradam a matriz contribuem para a diminuição dos danos causados pela exposição à luz UV (QUAN *et al.*, 2005; HWANG *et al.*, 2014).

3.4 Métodos alternativos ao uso de animais mamíferos

Durante a década de 1950, a Federação das Universidades para o Bem Estar Animal (do original Universities Federation for Animal Welfare - UFAW), deu início a um projeto que visava assegurar a ética e o bem estar animal em pesquisas científicas culminando na publicação do The Principles of Humane Experimental Technique (RUSSELL; BURCH, 1959). Assim, estabeleceu-se o princípio dos 3Rs que visa substituir, reduzir e refinar a utilização de animais mamíferos em pesquisas científicas sempre que possível (BALLS, 2005; TANNENBAUM; BENNETT, 2015). Subsequentemente, leis e diretrizes foram estabelecidas para a utilização de animais em pesquisa, bem como instituições e conselhos de ética foram criadas para fiscalizar o cumprimento das normas de experimentação com animais (MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009).

No Brasil, a Lei nº 11.794/2008, conhecida como Lei Arouca, foi sancionada em 2008 culminando na criação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea) ligado ao Ministério da Ciência e Tecnologia. Segundo dados da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), somente em 2012 foi criada a Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) e em seguida criou-se o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM) com a finalidade de coordenar a demanda nacional de métodos alternativos que substituíssem e reduzissem o uso de animais em pesquisas científicas (FIOCRUZ, 2020).

Em 2014 o Estado de São Paulo se tornou pioneiro no país na proibição da utilização de animais mamíferos para fins de desenvolvimento, experimentação e testes de produtos cosméticos, perfumaria e de higiene pessoal através da promulgação da Lei nº 15.316/2014. Foram incorporados aos ensaios de toxicidade de cosmético os métodos e modelos alternativos reconhecidos pelo CONCEA e RENAMA que estão dispostos no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (ANVISA, 2012).

Atualmente, diversos métodos alternativos foram sugeridos como possibilidades aos animais mamíferos, alguns exemplos são: cultura de células e tecidos, modelos de computador (QSAR- Quantitative Structure Activity Relationship, CADD - Aided Drug Design), vertebrados inferiores (*Danio rerio*), invertebrados inferiores (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Galleria mellonella*) e microrganismos (*Saccharomyces cerevisiae*) (DOKE; DHAWALE, 2015; SINGULANI *et al.*, 2018).

3.4.1 Métodos *in vitro* – Cultura celular

A aplicação de culturas celulares em estudos pré-clínicos de substâncias se tornou uma importante ferramenta em pesquisa científica, as quais podem ser utilizadas para avaliar novas substâncias químicas, cosméticos e fármacos quanto à sua eficácia e citotoxicidade. Com o aumento das tecnologias que proporcionam a cultura celular, houve uma melhora substancial de sua utilização em detrimento de animais (PAMIES; HARTUNG, 2017; SEGERITZ; VALLIER, 2017).

As linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCat) e fibroblastos de derme humana (HDFa), constituintes da pele humana, têm sido amplamente utilizadas em estudos que avaliam a eficácia e toxicidade de produtos cosméticos (KOSTYUK *et al.*, 2018; MOON *et al.* 2018; JANG *et al.*, 2020).

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano (HepG2) são células do endotélio do fígado responsáveis por secretar moléculas biologicamente ativas tais como citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico, e endotelinas. Além disso, estas células desempenham papel importante nos processos de lesão e reparo hepático (ROTH; JAESCHKE; LUYENDYK, 2018). Na pesquisa de possíveis sinais de toxicidade causada por componentes de formulações cosméticas, as células HepG2 são utilizadas, já que compõe o principal órgão de metabolização e produção de metabólitos que podem ser hepatotóxicos (VAN DEN HOF *et al.* 2014).

3.4.2 Métodos *in vivo* – *Caenorhabditis elegans*

Nematoide de vida livre do solo, *C. elegans* se tornou foco de pesquisas científicas na década de 1960. Possui tamanho reduzido, aproximadamente 1 mm de comprimento na fase adulta, o que o torna um modelo que necessita de espaços reduzidos para manutenção e baixos custos quando comparado aos mamíferos (Figura 2). Por se tratar de um nematoide hermafrodita e de ciclo de vida rápido de ser atingido permitem a condução de estudos em larga escala e tempo reduzido para serem executados (HUNT, 2016).

Caenorhabditis elegans alimenta-se com *Escherichia coli* e se desenvolve a temperaturas que variam entre 15 °C e 25 °C sem a necessidade de gás carbônico. Apresentam uma cutícula transparente e visível a olho nu que proporciona a visualização dos órgãos internos e seus ovos, o que torna dispensável a realização de ensaios que promovem observação de achados histopatológicos. Comparado aos mamíferos, *C. elegans* é uma metodologia ideal para avaliar várias concentrações de substâncias em um grande número de larvas simultaneamente (BOYD *et al.*, 2010; HUNT, 2016).

Figura 2 – Imagem representativa de larvas de *C. elegans* adultas em meio de cultura Nematode Growth Medium (NGM).



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

A utilização de larvas de *C. elegans* em pesquisa científica se justifica graças à resposta imune inata que este modelo apresenta semelhante à encontrada em humanos. Por conta disso, estudos que avaliam infecções de microrganismos e a interação patógeno-hospedeiro são conduzidos utilizando este modelo animal alternativo (APFELD; ALPER, 2018). Alguns estudos recentes têm inserido o nematoide como metodologia para avaliar possíveis efeitos tóxicos ocasionados por substâncias químicas e alterações embriológicas (BOYD *et al.*, 2010; ALLARD *et al.*, 2013). Em adição a estes ensaios, *C. elegans* permite a condução de testes de concentração letal mediana (CL50), taxa de crescimento das larvas, alteração de expressão gênica, ensaios bioquímicos, avaliação de mudanças na motilidade, alimentação e reprodução (HUNT, 2016).

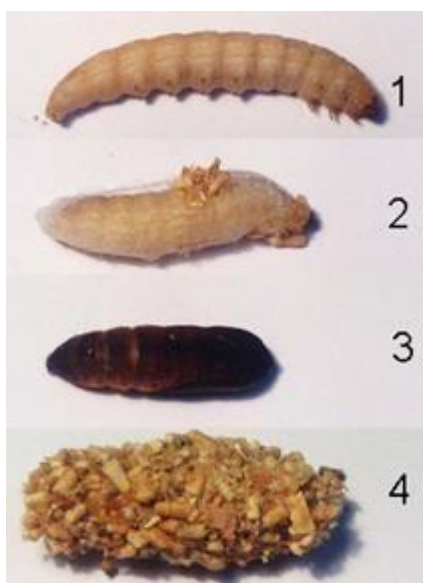
3.4.3 Métodos *in vivo* - *Galleria mellonella*

Galleria mellonella é um inseto da ordem Lepidoptera e família Pyralidae, conhecida por habitar colmeias de abelhas, alimentam-se principalmente de cera de abelha e pólen nos primeiros estágios de vida da larva. Seu ciclo de vida se inicia com a deposição de ovos pela borboleta, seguem para o estágio larval, formam a pupa que dá origem ao adulto. Este ciclo se completa em um período que varia de 6 a 8 semanas em temperaturas entre 29 e 39 °C, conforme a Figura 3 (SMITH, 1965; KWADHA *et al.*, 2017).

O modelo animal alternativo *G. mellonella* permite que estudos em larga escala sejam conduzidos com agilidade, além de não necessitarem de equipamentos e técnicas robustas para sua manutenção e tratamento. São diversos

os ensaios que podem ser conduzidos com as larvas do inseto dentre os quais encontram-se o monitoramento da sobrevivência e cálculo da dose letal mediana (DL50), virulência de patógenos, ensaios histopatológicos, alterações no comportamento e deposição de ovos, alterações no sistema imune em decorrência à infecção e/ ou tratamento com substâncias químicas (RAMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012).

Figura 3 – Desenvolvimento da larva de *G. mellonella*.



1- Larva jovem; 2- Último estágio larval; 3- Pupa; 4- Casulo.

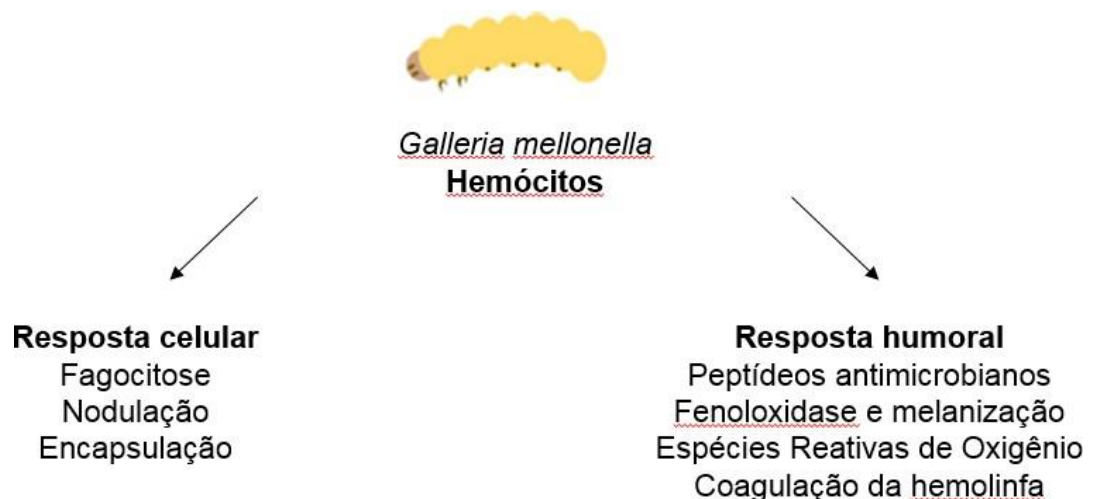
Fonte: Singkum *et al.* (2017).

O principal foco de estudos neste modelo é a fase larval devido à facilidade de se extrair a hemolinfa para análises de alterações no sistema imune e por apresentar nesta fase do seu ciclo de vida a melanização do corpo das larvas como forma de resposta imunológica à patógenos e inflamação, além disso, as larvas adultas demonstram maior facilidade de tratamento quando comparada aos demais estágios de vida. A literatura relata três formas de tratamento das larvas, sendo a via tópica, a oral e a injetável. Dentre elas a via injetável é a que possui maior volume de estudos, seguida da via oral e a via tópica a que apresenta menor número de estudos, sendo ainda escassos e estão relacionados principalmente a avaliação da virulência de fungos (SCULLY; BIDOCHKA, 2005; SINGKUM *et al.*, 2017)

A utilização de larvas de *G. mellonella* como alternativa aos animais convencionalmente utilizados em pesquisas científicas ocorre devido às semelhanças que o sistema imune do inseto possui com a resposta imune inata dos mamíferos (SCULLY; BIDOCHKA, 2005). Dentre os mecanismos de defesa encontrados em *G. mellonella* estão as barreiras fisiológicas e anatômicas que atuam como proteção ao ambiente externo, sua cutícula é composta por três diferentes camadas antes de atingir o corpo de gordura, são elas: epicutícula, procutícula e epiderme. Além destas barreiras, sua cavidade oral também é dotada de baixa umidade e baixa oferta de nutrientes que impedem a passagem de patógenos através desta via. Mesmo que consigam atravessar a cavidade oral, ao chegar no intestino, os patógenos podem ser combatidos por enzimas digestivas, um pH desfavorável e flora intestinal. Além disso, *G. mellonella* ainda apresenta um sistema imune capaz de interromper a ação dos patógenos (ELLIS *et al.*, 2013; WODJA, 2016; SHEEHAN; KAVANAGH, 2017).

