RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 01/04/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Wagner Soares Ramos

Estudo de Segurança e Eficácia *in vitro* do Ácido p-Cumárico e sua incorporação em Emulsão Cosmética Óleo em Água (O/A)

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP
2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Estudo de Segurança e Eficácia *in vitro* do Ácido p-Cumárico e sua incorporação em Emulsão Cosmética Óleo em Água (O/A)

Wagner Soares Ramos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP
2019

Ramos, Wagner Soares.

R176e Estudo de Segurança e Eficácia *in vitro* do Ácido p-Cumárico e sua incorporação em Emulsão Cosmética Óleo em Água (O/A) / Wagner Soares Ramos. – Araraquara, 2019.

92 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-graduação Em Ciências Farmacêuticas. Área de Desenvolvimento de Fármacos E Medicamentos.

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. Ácido p-cumárico. 2. Atividade antimicrobiana. 3. Estudo de Estabilidade. 4. Citotoxicidade. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Título.

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

CAPES: 33004030078P6
Esta Ficha não pode ser modificada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 22

3 OBJETIVOS 25

4 MATERIAL E MÉTODOS 26

4.1 Reagentes e matérias-primas 26

4.2 Materiais biológicos 26

4.3 Equipamentos, vidrarias e acessórios 27

4.4 Métodos 28

4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico 28

4.4.1.1 Preparo dos reagentes e da solução estoque de APC 29

4.4.1.2 Preparo dos meios de cultura DMEM e MEM 29

4.4.1.3 Reativação e verificação da viabilidade celular (HDFa e HaCat) 29

4.4.1.4 Determinação do potencial citotóxico do APC 29

4.4.1.5 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo método HET-CAM *(Hen´s Eggs Test – Chorio Allantoic Membrane)* 32

4.4.1.5.1 Obtenção e preparo dos ovos embrionados 33

4.4.1.5.2 Preparo dos reagentes 33

4.4.1.5.3 Execução do ensaio 33

4.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana 34

4.4.2.1 Preparo das soluções estoque de APC, Antibióticos e Resazurina 35

4.4.2.2 Padronização da suspensão de células bacterianas 35

4.4.2.3 Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima do APC 36

4.4.3 Desenvolvimento e validação do método de quantificação do APC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 37

4.4.3.1 Especificidade e Seletividade 38

4.4.3.2 Linearidade 39

4.4.3.2.1 Linearidade em Etanol 39

4.4.3.2.2 Linearidade em Tampão Fosfato (pH = 7,4) (*sink conditions*) 40

4.4.3.2.3 Linearidade em Metanol 41

4.4.3.3 Precisão 41

4.4.3.4 Limite de Detecção 42

4.4.3.5 Limite de Quantificação 42

4.4.3.6 Exatidão 43

4.4.3.7 Robustez 43

4.4.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas 44

4.4.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação 48

4.4.4.1.1 Desenvolvimento de processo em 2 fases 48

4.4.4.1.2 Desenvolvimento de processo em 1 fase 49

4.4.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada 50

4.4.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões 51

4.4.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões 51

4.4.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões 52

4.4.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões 52

4.4.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões 52

4.4.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões 53

4.4.5 Avaliação dos perfis de liberação, permeação e retenção cutâneas do APC 53

4.4.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC 54

4.4.5.2 Avaliação da permeação do APC 55

4.4.5.3 Avaliação da retenção do APC 56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58

5.1 Avaliação do potencial citotóxico 58

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares HDFa e HaCat 58

5.1.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo método HET-CAM (*Hen´s Eggs Test – Chorio Allantoic Membrane*) 59

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana 61

5.3 Desenvolvimento e validação do método de quantificação do APC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) 63