Neste modelo, a resposta imune é dividida entre resposta celular e resposta humoral (Figura 4).

Figura 4 – Representação do sistema imune das larvas de *G. mellonella*.



Fonte: adaptado de Pereira *et al.* (2018).

A resposta imunológica vista em *G. mellonella* ocorre por intermédio dos hemócitos, células de defesa mais abundantes. Os hemócitos são responsáveis pela

resposta celular que ocorre através da fagocitose, nodulação e encapsulação de patógenos, enquanto a resposta humoral se dá através da produção de peptídeos antimicrobianos, melanização que ocorre pela ação da enzima fenoloxidase, produção de EROs e coagulação da hemolinfa (SHEEHAN; KAVANAGH, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

Galleria mellonella possui seis tipos de células do sistema imune diferentes que se diferenciam a partir dos hemócitos, sendo os granulócitos e plasmócitos os mais abundantes na hemolinfa do inseto. Essas células de defesa realizam a defesa do organismo através da fagocitose, encapsulação e coagulação; transportam componentes da cutícula e os eonocitoides, uma das células do sistema imune, transportam precursores da fenoloxidase, enzima responsável por desencadear a cascata de melanização que produz melanina para eliminar ou imobilizar os patógenos (WODJA, 2016; SINGULANI *et al.*, 2018). O processo de melanização visto neste modelo é uma de suas vantagens frente aos demais, já que se pode fazer visivelmente a avaliação da resposta imune conforme a intensidade de coloração da cutícula (CHAMPION; TITBALL; BATES, 2018). Assim, sua escolha como modelo animal alternativo para avaliar a exposição ao AG se mostra promissora frente a emergência de outras metodologias.

Os hemócitos, caracterizados como as células de defesa do sistema imune inato de *G. mellonella*, podem variar com o estágio de desenvolvimento ou em resposta a lesão, infecção ou estresse. Estas células possuem variações histoquímicas, funcionais e fisiológicas, por isso são identificadas nas larvas de *G. mellonella* como pró-hemócitos, plasmócitos, células granulares, granulócitos, espirulócitos e eonocitoides (LAVINE; STRAND, 2002; BLANCO *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2018).

Quando o animal é exposto a lesão, infecção ou estresse os hemócitos que se encontram majoritariamente na hemolinfa, se diferenciam, aumentam em quantidade e migram para os diferentes tecidos do organismo. Os pró-hemócitos são pequenas células circulares com um núcleo grande e são consideradas células de defesa que dão origem às demais (STRAND, 2008). Os plasmócitos são as células mais comuns em *G. mellonella* e possuem enzimas lisossomais em seu citoplasma, possuem papel crucial na fagocitose e também na encapsulação (STRAND, 2008; BLANCO *et al.*, 2017). Os granulócitos, assim como os plasmócitos são células comumente encontradas em *G. mellonella*, possuem núcleo pequeno e

abundantes grânulos no citoplasma, atuam diretamente no processo de encapsulação e indiretamente na fagocitose (STRAND, 2008; PEREIRA *et al.*, 2018). Os esperulócitos não estão presentes em todos os insetos, são responsáveis pela secreção de componentes da cutícula e sua função no sistema imune não está bem elucidada até o momento (BLANCO *et al.*, 2017). Por fim, os eonotócitóides são células grandes e esféricas, atuam na cascata da produção da fenoloxidase e não realizam fagocitose (BROWNE; HEELAN; KAVANAGH, 2013; BLANCO *et al.*, 2017).

4 METODOLOGIA

4.1 Substâncias químicas

O ácido gálico (CAS nº 5959-86-8) foi adquirido da empresa Dinâmica Química Contemporânea Ltda. e possui 98,99% de pureza.

4.2 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

4.2.1 Preparo da solução de AG

Para o ensaio de citotoxicidade foi preparada uma solução estoque contendo 0,1 g/mL de AG em dimetilsulfóxido (DMSO) 100%. No dia do experimento foram preparadas soluções de trabalho de AG em DMEM (Dulbecco Modification of Minimum Essencial Media) na concentração de 1.000 µg/mL de AG e DMSO 1%.

4.2.2 Condições de manutenção das células

As linhagens de células de hepatocarcinoma humano (HepG2), queratinócito imortalizado humano (HaCaT) e de fibroblasto de derme humana (HDFa) foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e cultivadas em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e glicose.

Conforme especificações, as células foram mantidas em ambiente controlado em temperatura de 37 °C a 5% de CO₂ (g) em garrafas para cultura de 75 cm² durante 3 a 4 dias para que houvesse adesão e formação de uma monocamada de células (RISS *et al.*, 2016).

4.2.3 Ensaio de citotoxicidade

Após a adesão celular e confluência de 75%, as células foram tratadas com tripsina 0,25%, centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos e 5x10⁴ células por poço foram pipetadas em placa de 96 poços. A placa foi então incubada por 24 h para adesão celular. Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de solução AG em DMEM por diluição seriada a partir de uma concentração de 1.000 µg/mL obtendo-se, assim, as concentrações de 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,62 e 7,81 µg/mL, sendo que a solução de trabalho (DMSO 1%) foi preparada a partir da solução estoque.

Após o tratamento, a placa foi novamente incubada por 24 e 48 h. Decorrido estes períodos, 100 µL de uma solução de resazurina 50 µM em DMEM foi

adicionada aos poços e as placas foram incubadas novamente por 4 h para a quantificação da viabilidade celular.

Por fim, a leitura da microplaca foi realizada em 560 e 590 nm em leitora de microplacas BioTek com auxílio do software Gen5 2.09. Os resultados foram expressos em porcentagem de células vivas (RISS *et al.*, 2016) e a concentração inibitória de 50% (CI50) do AG em cada linhagem celular foi calculada através do software Graph Prism 5.0.

Quatro ensaios independentes foram realizados e os resultados foram expressos com média e desvio padrão.

4.3 Ensaio *in vivo* com *Caenorhabditis elegans*

4.3.1 Preparo da solução de AG

Para o ensaio de toxicidade com *C. elegans*, foi preparada uma solução estoque de 0,1 g/mL de AG em DMSO 100% e para o experimento esta solução foi utilizada no preparo de uma solução de trabalho em Brain Heart Infusion Agar (BHI) e cloreto de sódio (NaCl) com concentração de 1.000 µg/mL de AG e DMSO 1%.

4.3.2 Ensaio de toxicidade

As larvas do nematoide *C. elegans* da cepa AU37 (glp-4(bn2) I; sek-1(km4) X) cresceram em placas de Nematode Growth Medium (NGM) Agar com *E. coli* OP50 e foram mantidas em incubadora a 15 °C.

O preparo das larvas para o experimento ocorreu com a sincronização das larvas utilizando hipoclorito de sódio 3%. Ao atingirem a fase L4, as larvas foram transferidas para um tubo falcon de 15 mL e lavadas com NaCl 50 µM e centrifugadas em centrífuga sorológica INBRAS a 2.000 rpm durante um minuto a 25 °C por três vezes consecutivas. Após a retirada do sobrenadante, 5 µL foi retirado e colocado em lâmina para contagem das larvas. Uma quantidade de 10 a 20 larvas por poço foi adicionada em placa de 96 poços contendo BHI 40%, NaCl 60%, 10 µg/mL de colesterol em etanol e os antibióticos canamicina (90 µg/mL) e ampicilina (200 µg/mL) (SINGULANI *et al.*, 2017).

Por fim, soluções de AG contendo 1% de DMSO em BHI foram adicionadas em cada poço. As concentrações de AG utilizadas foram 1.000, 500, 250, 62,5, 15,62, e 3,905 µg/mL, além de um controle negativo (sem tratamento) e um controle de DMSO 1%.

Decorrido o tratamento dos nematoides, estes foram incubados a 25 °C durante quatro dias e a morte foi avaliada diariamente através dos critérios de forma e mobilidade. As larvas imóveis e em formato de vara foram consideradas mortas, enquanto as com movimento e formato sinusoidal foram consideradas vivas. A análise foi realizada com auxílio de um microscópio automatizado ZEISS Axiocam ICc 5 e do software ZEN 2.3 lite (SINGULANI *et al.* 2017). Três ensaios independentes foram realizados e concentração letal 50% (CL50) foi calculada com auxílio do software Graph Prism 5.0

4.4 Ensaios *in vivo* com *Galleria mellonella*

Os ensaios com as larvas de *G. mellonella* ocorreram por duas vias de tratamento, a via injetável (VI) e a via tópica (VT) comparando-se os resultados entre ambas.

4.4.1 Preparo da solução de AG para ensaio por VI

Os ensaios através da VI com as larvas de *G. mellonella* foram realizados a partir de soluções estoque de AG em DMSO 100% nas concentrações 0,1 g/mL, 0,2 g/mL, 0,3 g/mL e 0,4 g/mL. A partir destas soluções foram preparadas, respectivamente, as soluções de trabalho de AG em tampão fosfato alcalino (PBS) nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, correspondentes a 50, 100, 150 e 200 µg/larva, em DMSO 5%.

4.4.2 Preparo da emulsão contendo AG para ensaio por VT

A emulsão foi preparada em colaboração com a mestre e doutoranda Lígia de Souza Fernandes do Departamento de Fármacos e Medicamento da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara- UNESP.

O sistema emulsionado foi preparado aquecendo-se os componentes da fase oleosa e aquosa separadamente a 75 °C até a completa fusão dos materiais graxos. A fase aquosa foi adicionada na fase oleosa sob agitação manual até atingir a temperatura ambiente. Após o resfriamento, o AG foi incorporado a 5 g de formulação nas concentrações 0,5%, 1,0%, 1,5% e 2,0%, ou seja, 0,02 g, 0,04 g, 0,06 g e 0,08 g de AG, respectivamente. Após a incorporação do AG a formulação foi submetida a agitação mecânica por 5 minutos para garantir a homogeneidade, conforme Tabela 1.

Tabela 1 – Sistema emulsionado contendo ácido gálico (AG).

	Componentes	%
Princípio ativo	Ácido gálico	0,5%, 1%, 1,5%, 2%
Fase oleosa	Polawax	15,0
	Álcool cetosteárico	4,5
	Monoestearato de glicerila	2,0
	Óleo mineral	2,0
	Estearato de octila	6,5
Fase aquosa	Rapithix A-60	1,60
	Metabissulfito de sódio	0,01
	Metilparabeno	0,10
	Água	q.s.p 100%
	Ácido cítrico	q.s.p pH 5,0

4.4.3 Condições gerais de manutenção

As larvas foram mantidas em potes de plástico a 25 °C e alimentadas com cera de abelha e pólen até atingirem entre 2 a 3 cm e massa entre 180 a 300 mg. Foram selecionadas as larvas que possuíam coloração clara e com ausência de melanização. Para a realização dos experimentos as larvas foram incubadas a 37 °C e mantidas sem alimento em placas de petri por 24 h (ROMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012). Os ensaios foram realizados por VI e por VT.

4.4.4 Tratamento das larvas

O tratamento das larvas de *G. mellonella* por VI se deu através da injeção de 10 µL de solução de AG em PBS nas concentrações propostas, em DMSO 5% e um grupo controle de DMSO 5% em PBS com auxílio de uma seringa de Hamilton®. Após 4 h do tratamento as larvas foram submetidas aos ensaios de sobrevivência, quantificação de hemócitos e quantificação de melanização (ROMARAO; NIELSEN-LEROUX; LERECLUS, 2012; CHAMPION *et al.*, 2018).

Metodologias para o tratamento por via tópica das larvas de *G. mellonella* não constam na literatura. Para a realização destes ensaios buscou-se desenvolver uma metodologia adequada que atendesse as características anatômicas das larvas.

Assim, o tratamento através da VT foi realizada a aplicação de 0,01 g de emulsão contendo AG (o que corresponde à mesma quantidade de AG aplicado em 10 µL pela VI) tendo como grupo controle a emulsão sem o AG, no dorso das larvas

com o auxílio de uma espátula seguindo o guia da OECD 404 preconizado para a avaliação de irritação/corrosão cutânea aguda de substância em coelhos e com adaptações para as larvas de *G. mellonella* (OECD 404, 2002). Assim, a emulsão foi aplicada e deixada durante 3 minutos no dorso das larvas, em seguida foi retirada com auxílio de uma gaze. Uma segunda aplicação foi realizada e mantida por um período de 1 h e em seguida retirada. Por fim, uma terceira aplicação foi feita com duração de 4 h e retirada após este tempo. Ao fim do tratamento as larvas foram submetidas aos mesmos ensaios de sobrevivência, quantificação de hemócitos e quantificação de melanização.

4.4.5 Ensaio de sobrevivência das larvas

Grupos de 8 a 10 larvas foram tratadas com AG por VI e VT como previamente descrito e em seguida, mantidas em estufa a 37 °C. A morte foi avaliada diariamente durante 96 h. Foram consideradas mortas as larvas com ausência de movimento e com coloração escura (RAMARAO; NIELSON-LEROUX; LERECLUS, 2012). A DL50 foi calculada através do software Graph Prism 5.0 e expressa em mg/Kg.

Três experimentos independentes foram realizados.

4.4.6 Quantificação de hemócitos

Grupos de 3 larvas foram tratadas com AG como previamente descrito por VI e VT e em seguida, mantidas em estufa à 37 °C durante 4 h. Após esse período as larvas tiveram sua hemolinfa coletada por incisão feita na lateral esquerda da última pró-pata com auxílio de um bisturi. Um pool de cada larva foi feito retirando-se 2 alíquotas de cada com 10 µL de hemolinfa, posteriormente diluiu-se cada amostra em solução anticoagulante (2% de NaCl; 0,1 M de glicose; 30 mM de citrato de sódio; 26 mM de ácido cítrico e 10 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)) em uma proporção de 1:10. Em seguida, duas alíquotas de 10 µL de cada amostra foram agitadas em vortex por aproximadamente 1 minuto e introduzidas na câmara de Neubauer e a contagem dos hemócitos foi realizada através de microscópio binocular Olympus CH30 em aumento de 10 vezes (SCORZONI *et al.*, 2015).

Quatro experimentos independentes foram realizados e os resultados foram expressos em número de hemócitos por mL.

4.4.7 Quantificação de melanização

Para a avaliação da melanização, grupos de 3 a 4 larvas foram tratadas com AG, como previamente descrito por VI e VT, e após 24 h do tratamento a melanização foi avaliada através de um sistema de pontuação, conforme proposto por Champion, Titball, Bates (2018).

Assim, o grau de melanização foi avaliado como na Figura 5, sendo 0- score de melanização 0, melanização completa, 1- score de melanização 1, manchas pretas na larva marrom, 2- score de melanização 2, menos de 3 manchas em formato de linha na larva bege, e 4- score de melanização 4, nenhuma melanização.

Figura 5 – Diferença da melanização das larvas de *G. mellonella*.



Fonte: adaptado de Champion, Titball, Bates (2018).

4.5 Análise estatística

O ensaio de toxicidade com o modelo *C. elegans* considerou no mínimo 11 e no máximo 15 larvas por grupo em cada ensaio, sendo o n amostral entre $33 < n < 45$ nos três experimentos independentes. Os resultados foram analisados através do software Graph Prism 5.0 utilizando o teste log-rank (Mantel- Cox) para comparação entre as curvas das amostras com o grupo controle.

Para análise estatística do ensaio de sobrevivência com *G. mellonella* os resultados foram submetidos ao teste log-rank (Mantel- Cox) e comparados ao grupo controle, o mesmo realizado no ensaio de toxicidade com *C. elegans* variando somente o n amostral, cada ensaio utilizou de 8 a 10 larvas por grupo, sendo $24 < n < 30$ larvas por tratamento nos três experimentos independentes.

As diferenças estatísticas nos ensaios de quantificação de hemócitos e quantificação de melanização foram avaliadas através do teste ANOVA com pós-teste de Dunnett. Para o ensaio de quantificação de hemócitos o n amostral considerou no mínimo 3 larvas e no máximo 4 larvas por grupo ($12 < n < 16$, em quatro ensaios independentes). O n amostral para o ensaio de quantificação de melanização levou em consideração no mínimo 4 e no máximo 6 larvas por grupo ($12 < n < 18$, em três experimentos independentes).

Diferenças estatísticas foram consideradas quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade

Inicialmente, a toxicidade de diferentes concentrações do AG em solução foi avaliada em três diferentes linhagens celulares, das quais duas representam a pele e uma, o fígado.

5.1.1 Linhagem celular HaCat

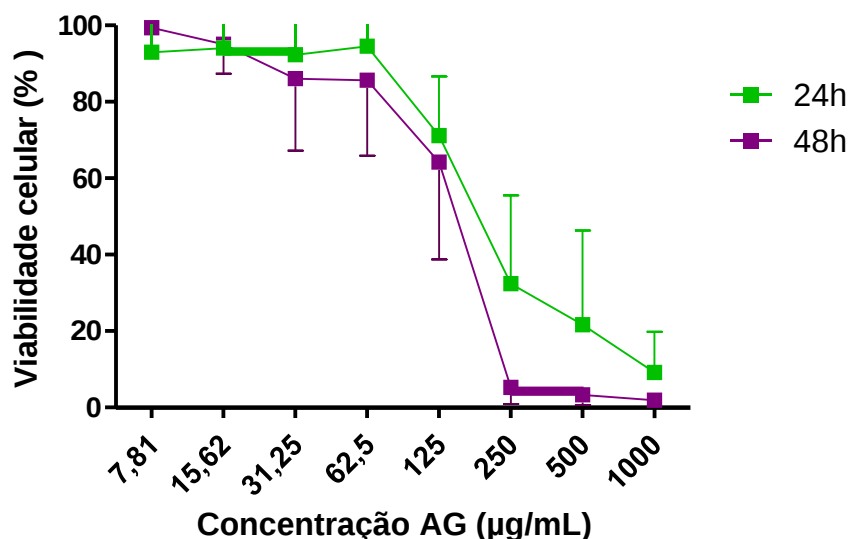
Conforme a Figura 6, em 24 h do tratamento das células, o AG não se mostrou tóxico para esta linhagem em concentrações que variaram de 7,81 a 62,5 µg/mL para as quais a porcentagem de células variou de 92,03 a 94,93%. Nota-se ainda um aumento da citotoxicidade de forma concentração-dependente do composto, sendo a viabilidade celular igual a 78,03% na concentração de 125 µg/mL e de 9,13% na concentração de 1.000 µg/mL. As concentrações intermediárias de 250 e 500 µg/mL apresentam viabilidade celular de 71,16 e 32,34%, respectivamente.

A partir dos cálculos de CI50 do AG para as células HaCat estima-se que a concentração seja de 182,5 µg/mL em 24 h de tratamento.

Quando o tempo de tratamento com AG aumentou para 48 h, observou-se um aumento da toxicidade sobre células HaCat comparada com à exposição por 24 h. Entre as concentrações menores que variaram de 7,81 a 125 µg/mL a viabilidade celular teve uma diminuição em relação ao tempo de 24 h, sendo de 99,37 e 64,23%, respectivamente. Nas concentrações de 250, 500 e 1.000 µg/mL de AG a viabilidade celular foi praticamente nula, tendo alcançado os valores de 5,17, 3,31 e 1,88%, respectivamente.

Quando analisou-se a CI50 do AG para esta linhagem celular em 48 h de tratamento com o composto encontrou-se o valor de 138,8 µg/mL.

Figura 6 – Viabilidade celular da linhagem queratinócitos humanos (HaCaT) exposta a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão.



5.1.2 Linhagem celular HDFa

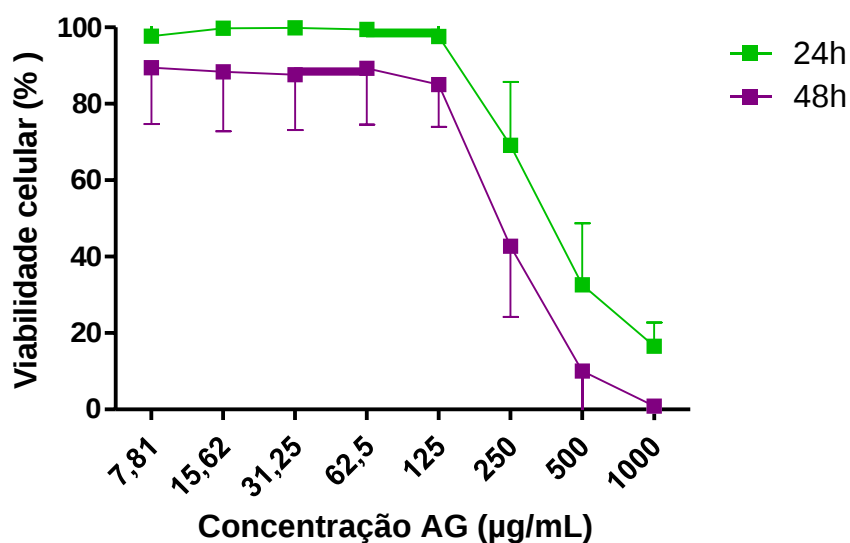
A partir da Figura 7 pode-se notar que a citotoxicidade causada pelo AG nas células HDFa em 24 h ocorre em concentrações superiores a 125 µg/mL. Nas concentrações entre 7,81 e 125 µg/mL a porcentagem de células viáveis foi 97,30 a 99,91%, respectivamente. Quando o AG encontra-se nas concentrações de 250, 500 e 1.000 µg/mL a viabilidade celular reduz para 69,13, 32,6 e 16,54%, respectivamente. Percebe-se, assim, a diminuição da viabilidade celular conforme a concentração do composto aumenta.

Através da análise do gráfico e cálculo da CI50 do AG para a linhagem de células HDFa pode-se dizer que esta concentração é de 303,4 µg/mL em 24 h de tratamento. Além disso, nota-se ser necessário uma concentração superior a 1.000 µg/mL para que haja 100% de morte celular.