5.3.1 Especificidade e Seletividade 63

5.3.2 Linearidade 65

5.3.2.1 Linearidade em Etanol 65

5.3.2.2 Linearidade em Tampão Fosfato (pH = 7,4) (*sink conditions*) 67

5.3.2.3 Linearidade em Metanol 69

5.3.3 Precisão 71

5.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação 71

5.3.5 Exatidão 72

5.3.6 Robustez 72

5.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas 73

5.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação 73

5.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada 74

5.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões 74

5.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões 74

5.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões 77

5.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões 77

5.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões 81

5.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões 83

5.5 Avaliação dos perfis de liberação, permeação e retenção cutâneas do APC 84

5.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC 84

5.5.2 Avaliação da permeação e retenção do APC 85

6 CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS 87

RESUMO

O ácido p-cumárico (APC) é um composto fenólico não flavonóide que apresenta segurança e eficácia bem descritas na ciência dos alimentos devido suas propriedades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana e por apresentar baixa toxicidade oral. Essas propriedades são pouco exploradas em produtos para cuidados com a pele. O objetivo do presente estudo foi avaliar de forma *in vitro* a segurança e a eficácia do APC e incorporá-lo em emulsão cosmética óleo em água (O/A). Nossos estudos *in vitro* e alternativos ao uso de animais foram conduzidos para verificar a citotoxicidade do APC em células de queratinócitos (HaCat) e fibroblastos humanos (HDFa), o potencial de irritação ocular (HET-CAM) e a atividade antimicrobiana em diferentes cepas. Emulsões contendo APC foram submetidas ao estudo de estabilidade e de liberação, retenção e permeação cutâneas. **Resultados:** o IC_{50} do APC em células HaCat e HDFa foi 693,57 e 2.814,75 µg/mL, respectivamente. Além disso 100 µg de APC foram levemente tóxicos em membrana corioalantóica de ovo embrionado. As concentrações bactericidas mínimas em cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*, foram 3.000 µg/mL, 1.875 µg/mL, 3.750 µg/mL e 3.750 µg/mL, respectivamente. Emulsões contendo diferentes concentrações de APC foram estáveis durante o período de estabilidade acelerada. Após 12 horas 91,08 ± 0,03% do APC foi liberado da formulação e após 24 horas, 0,52 ± 0,18% e 0,94 ± 0,37% ficaram retidos no estrato córneo e na epiderme/derme, respectivamente. Nossos resultados indicam que as concentrações de APC estudadas podem ser eficazes e seguras para uso em cosméticos, incluindo aqueles para uso na região dos olhos, ainda que estudos complementares sejam necessários.

Palavras-chave: Ácido p-cumárico. Atividade antimicrobiana. Citotoxicidade. Estudo de estabilidade.

ABSTRACT

p-Coumaric acid (PCA) is a non flavonoid phenolic compound whose safety and efficacy widely described in food science papers due to antioxidant, antitumor, anti inflammatory properties, and low oral toxicity. These characteristics are poorly or no described when PCA is added to skin care products. The aim of the present study was to evaluate the safety and efficacy of PCA through *in vitro* assays, and then add it in oil in water cosmetic emulsion (O/W). Our in vitro trials, without animal use were conducted to predict PCA´s cytotoxicity in HaCat and HDFa cells, ophthalmic irritation potential, and antibacterial activity against differents strains. Emulsions with PCA has been tested to predict shelf life, dermal absorption, and dermal retention. **Results:** PCA´s IC_{50} in HaCat and HDFa cells was 693.57 and 2,814.75 µg.mL-1, respectively. In addition 100 µg of APC were slightly toxic in chorioallantoic membrane assay. The minimum bactericidal concentrations against *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *S. epidermidis* strains were 3,000 $\mu g.mL^{-1}$, 1,875 $\mu g.mL^{-1}$, 3,750 $\mu g.mL^{-1}$, and 3,750 $\mu g.mL^{-1}$, respectively. Emulsions containing 0.04%, 0.06%, 0.08% and 0.10% of PCA were stable during self life testing for ninety days. After 12 hours 91.08 ± 0.03% of PCA was released of the emultion, and after 24 hours 0.52 ± 0.18% and 0.94 ± 0.37%, were present in stratum corneum and epidermis/dermis, respectively. Our findings indicate that PCA concentrations would be effective and safe to use in cosmetic products, even eye cosmetics, although complementary assays are necessary.

Keyword: p-Coumaric acid. Antibacterial activity. Cytotoxicity. Shelf life testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fragmento do Livro de Receitas de Família 19
Figura 2. Organograma do estudo com o ácido p-cumárico 21
Figura 3. Reação de oxidação do 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)..... 28
Figura 4. Células Human Dermal Fibroblasts e Human Keratinocytes 28
Figura 5. Esquema dos quadrantes da Câmara de Neubauer..... 30
Figura 6. Diluições seriadas do APC e do solvente para o ensaio de citotoxicidade 31
Figura 7. Disposição das amostras na placa de 96 poços para o ensaio de citotoxicidade 31
Figura 8. Membrana Corioalantóica..... 34
Figura 9. Reação de oxidação do 7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido..... 35
Figura 10. Disposição das amostras na placa de 96 poços para o ensaio de Atividade Antimicrobiana 36
Figura 11. Placa de Petri com ágar Mueller-Hinton..... 37
Figura 12. Fórmula estrutural do EDTA.2Na..... 44
Figura 13. Fórmula estrutural do propilenoglicol..... 45
Figura 14. Fórmula estrutural do álcool cetoestearílico 45
Figura 15. Fórmula estrutural do cetearil sulfato de sódio..... 45
Figura 16. Fórmula estrutural do estearato de glicerila..... 46
Figura 17. Fórmula estrutural do estearato de etilexila..... 46
Figura 18. Fórmula estrutural do fenoxietanol..... 46
Figura 19. (a) Processo de Fabricação em 2 etapas e (b) Processo em 1 etapa..... 50
Figura 20. Modelo de identificação das amostras 50
Figura 21. Viscosímetro Brokfield..... 52
Figura 22. Permeador Microette Hanson-Research® 54
Figura 23. Modelo esquemático da célula de difusão de Franz 55
Figura 24. Dermatômetro Nouvag® TCM300..... 55
Figura 25. Etapas do ensaio de retenção cutânea 56
Figura 26. (a) Fitas adesivas em metanol e (b) Pele de orelha de porco em metanol ... 57
Figura 27. Placas contendo linhagens celulares HDFa e HaCat e 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)..... 58
Figura 28. Viabilidade celular e IC_{50} das linhagens HDFa e HaCat 58