Após 48 h do tratamento das células HDFa com o AG, pode-se constatar a diminuição da viabilidade celular em relação ao tempo de 24 h de tratamento. Para as concentrações que variaram consecutivamente de 7,81 a 125 µg/mL a viabilidade celular foi de 89,43, 88,39, 87,66, 89,33 e 85,02%. A partir de então, para as concentrações maiores de 125 µg/mL, nota-se uma queda progressiva na viabilidade celular. Para as concentrações de 250, 500 e 1.000 µg/mL de AG a porcentagem de

células vivas foi respectivamente 42,71, 10,04 e 0,85%. Através do cálculo da CI50 do AG no período de 48 h pode-se observar que a concentração que mata 50% das células é 247,0 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 7 – Viabilidade celular de fibroblastos de derme humana (HDFa) expostos a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão.



5.1.3 Linhagem celular HepG2

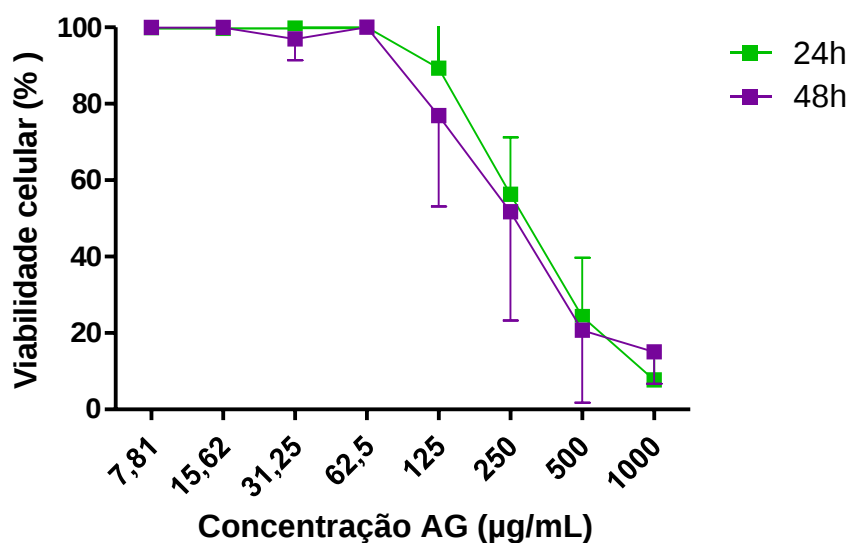
A viabilidade celular do AG nas células HepG2, Figura 8, se apresenta decrescente conforme a concentração de AG aumenta. Em menores concentrações de AG a porcentagem de células viáveis é de 99,89, 99,68, 99,79 e 97,60%, respectivamente. Somente a partir da concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ ocorre uma diminuição considerável da viabilidade celular. Nas concentrações de 125, 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$ a viabilidade celular é respectivamente 71,73, 43,96, 25,14 e 9,32% em 24 h de tratamento.

O cálculo da CI50 do AG para a linhagem celular HepG2 aponta para uma concentração de 265,1 $\mu\text{g/mL}$.

Em 48 h após o tratamento da células HepG2 com o AG observa-se um gráfico de queda da viabilidade celular semelhante ao período de 24 h. Nas menores concentrações de AG, 7,81 a 125 $\mu\text{g/mL}$, a viabilidade celular esteve entre 96,98 e 76,88 %, respectivamente, enquanto nas concentrações de 250, 500 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$

a viabilidade celular caiu para 51,67, 20,66 e 15,0%, consecutivamente. A CI50 do AG para as células HepG2 em 48 h após o tratamento é igual a 207,8 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 8 – Viabilidade celular da linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) exposta a diferentes concentrações de ácido gálico (AG) por 24 e 48 h. Dados expressos como média e desvio padrão.



5.2 Ensaio *in vivo* com *Caenorhabditis elegans*

Além da avaliação *in vitro* em células, larvas de *C. elegans* foram expostas ao AG em solução. Na Figura 9 estão representados os resultados de curva de sobrevivência das larvas. O tratamento com a menor concentração (3,905 $\mu\text{g/mL}$) de AG não apresentou toxicidade sobre as mesmas.

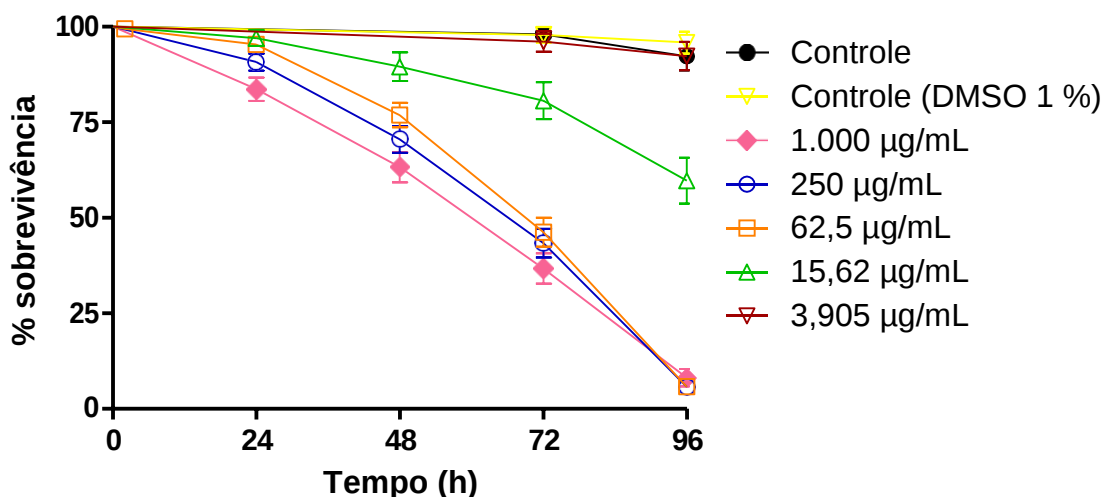
A concentração de 15,62 $\mu\text{g/mL}$ de AG demonstrou sobrevivência de 59,7% das larvas ao final do tempo de análise. As concentrações mais altas do AG ($\geq 62,5$ $\mu\text{g/mL}$) levaram a morte da maioria das larvas em 96 h, variando entre 5,78 a 8,2% a sobrevivência das larvas ao final do tempo de análise.

As curvas de sobrevivência das larvas expostas às concentrações $\geq 15,62$ $\mu\text{g/mL}$ de AG demonstraram diferenças estatísticas em relação à curva do grupo controle ($p < 0,0001$).

Através do cálculo da CL50 do AG para o nematoide chegou-se ao valor de 16,08 $\mu\text{g/mL}$ em 96 h de tratamento. Tanto o controle negativo quanto o controle

contendo 1% de DMSO não apresentaram toxicidade, tendo ao final do experimento a sobrevivência das larvas variando entre 92,32 e 95,84%.

Figura 9 – Porcentagem de sobrevivência de larvas de *C. elegans* após tratamento com ácido gálico (AG) por contato. Dados expressos com média e desvio padrão, n amostral igual a $11 < n < 15$ larvas por grupo em cada experimento.



5.4 Ensaios *in vivo* com *Galleria mellonella*

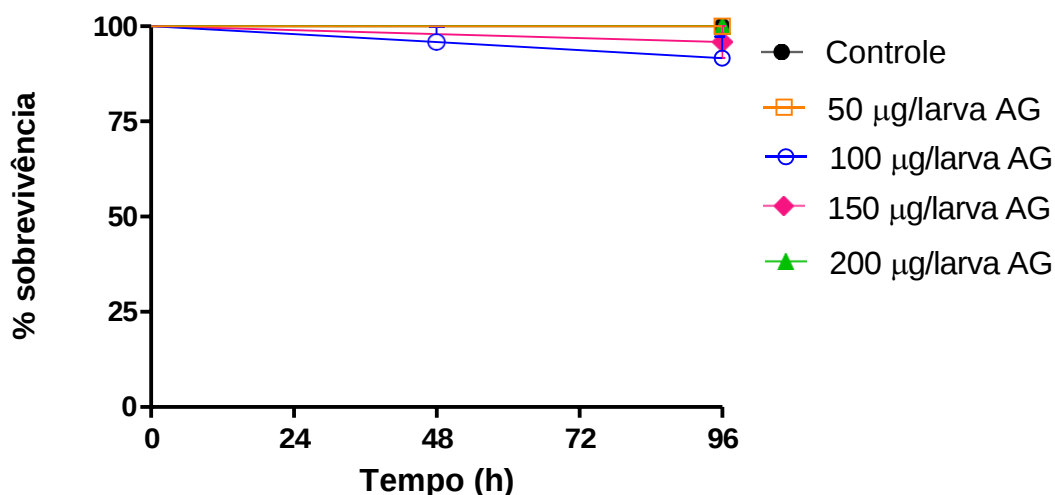
5.4.1 Ensaio de sobrevivência

A avaliação da sobrevivência das larvas de *G. mellonella* em ensaios de toxicidade de substâncias químicas é uma maneira de se calcular a DL50 no modelo alternativo (COATES *et al.*, 2019). Dessa forma, é possível encontrar o intervalo de dose do AG que pode ser utilizado sem causar nenhum efeito prejudicial nas larvas.

De acordo com a análise dos resultados apresentados na Figura 10, as larvas de *G. mellonella* quando tratadas com solução de AG por VI nas concentrações de 200 µg/larva (920 mg/Kg) e 50 µg/larva (261 mg/Kg) tiveram 100% de sobrevivência após 96 h do tratamento nos três ensaios independentes realizados. Enquanto os grupos 100 µg/larva (463 mg/Kg) e 150 µg/larva (695 mg/Kg) de AG apresentaram respectivamente 91,66 e 95,83% de sobrevivência das larvas em relação ao grupo controle.

Os grupos tratados com AG através da VI nas concentrações de 261 a 920 mg/Kg não apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle.

Figura 10 – Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* tratadas com solução de ácido gálico (AG) por via injetável (VI). Dados expressos como média e desvio padrão, com n amostral entre $8 < n < 10$ larvas por grupo em cada experimento.



Inicialmente a formulação proposta nesta pesquisa para a incorporação do AG foi um gel aquoso de hidroxietilcelulose 2%, seguindo o Formulário Nacional da Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2012b). As preparações de hidroxietilcelulose 2% não se mostraram capazes de solubilizar o AG nas concentrações propostas (0,5 a 2,0% de AG). Em decorrência disso, algumas estratégias foram adotadas para aumentar a solubilização do AG, como o aumento da temperatura e o aumento da disponibilidade de água da formulação. Entretanto, tais estratégias não foram eficazes e suficientes para solubilizar o AG.

Consideramos utilizar um gel transdérmico de pentravan® manipulado pela Farmácia Santa Paula do município de Araraquara. Após a incorporação do AG ao gel transdérmico houve a perda de estabilidade do sistema que liquefez dias após a adição do AG.

Dessa forma, foi proposta como formulação uma emulsão óleo/água desenvolvida pela doutoranda Lígia de Souza Fernandes do Departamento de Fármacos e Medicamentos. Esta formulação se mostrou eficaz na solubilização do AG em todas as concentrações propostas e foi utilizada para os ensaios por VT em *G. mellonella*.

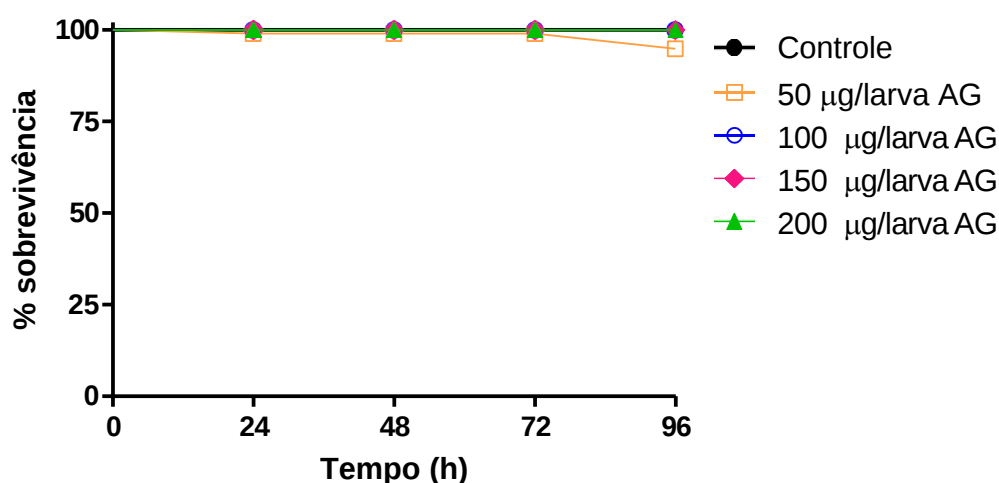
Quando as larvas foram tratadas com AG através da VT, Figura 11, observou-se 100% de sobrevivência nas concentrações de 100 a 200 µg/larva (463 a 920

mg/Kg) do composto nos três ensaios independentes realizados. Ao final dos experimentos a porcentagem de sobrevivência das larvas na concentração de 50 µg/larva (261 mg/Kg) de AG foi de 94,83%.

A análise estatística demonstra não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com AG por VT em relação ao grupo controle.

Nas concentrações estudadas do AG não foi tóxico para as larvas de *G. mellonella* e conseqüentemente, não foi possível determinar a dose letal de 50% das larvas de *G. mellonella*. Pode-se dizer que a DL 50 do AG para este modelo é superior a 200 µg/larva (920 mg/Kg) para as vias injetável e tópica.

Figura 11 – Sobrevivência das larvas de *G. mellonella* tratadas com ácido gálico (AG) em sistema emulsionado por VT. Dados expressos como média e desvio padrão, com n amostral entre $8 < n < 10$ larvas por grupo em cada experimento.



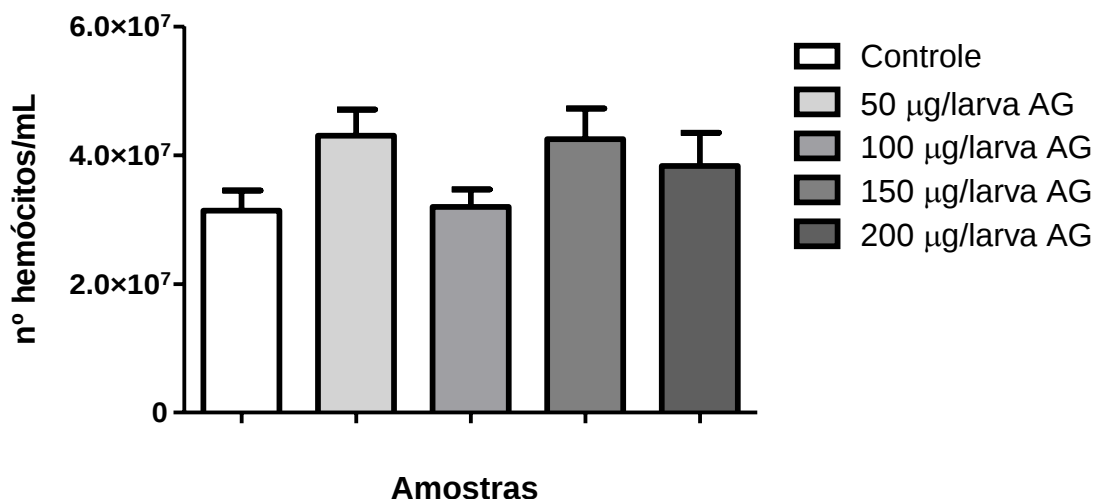
5.4.2 Quantificação de hemócitos

No tratamento das larvas através da VI, o número de hemócitos não apresentou discrepância estatística entre as amostras de AG e o grupo controle, sendo que o número de hemócitos variaram de aproximadamente $3,13 \times 10^7$ a $4,3 \times 10^7$ hemócitos/mL nos grupos controle e 50 µg/larva (261 mg/Kg) de AG, respectivamente, conforme a Figura 12. O número de hemócitos nos grupos 100, 150 e 200 µg/larva (463, 695 e 920 mg/Kg) foram, respectivamente, $3,19 \times 10^7$, $4,25 \times 10^7$, e $3,83 \times 10^7$ hemócitos/mL.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos tratados com AG por VI e o grupo controle, dessa forma o valor de p

demonstrou ser maior que 0,05 no ensaio de quantificação de hemócitos quando as larvas foram tratadas com 50 a 200 µg/larva (261 a 920 mg/Kg).

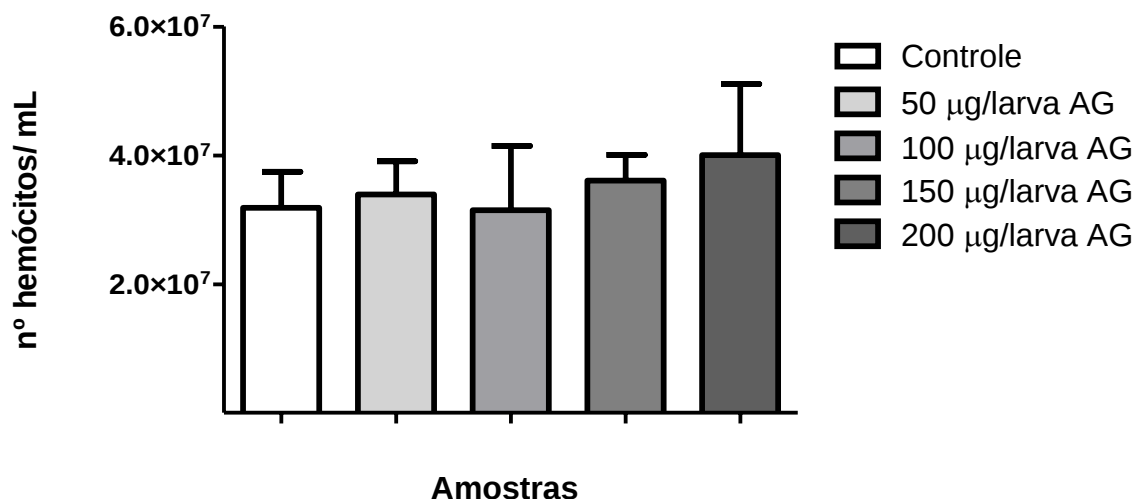
Figura 12 – Quantificação de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após tratamentos com ácido gálico (AG) por VI. Dados expressos como média e desvio padrão.



A partir do tratamento das larvas por VT observou-se variação no número de hemócitos de $3,18 \times 10^7$ a $4,0 \times 10^7$ hemócitos/mL nos grupos controle e 200 µg/larva (920 mg/Kg) de AG, respectivamente. Baseado na Figura 13, verifica-se que não houve diferenças estatísticas entre o grupo controle e os grupos tratados com AG, não implicando em aumento do número de hemócitos em decorrência do tratamento com a substância. Para os grupos tratados com 50 a 150 µg/larva (463 a 920 mg/Kg) de AG, o número de hemócitos foi de $3,39 \times 10^7$, $3,14 \times 10^7$ e $3,60 \times 10^7$ hemócitos/mL, respectivamente.

Estatisticamente não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos tratados com concentrações de 50 a 200 µg/larva (261 a 920 mg/Kg) de AG por VT, sendo $p > 0,05$.

Figura 13 – Quantificação de hemócitos das larvas de *G. mellonella* após tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT). Dados expressos como média e desvio padrão.



5.4.3 Quantificação de melanização

Outro parâmetro observado no presente estudo foi a melanização das larvas, a qual foi analisada de forma semiquantitativa utilizando-se score. De forma geral, quanto maior o score, menor o grau de melanização. Conforme a Figura 14, pode-se observar aumento da intensidade de melanização das larvas à medida que a concentração do AG aumentou após 24 h do tratamento por VI. O grupo controle não apresentou nenhum grau de melanização, os grupos 50, 100, 150 e 200 µg/larva (261, 463, 695 e 920 mg/Kg) de AG apresentaram, nessa ordem, 33,3, 66,6, 100 e 100% de larvas melanizadas.

Figura 14 – Diferença de melanização das larvas de *G. mellonella* após 24h do tratamento com ácido gálico (AG) por via injetável (VI).

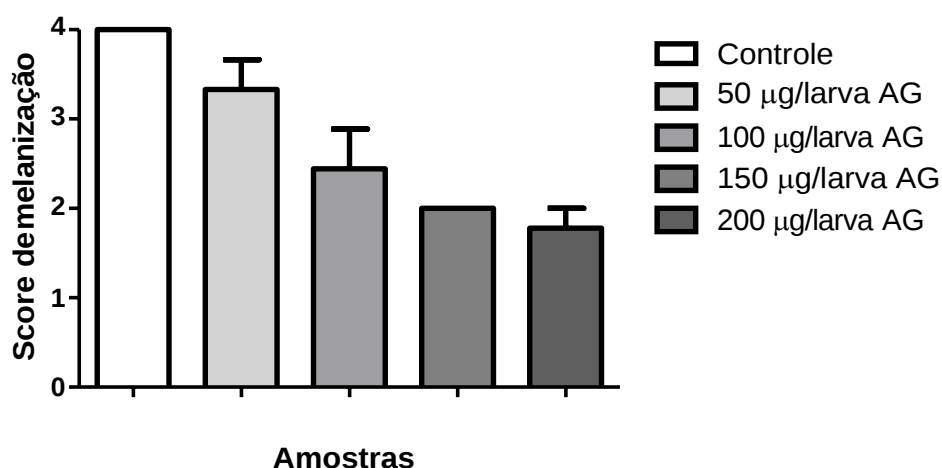


1- Controle; 2- Grupo 50 µg/larva 3- Grupo 100 µg/larva; 4- Grupo 150 µg/larva; 5- Grupo 200 µg/larva.

A partir da Figura 15 pode-se verificar o score de melanização das larvas quando tratadas por VI. O grupo controle apresentou score 4 de melanização, enquanto o grupo 50 µg/larva (261 mg/Kg) de AG apontou um score de 3,33. Já o score dos grupos 100, 150 e 200 µg/larva (463, 695 e 920 mg/Kg) de AG apresentaram valores de 2,44, 2,0 e 1,77, respectivamente. Os grupos 100 e 200 µg/larva (463 e 920 mg/Kg) tiveram cada um uma larva totalmente melanizada, ou seja, com score 0.

A análise estatística dos dados de melanização demonstrou haver diferenças significantes nos grupos 100, 150 e 200 µg/larva (463, 695 e 920 mg/Kg) de AG em relação ao controle ($p < 0,05$).

Figura 15 – Score de melanização das larvas de *G. mellonella* após o tratamento com ácido gálico (AG) por via injetável (VI). Dados expressos como média e desvio padrão.



Na Figura 16 pode-se observar a diferença de melanização das larvas após 24 h do tratamento com AG. Nos grupos controle, 50 e 100 µg/larva (261 e 463 mg/Kg, respectivamente) de AG a porcentagem de melanização das larvas foi de 0, 8,33 e 25%, respectivamente. Os grupos 150 e 200 µg/larva (695 e 920 mg/Kg) de AG tiveram 41,66 e 83,33% das larvas apresentação melanização. Durante os três experimentos independentes não houve nenhuma larva totalmente melanizada, ou seja, com score 0.

Figura 16 – Diferença de melanização das larvas de *G. mellonella* após 24h do tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT).

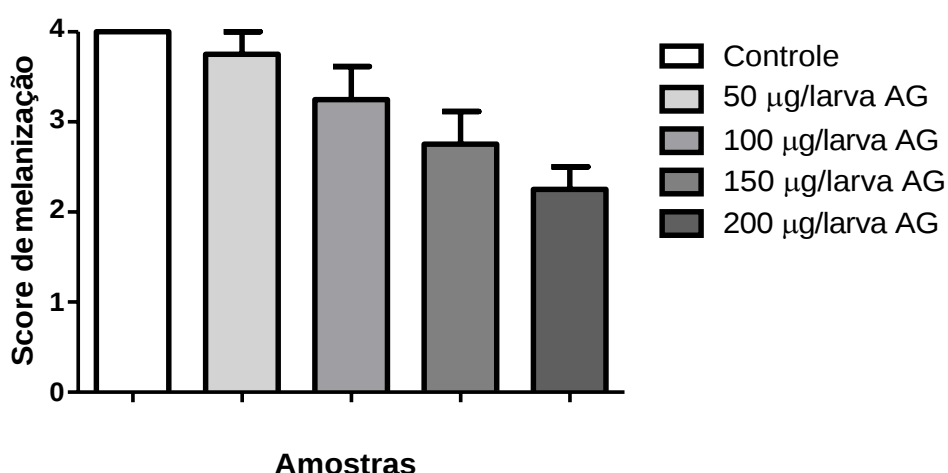


6- Controle; 7- Grupo 50 µg/larva; 8- Grupo 100 µg/larva; 9- Grupo 150 µg/larva; 10- Grupo 200 µg/larva.

Através da análise do score de melanização das larvas quando tratadas por VT, Figura 17, pode-se classificar a intensidade de melanização dos grupos tratados como sendo os seguintes: grupo controle- score 4; grupo 50 µg/larva AG- score 3,75; grupo 100 µg/larva AG- score 3,25; grupo 150 µg/larva AG- score 2,75; grupo 200 µg/larva AG- score 2,25.

A análise estatística demonstrou diferenças significantes nos grupos tratados com 150 e 200 µg/larva (695 e 920 mg/Kg, respectivamente) de AG em relação ao grupo controle, apresentaram consequentemente $p < 0,05$.

Figura 17 – Score de melanização das larvas de *G. mellonella* após o tratamento com ácido gálico (AG) por via tópica (VT). Dados expressos em média e desvio padrão.



6 DISCUSSÃO

Historicamente, o visual do corpo atlético se tornou parte da moda após a Primeira Guerra Mundial pela primeira vez. Os padrões de beleza instituídos pela estilista francesa Coco Channel, constituído por olhos pretos, batom vermelho, unhas vermelhas e pele bronzeada se tornaram populares como contraste da então dominante pele pálida da população americana. O uso globalizado de cosméticos ocorreu ao final da Segunda Guerra Mundial, inicialmente a partir da televisão em cores que difundiu a ideia da “beleza americana” com a figura das estrelas de cinema Grace Kelly, Marilyn Monroe e Audrey Hepburn que faziam suas aparições utilizando maquiagens (GONZÁLEZ-MINERO; BRAVO-DÍAZ, 2018).

Atualmente com o avanço das tecnologias de cosméticos e a crescente disponibilidade de produtos, grande parte da população incluiu em sua rotina diária o uso de cosméticos com o objetivo de modificar e melhorar a saúde e a estética da pele (WITKOWSKI; PARISH, 2001). Em razão disso, a exposição se tornou maior a diferentes substâncias químicas que constituem esses produtos, podendo ser absorvidas através da boca, nariz, olhos e da própria pele. Devido a sua fácil absorção, o governo dos Estados Unidos e União Europeia tomaram algumas medidas de avaliação da segurança dos ingredientes utilizados em cosméticos (ALNUQAYDAN; SANDERSON, 2016). Dessa maneira, com intuito de garantir a segurança ao consumidor, a ANVISA em 2012 publicou um guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos no Brasil (ANVISA, 2012a).

Com intuito de se garantir a segurança de cosméticos e devido ao histórico de toxicidade apresentado por alguns deles, surgiu a necessidade de se buscar ativos para cosméticos a partir de extratos vegetais que possuam eficácia comprovada para a saúde da pele (GONZÁLEZ-MINERO; BRAVO-DÍAZ, 2018). Nesse sentido, a partir de pesquisas científicas de novos ativos para cosméticos, destacaram-se os extratos vegetais que possuem em sua composição AG (KOCH *et al.*, 2019).

O AG é encontrado em maior proporção em extratos vegetais de flores e frutos. Suas propriedades benéficas à pele humana são diversas e comprovadas cientificamente, dentre elas estão a capacidade de diminuir o estresse oxidativo ocasionado pela exposição à luz UV, de inibir a melanogênese, de melhorar os quadros de dermatite atópica e de atenuar os sinais de envelhecimento cutâneo

(KIM *et al.*, 2006; SU *et al.*, 2013; ALONSO *et al.*, 2016; NAM *et al.*, 2017; TSANG *et al.*, 2016; SILVA *et al.*, 2017; CHAIKUL *et al.*, 2019).

Devido às propriedades terapêuticas do AG este estudo pretendeu avaliar a sua toxicidade em métodos alternativos, dentre os quais então presentes ensaios *in vitro* e *in vivo*.

As metodologias alternativas contribuem para a substituição do uso de animais em larga escala nos ensaios de toxicidade convencionais. As variações interespecies, como as diferenças anatômicas, fisiológicas e bioquímicas são uma barreira à extrapolação dos resultados para humanos. Entretanto, o uso de métodos alternativos é mais bem aceito em ensaios preliminares de toxicidade de substâncias químicas devido às questões éticas. Dessa maneira, para se obter dados robustos que possam prever a toxicidade de substâncias ao ser humano através dos métodos alternativos, é necessário integrar os resultados de diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* para se chegar a uma resposta próxima da realidade (HAMM *et al.*, 2017; ERHIRHIE; IHEKWEREME; IIODIGWE, 2018).

Na Tabela 2 abaixo estão descritos os dados da dose letal para 50% dos animais (DL50), concentração letal mediana (CL50) e concentração inibitória mediana (CI50) para diferentes modelos, bem como para diferentes linhagens de células humanas.

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

Modelo	Tipo de teste	Via de administração	Dose	Referência
Rato	DL50	Subcutânea	5.000 mg/Kg	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 17 (497), 1969.
Camundongo	DL50	Intraperitoneal	4.300 mg/Kg	Farmacology and Toxicology, 64(247),1989.
Camundongo	DL50	Intravenoso	320 mg/Kg	U.S. Army Armament Research & Development Command, Chemical Systems Laboratory, NIOSH Exchange Chemicals NX#02597
Coelho	DL50	Oral	5.000 mg/Kg	American Journal of Veterinary Research.,23(1264), 1962.
<i>Danio rerio</i>	CL50	Tópica	304 µg/mL	Biological and Pharmaceutical Bulletin, 42 (12),2019.
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CL50	Tópica	16,08 µg/mL	Própria.
<i>Galleria mellonella</i>	DL50	Injetável	> 920 mg/Kg	Própria.
<i>Galleria mellonella</i>	DL50	Tópica	> 920 mg/Kg	Própria.
Células HaCat	CI50	Meio de cultura	182,5 ¹ ; 138,8 ² µg/mL	Própria.
Células HDFa	CI50	Meio de cultura	303,4 ¹ ; 247,0 ² µg/mL	Própria.
Células HepG2	CI50	Meio de cultura	265,1 ¹ ; 207,8 ² µg/mL	Própria.

¹ CI50 para tratamento de 24 h com AG.

² CI50 para tratamento de 48 h com AG.

A toxicidade do AG foi avaliada pelo U.S. National Library of Medicine em três diferentes espécies de animais através da DL50, sendo utilizados o rato, o camundongo e o coelho em diferentes vias de administração como modelos. Para a via subcutânea de ratos, por exemplo, a DL50 é de 5.000 mg/Kg (SINGLETON; KRATZER, 1969). Segundo dados obtidos por Dollahite, Pigeon, Camp (1962), a administração oral do AG em coelhos resultou em DL50 igual a 5.000 mg/Kg, o mesmo resultado observado em ratos quando o AG foi administrado por via subcutânea.

Sendo assim, observa-se que é necessária uma grande quantidade de AG para que efeitos nocivos aos modelos estudados através das vias subcutânea, intraperitoneal e oral sejam constatados. Quando se trata da via intravenosa, a quantidade de AG necessária para levar à morte 50% dos camundongos é cerca de 15 vezes menor que aquela administrada através de outras vias estudadas, como indica a Tabela 2 acima.

Um estudo recente de Variya *et al.* (2019) avaliou a toxicidade subaguda de dose oral repetida de AG durante 28 dias em camundongos albinos chegando à conclusão que a dose letal para 50% dos animais em decorrência do AG é superior a 2.000 mg/Kg, sendo que a ingestão de 900 mg/Kg/dia não gerou nenhuma alteração hematológica, morfológica ou histopatológica neste modelo.

Outra pesquisa realizada por Van Der Heijder, Janssen, Strik (1986) relatou que após a ingestão de galatos por ratos ocorre a metabolização desses compostos pelo fígado e a excreção acontece primordialmente através da urina. Não foram observadas pelo grupo de pesquisadores nenhuma constatação de toxicidade do composto mesmo em doses elevadas, concluindo que o AG pode ser utilizado como antioxidante em alimentos sozinho ou acompanhado de outros antioxidantes. Além disso, os pesquisadores apontam que a administração oral de AG nas doses de 117 a 5.000 mg/Kg em porcos e cachorros não gera efeitos tóxicos nesses mamíferos.

Em substituição aos modelos que utilizam animais mamíferos para ensaios de toxicidade estão sendo utilizados modelos celulares para a predição de danos ao ser humano. Tais modelos têm avançado em conjunto com a tecnologia e atualmente existem metodologias robustas de pele reconstituída a partir de células humanas. A utilização de linhagens celulares é uma alternativa ao uso de animais mamíferos em experimentação de substâncias, diminuindo assim o número de animais presentes em testes preliminares (NIEHUES *et al.*, 2018).

Segundo Pace e Bruce (2015), dentre as metodologias existentes para a quantificação da viabilidade celular, a resazurina é uma excelente opção para ensaios colorimétricos de citotoxicidade de substâncias por detectar a atividade metabólica celular através da reação de oxirredução que altera a coloração do meio de cultura, de roxo intenso para rosa, evidenciando a redução de substâncias produzidas pelo metabolismo celular. Assim é possível quantificar a viabilidade celular por meio da intensidade da coloração do meio de cultura.

Nesta pesquisa as linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCat) e de fibroblastos de derme humana (HDFa) foram selecionadas para avaliação da citotoxicidade do AG por se tratarem de células que constituem a pele humana, sendo assim, é importante detalhar os efeitos dessa substância que possam comprometer a integridade celular dessas linhagens. A terceira escolha para a pesquisa foram as células de hepatocarcinoma humano (HepG2). Essas células estão presentes no fígado e sua escolha se justifica através da análise do efeito do AG nestas células que participam do metabolismo de substâncias. Dessa forma, foi considerado importante avaliar a citotoxicidade nestas células caso o AG seja absorvido pela pele humana e chegue ao sistema circulatório.

A primeira linhagem de células escolhidas foram os queratinócitos humanos (HaCat). Estas células são imortalizadas, ou seja, possuem capacidade proliferativa ilimitada, são fáceis de obter e de fácil manipulação quando comparadas à outras células. Por se tratar das células mais abundantes da epiderme humana, cerca de 95%, a utilização de queratinócitos humanos em pesquisas científicas de novos cosméticos é ampla (SIMPSON; PATEL; GRREN, 2011; ALNUQAYDAN; SANDERSON, 2016; ZI *et al.*, 2018).

A citotoxicidade do AG nas células HaCat evidenciou um aumento da toxicidade da substância em decorrência do aumento do tempo de tratamento, em 24 h após o tratamento com o AG a CI50 foi de 182,5 µg/mL comparados a 138,8 µg/mL em 48 h. Pode-se ainda constatar que a toxicidade do AG às células HaCat é concentração-dependente.

Os resultados deste trabalho estão em concordância com estudo de Yang *et al.* (2016) que avaliou os efeitos do AG em queratinócitos humanos da linhagem celular HaCat utilizando o revelador 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT). Os autores concluíram que a substância alterava a viabilidade celular em concentrações acima de 200 µg/mL, enquanto que em

menores concentrações avaliadas, 10, 20 ou 50 µg/mL, o AG não alterou a porcentagem de células vivas após 24 h do tratamento.

Em busca por outros artigos que demonstrassem a citotoxicidade do AG às células HaCat realizada nas bases de dados Web of Science, Scopus, Science Direct e NCBI, não foram encontrados outros estudos além da pesquisa realizada por Sakaguchi *et al.* em 1999. Tal estudo avaliou a citotoxicidade do AG em queratinócitos humanos em condições que divergem das apresentadas no presente trabalho, sendo assim, não foi possível uma análise comparativa dos resultados.

Pesquisas atuais têm como foco a avaliação das propriedades tóxicas de extratos vegetais que possuem em sua composição AG, por exemplo, Varma *et al.* (2016) avaliaram a toxicidade do extrato de Triphala, medicamento composto de três diferentes plantas muito utilizadas na medicina Ayurveda que possui como principais ativos o ácido gálico, o ácido elágico e o ácido chebulínico. A atividade do extrato de Triphala se deve à presença desses metabólitos secundários, sendo os ácidos fenólicos (incluindo o ácido gálico) encontrados em proporções de aproximadamente $34,6 \pm 3\%$ do extrato vegetal. Segundo este estudo, a CI₅₀ do extrato de Triphala para as células HaCat é de $239,16 \pm 4,3$ µg/mL.

Em relação aos estudos de Yang *et al.* (2016) e Varma *et al.* (2016), os resultados encontrados na presente pesquisa se aproximam dos demonstrados por estes estudos anteriores. O fato de se ter utilizado reveladores diferentes nos ensaios colorimétricos é uma suposição para os resultados deste estudo serem próximos aos dados expostos por Yang *et al.* (2016).

A segunda linhagem analisada foi a linhagem de células HDFa que juntamente com as células de queratinócitos humanos são utilizadas em pesquisas científicas para a investigação dos efeitos antienvhecimento de cosméticos contendo princípios ativos de origem vegetal, bem como para avaliar efeitos tóxicos de produtos cosméticos (ALNUQAYDAN; SANDERSON, 2016; GASPARRINI *et al.*, 2017; MUSSARD *et al.*, 2020).

Através de pesquisas realizadas por Atit, Thulabandu, Chen (2017) sabe-se hoje que os fibroblastos de pele humana são as células responsáveis pela produção da matriz extracelular que compõe o tecido conjuntivo da pele e desempenham importante papel durante o processo de cicatrização. Estudos indicam que os fibroblastos são células essenciais para a arquitetura da pele, danos ocasionados a estas células podem comprometer sua estrutura e função. Isso porque estas células

são responsáveis pela produção de colágeno e com o decorrer dos anos e o envelhecimento cutâneo os fibroblastos diminuem esta produção (LOVELL *et al.*, 1987; MUSSARD *et al.*, 2020; SOLÉ-BOLDO *et al.*, 2020).

A presente pesquisa demonstrou que após 24 h do tratamento das células HDFa tratadas com 250 µg/mL de AG apresentaram viabilidade celular de 69,1%. Através do cálculo da concentração inibitória de 50% das células (CI50) encontrou-se os seguintes valores: 303,4 e 247 µg/mL para 24 e 48 h, respectivamente. De forma similar, um estudo prévio demonstrou que em concentrações de 200 µg/mL de AG em 24 h após o tratamento a viabilidade celular da linhagem HDF foi de aproximadamente 70%, enquanto que em menores concentrações estudadas a viabilidade celular foi praticamente 100% (KHORSANDI *et al.*, 2020). Estudos que avaliaram concentrações acima de 200 µg/mL de AG nestas células não foram encontrados.

A última linhagem de células foi a linhagem HepG2. Trata-se de células do fígado imortalizadas que são derivadas de carcinoma hepatocelular humano. Estas células são utilizadas em pesquisa científica para avaliar o metabolismo de substância, bem como para avaliar possíveis riscos de hepatotoxicidade, isso porque a HepG2 permite a avaliação de mecanismos de toxicidade no fígado, dentre os quais estão a avaliação do metabolismo de fase I e II de medicamentos, acúmulo de lipídeos, síntese de ureia e estoque de glicogênio (DONATO; TOLOSA; GÓMEZ-LECHÓN, 2014). Estas células são de fácil manuseio e vida útil quase ilimitada, além disso, é a linhagem mais utilizada em pesquisas de toxicidade de fármacos e substâncias químicas (DONATO; TOLOSA; GÓMEZ-LECHÓN, 2014).

Silva *et al.* (2017) avaliaram a citotoxicidade de ésteres semissintéticos derivados de AG, dentre eles o pentil, hexil, heptil e o octil galato, na linhagem celular HepG2 e concluíram que a atividade citotóxica (CI50) dos respectivos ésteres foi observada nas concentrações de 200, 145, 42 e 30 µg/mL. Portanto, observou-se que a citotoxicidade dos galatos à HepG2 é proporcional ao tamanho da cadeia carbônica substituinte.

Outro estudo conduzido por Tanaka *et al.* (2020) constatou a capacidade do AG de inibir o acúmulo de lipídios nas células HepG2 através da via Proteína Quinase Ativada por Monofosfato de Adenosina (AMPK), mecanismo de hepatotoxicidade. Neste estudo a viabilidade celular foi quantificada após 24 h do tratamento com AG nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL e os autores

concluíram que o AG não apresenta citotoxicidade à linhagem de células de hepatocarcinoma humano nas concentrações estudadas.

Conforme a Tabela 2, concentrações de 265, 1 µg/mL de AG levam 50% das células à morte em 24 h de tratamento, conclui-se que em concentrações acima de 200 µg/mL os efeitos benéficos do AG são sobrepostos pela toxicidade gerada pela exposição. Em 48 h de tratamento, a CI50 do AG é de 207,8 µg/mL e independentemente do tempo, nenhum efeito tóxico do AG foi observado neste trabalho quando as células foram tratadas com 7,81 a 62,5 µg/mL de AG. Através dos resultados demonstrados por Silva *et al.* (2017) pode-se associar a menor toxicidade do AG em células HepG2 comparado aos seus galatos, devido ao substituinte ser um grupo hidroxil e não uma cadeia carbônica.

Ao analisar os resultados de CI50 apresentados por estas três linhagens celulares aqui estudadas, nota-se que as células HDFa mostraram menor sensibilidade ao AG, seguida das células HepG2, e por último as mais sensíveis ao composto foram as células HaCat.

Dentre as metodologias alternativas *in vivo* aqui analisadas encontram-se o *Caenorhabditis elegans* e a *Galleria mellonella*.

Caenorhabditis elegans foi inserido no presente trabalho como estratégia inovadora para o teste de constituintes de cosméticos, uma vez que as larvas apresentam uma cutícula na camada mais externa de seu corpo constituída principalmente de colágeno e seus derivados, além de glicoproteínas, o que pode significar uma similaridade a pele humana (CORSI; WIGHTMAN; CHALFIE, 2015). Além disso, não foram encontrados dados na literatura que avaliassem a toxicidade do ácido gálico neste modelo, tendo sido encontrados somente estudos que demonstraram a capacidade antifúngica desta substância em larvas de *C. elegans* infectadas com diferentes fungos.

A avaliação da toxicidade de substâncias em *C. elegans* é feita através de diferentes perspectivas, sendo uma delas a avaliação da concentração letal de 50% das larvas (CL50). O nematoide é utilizado em ensaios iniciais de toxicidade de substâncias por ter correlação com resultados de CL50 de algumas substâncias verificados em mamíferos e por necessitar de menores custos quando comparados aos ensaios de toxicidade com roedores (BOYD *et al.*, 2016).

Segundo Hunt (2016), o método animal alternativo *C. elegans* difere dos modelos celulares por possuir sistemas neurais, motores, digestivo, reprodutivo,

endócrino e respostas sensoriais que o tornam um modelo completo para a predição de toxicidade em mamíferos. Além disso, a utilização deste modelo permite que várias concentrações em diferentes tempos de exposição de substâncias ocorram simultaneamente, permitindo assim testes em larga escala e tempo reduzido.

Boyd *et al.* (2016) analisaram a correlação entre os resultados de ensaios de toxicidade em fase I e II de substâncias químicas no modelo *C. elegans* e as metodologias que utilizam os modelos zebrafish, ratos e coelhos. O grupo concluiu que a inclusão de *C. elegans* em estudos de toxicidade acrescenta maior confiabilidade e segurança aos estudos que tem como objetivo prever efeitos tóxicos em humanos. Dessa forma, a inclusão de *C. elegans* como metodologia para avaliação da toxicidade do AG é importante por gerar dados que possam ser correlacionados com os dados de outras metodologias de mamíferos já exploradas.

Singulani *et al.* (2017) analisaram a atividade antifúngica do AG e seus galatos, dentre eles o hexil galato, o octil galato e o dodecil galato, em nematoides *C. elegans* infectados com *Candida albicans*. Os resultados apresentados pelo grupo sugerem que a baixa eficácia antifúngica dos galatos em concentrações altas pode estar relacionada à sua toxicidade no modelo animal alternativo *C. elegans*.

A investigação da atividade antifúngica de extratos vegetais em modelos *in vivo* utilizando o *C. elegans* foi conduzida por Pedroso *et al.* (2019). Neste estudo, diversos extratos vegetais em diferentes concentrações foram submetidos a testes de eficácia contra biofilmes e fungos isolados de *Candida spp.* O AG foi a substância mais eficaz, além disso, quando *C. elegans* foi infectado com *Candida krusei* e tratado com 62,5, 125 e 250 µg/mL de AG todos os nematoides morreram em quatro dias de estudo o que indica toxicidade ocasionada ao modelo devido às altas concentrações de AG utilizadas.

Ambos estudos demonstram a eficácia antifúngica do AG e seus galatos como droga antifúngica e a toxicidade da substância no modelo animal alternativo *C. elegans* foi observada em concentrações acima de 25 µg/mL. O mesmo foi verificado no ensaio de toxicidade do AG realizado neste estudo, os cálculos apontam para uma concentração letal de 50% dos nematoides de 16,08 µg/mL. Assim como Pedroso *et al.* (2019) o grupo controle sem tratamento com AG não constatou mortes em quatro dias de observação e os grupos 62,5, 125 e 250 µg/mL levaram a 100% de morte das larvas ao final do experimento.

O zebrafish, *Danio rerio*, é uma metodologia alternativa aos mamíferos reconhecida pela OECD em estágio embrionário, em adição *D. rerio* e *C. elegans* compartilham a mesma metodologia para ensaios de toxicidade (BOYD *et al.*, 2016). Sendo assim, a comparação dos resultados de CL50 entre estes métodos foi analisada.

Danio rerio é um peixe de água doce muito utilizado em pesquisas de desenvolvimento de vertebrados e é um modelo adequado para pesquisas genéticas, de biologia do desenvolvimento, toxicologia e farmacologia. Para os estudos de toxicologia, Hill *et al.* (2005) apontam que o zebrafish permite ensaios detalhados nesta área sendo possível elucidar mecanismos de toxicidade, avaliar a relação de dose-resposta de toxicantes e determinar a toxicodinâmica de substância químicas.

O grupo de pesquisadores da Singulani *et al.* (2017) analisou a toxicidade do AG no modelo animal alternativos zebrafish, concluindo que o AG não foi tóxico ao peixe nas concentrações entre 1 e 120 µg/mL. Harishkumar *et al.* (2019) chegaram à conclusão de que a CL50 do AG para o peixe é de 304 µg/mL.

Quando se compara os resultados de CL50 do AG para os métodos alternativos *C. elegans* e *D. rerio* é possível observar que o AG foi aproximadamente 19 vezes mais tóxico para o nematoide do que para o peixe, evidenciando que o *C. elegans* apresentou maior sensibilidade à substância. A literatura não aponta correlações fisiológicas e bioquímicas entre ambas metodologias que possam ocasionar tamanha diferença de toxicidade do AG, entretanto os animais alternativos são metodologias comprovadas para se avaliar a toxicidade de substâncias químicas, bem como preditivas de toxicidade aos mamíferos, como apontou Boyd *et al.* (2016).

A segunda metodologia *in vivo* analisada no presente estudo foi *G. mellonella* em estágio larval. *G. mellonella* é uma espécie de insetos lepidópteros popularmente conhecida como traça do favo de mel ou grande traça da cera. Seu uso para fins científicos, sobretudo na pesquisa de infecções fúngicas e bacterianas, alcançou nos últimos anos um grande crescimento no número de publicações devido às semelhanças que seu sistema imune possui com o de mamíferos (SINGULANI *et al.*, 2017). Segundo estudos de Allegra *et al.* (2018), *G. mellonella* pode ser utilizada como metodologia para identificação de substâncias tóxicas e não-tóxicas.

Normalmente, a literatura científica reporta variação no número de

hemócitos em resposta a patógenos (SILVA *et al.*, 2018). É importante, porém, que constituintes de cosméticos não gerem uma perturbação do sistema imune que provoque resposta inflamatória e toxicidade (ALI *et al.*, 2016).

No presente estudo buscou-se comparar as respostas aos ensaios descritos por Coates *et al.* (2019), dentre eles estão a sobrevivência, alteração do número de hemócitos e a melanização, em duas vias de administração, a via injetável (VI) e a via tópica (VT) a fim de se avaliar a viabilidade da *G. mellonella* ser utilizada em ensaios de toxicidade de cosméticos.

O tratamento das larvas de *G. mellonella* com AG através da VI não demonstrou discrepâncias estatísticas no ensaio de sobrevivência dos grupos tratados em relação ao grupo controle quando foram administradas concentrações que variaram de 50 a 200 µg/larva de AG (261 a 920 mg/Kg). Coates *et al.* (2019) concluíram que há redução da sobrevivência (65%) das larvas quando foram administradas concentrações superiores a 242 µg/Kg ($> 75\text{ng/larva}$) de ácido okadaico por via injetável, demonstrando que é possível avaliar a toxicidade de substâncias através das larvas de *G. mellonella* através da VI.

A análise estatística do ensaio de quantificação de hemócitos por VI não demonstrou discrepâncias entre o número de hemócitos dos grupos tratados com AG ($3,19$ a $4,3 \times 10^7$ hemócitos/mL) e o grupo controle ($3,13 \times 10^7$ hemócitos/mL), ou seja, não houve alteração do número de hemócitos em decorrência do tratamento com AG nas concentrações propostas.

Os dados obtidos no ensaio de quantificação da melanização por VI através do sistema de score de melanização proposto por Champion, Titball, Bates (2018), demonstraram diferenças estatísticas dos grupos 100, 150 e 200 µg/larva (463, 695 e 920 mg/Kg, respectivamente) em relação ao grupo controle. A análise visual da melanização nesses grupos evidencia um padrão de melanização em formato de linha no dorso das larvas, sem que fossem observadas alterações em sua coloração de amarelo para marrom/preto. Nossas análises de hemócitos e melanização nos permite sugerir que o AG foi capaz de ativar a resposta humoral das larvas de *G. mellonella* mas não sua resposta celular.

Para a realização dos ensaios por VT foi importante encontrar uma formulação adequada para a presente pesquisa que promovesse a completa homogeneização do AG em *G. mellonella*. As propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do AG estão associadas aos grupos hidroxil (- OH) ligados ao anel

aromático, o que o caracteriza como uma substância de baixa solubilidade em água e alta solubilidade em compostos orgânicos (PubChem, 2020).

A incorporação do AG em formulação cosmética foi proposta inicialmente em gel aquoso de hidroxietilcelulose 2%. Entretanto, para as concentrações de AG aqui utilizadas, não foi possível sua completa solubilização no gel aquoso. Algumas estratégias para aumentar a solubilidade foram utilizadas como o aumento da disponibilidade de água e o aumento da temperatura, porém não houve êxito. O AG apresentou melhor solubilização em uma emulsão óleo/água. Após o preparo da emulsão, o AG foi incorporado sem nenhuma dificuldade quando comparado ao gel aquoso de hidroxietilcelulose 2%.

Segundo Di Mattia *et al.* (2009), o AG contribui para a estabilização coloidal de sistemas emulsionados óleo/água. Além disso, pesquisas sugerem que o AG e seus galatos (propil, octil e dodecil galato) apresentam a atividade antioxidante preservada quando incorporados a uma emulsão óleo/água (WANG *et al.*, 2020). Quando a incorporação do AG foi realizada em uma emulsão múltipla água/óleo/água, ele apresentou capacidade antioxidante mantida acima de 50% durante 28 dias de estudo (MARTINS *et al.*, 2020). Dessa maneira, a escolha da formulação adequada para a incorporação do AG neste trabalho está de acordo com estudos atuais, sendo a emulsão óleo/água a mais adequada em relação às formulações aquosas.

É importante ressaltar que a via tópica (VT) nas larvas de *G. mellonella* foi utilizada de forma inovadora nesta pesquisa já que estudos que relatam a toxicidade de substâncias através desta via de administração ainda são recentes e escassos.

Um estudo atual dos pesquisadores Osmanov, Wise, Denning (2019), por exemplo, relatou a eficácia antifúngica do miramistin em larvas de *G. mellonella* quando aplicado através da VT. Chegaram à conclusão de que a aplicação tópica da substância não ocasionava alterações macroscópicas na cutícula, no movimento ou sobrevivência das larvas.

Quando a emulsão óleo/água contendo AG foi administrada na cutícula das larvas de *G. mellonella*, resultados semelhantes aos apresentados nos ensaios através da via injetável foram observados.

O ensaio de sobrevivência demonstrou não haver diferenças estatísticas entre o tratamento com AG e o grupo controle, o que indica que as concentrações testadas do composto não foram tóxicas para as larvas

O ensaio de quantificação de hemócitos por VT não apresentou diferenças estatísticas entre grupos tratados com AG e o grupo controle. Nos grupos tratados com concentrações de 50 a 200 µg/larva (261 a 920 mg/Kg) de AG o número de hemócitos variou entre $3,14 \times 10^7$ e 4×10^7 hemócitos/mL enquanto o grupo controle apresentou $3,18 \times 10^7$ hemócitos/mL. Não houve, portanto, alterações do número de hemócitos em consequência do tratamento com a substância.

A quantificação da melanização através do score de melanização apontou discrepâncias estatísticas nos grupos 150 e 200 µg/larva (695 e 920 mg/Kg, respectivamente) de AG em relação ao grupo controle quando as larvas foram tratadas através da VT. A análise visual dos resultados evidencia uma melanização em formato de linha no dorso das larvas, sem que houvesse alteração da coloração destas e maior melanização das larvas em maiores concentrações da substância. Quando se fez a comparação qualitativa entre a VI e a VT constatou-se que o tratamento das larvas através da VI resultou em uma melanização de maior intensidade que a observada nas larvas tratadas por VT. Dessa forma, concluiu-se que o tratamento das larvas por VT nas concentrações de 150 e 200 µg/larva (695 e 920 mg/Kg, respectivamente) de AG também gerou a ativação da resposta humoral de *G. mellonella*.

Não há dados na literatura que demonstrem a capacidade tóxica do AG em larvas de *G. mellonella*, um estudo de Gomes *et al.* (2016) aponta os efeitos benéficos de extratos vegetais que possuem AG em sua composição como possível tratamento para doenças bacterianas. Os dados encontrados na literatura científica são direcionados para a avaliação da toxicidade do AG em metodologias convencionais que utilizaram mamíferos em diferentes vias de administração (DOLLAHITE; PIGEON; CAMP, 1962; SINGLETON; KRATZER, 1969; VON DER HEIJDER *et al.*, 1986; VARIYA *et al.*, 2019).

Mediante comparação dos métodos de animais mamíferos apresentados na Tabela 2 com os resultados apontados no modelo alternativo *G. mellonella* observa-se que tais metodologias demonstram alta tolerância ao AG, sendo necessárias altas doses do composto para que efeitos tóxicos sejam constatados nestes animais, doses entre 4.300 mg/Kg e 5.000 mg/Kg para os mamíferos. Nós testamos doses de até 920 mg/Kg em *G. mellonella*. Dessa forma, o estudo de novos métodos *in vitro* e *in vivo* que possam prever a toxicidade em mamíferos faz-se importante para potenciais compostos de formulações cosméticas com AG.

7 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

1957, 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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