Figura 29. Ocorrência de reações de hiperemia, hemorragia ou coagulação após adição de NaOH, NaCl e APC na CAM 60
Figura 30. Placas de 96 poços contendo Resazurina e (a) *Escherichia coli* (ATCC® 10536), (b) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), (c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) e (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222) 61
Figura 31. Placas com AMH. C1 e C2, controles do solvente. Divisões 1 a 6, controle das linhas H1-H6 (APC). (a) *Escherichia coli* (ATCC® 10536), (b) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), (c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222) 61
Figura 32. Viabilidade celular e IC_{50} das cepas bacterianas 62
Figura 33. Comparação entre as curvas cromatográficas do padrão de APC 50 µg/mL e dos agentes degradantes, obtidas por CLAE a 310 nm 64
Figura 34. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações de 40, 45, 50, 55 e 60 µg/mL em etanol, obtidas por CLAE a 310 nm..... 65
Figura 35. Gráfico de Linearidade do APC em etanol 66
Figura 36. Gráfico de resíduos da Linearidade em etanol..... 66
Figura 37. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações 0,025, 0,25, 0,5, 5, 10, 40, 45, 50 e 60 µg/mL em tampão fosfato pH = 7,4, obtidas por CLAE a 310 nm 67
Figura 38. Gráfico de Linearidade do APC em tampão fosfato pH = 7,4..... 68
Figura 39. Gráfico de resíduos da Linearidade em tampão fosfato pH = 7,4..... 68
Figura 40. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações 0,025, 0,25, 0,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL em metanol, obtidas por CLAE a 310 nm . 69
Figura 41. Gráfico de Linearidade do APC em metanol 70
Figura 42. Gráfico de resíduos da Linearidade em metanol..... 70
Figura 43. Curvas cromatográficas para cálculo de LD e LQ do APC nas concentrações 0,023, 0,23, 0,46 e 46 µg/mL em etanol, obtidas por CLAE a 310 nm..... 72
Figura 44. Gráfico de viscosidade das emulsões durante estudo de Estabilidade Acelerada, mPas 75
Figura 45. Microscopia das emulsões submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, aumento de 100x..... 77
Figura 46. Microscopia das emulsões submetidas a 5 °C por 3 meses, aumento de 100x 78

Figura 47. Microscopia das emulsões submetidas a 25 °C por 3 meses, aumento de 100x 79
Figura 48. Microscopia das emulsões submetidas a 40 °C por 3 meses, aumento de 100x 80
Figura 49. Caracterização da emulsão O/A com uso de corantes (a) Amarelo Tartrazina 1%, aumento de 100x e (b) F. Brown 1%, aumento de 40x 81
Figura 50. Gráfico de pH das emulsões durante estudo de Estabilidade Acelerada 82
Figura 51. Concentração de APC em porcentagem durante 3 meses de estudo de Estabilidade Acelerada 84
Figura 52. Perfil de liberação do APC, emulsão ECPC310817#4, lote 130318 84
Figura 53. Porcentagem de permeação cutânea do APC..... 85
Figura 54. Porcentagem de retenção cutânea do APC no Estrato Córneo e na Epiderme/Derme..... 85

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Formulações cosméticas desenvolvidas na 1ª etapa..... 47
Quadro 2. Formulações cosméticas desenvolvidas na 2ª etapa..... 48
Quadro 3. Condições da Estabilidade Acelerada e periodicidade das análises..... 50
Quadro 4. Ciclos de Congelamento e Descongelamento (F/T)..... 51
Quadro 5. Parâmetros cromatográficos de análise..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características físicas e químicas do ácido p-cumárico..... 22
Tabela 2. Pontuação para cálculo do Índice de Irritação (IS)..... 32
Tabela 3. Classificação do Índice de Irritação..... 34
Tabela 4. Diluições das amostras de emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), ECPC310817#PL (sem APC) e Solução padrão de APC 39
Tabela 5. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em etanol 40
Tabela 6. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em tampão fosfato pH = 7,4..... 40
Tabela 7. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em metanol 41
Tabela 8. Diluições das soluções estoque para determinação dos limites de detecção e quantificação do APC..... 42
Tabela 9. Parâmetros utilizados na determinação da robustez do método analítico 44
Tabela 10. Classificação do Índice de Irritação (IS) para cada substância, Método HET-CAM. 59
Tabela 11. Valores de CIM, CBM e IC_{50} do APC em µg/mL..... 62
Tabela 12. Valores de CIM, IC_{50} e Índice de Seletividade do APC..... 63
Tabela 13. Comparação entre as áreas das emulsões ECPC310817#4 (0,10% de APC) e ECPC310817#PL (sem APC), mantidas 8 horas a 80 °C sob condições de degradação 64
Tabela 14. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em etanol (p<0,0001), BioEstat® 5.0 65
Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em etanol (p 0,05)..... 66
Tabela 16. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em tampão fosfato pH = 7,4 (p<0,0001), BioEstat® 5.0..... 67
Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em tampão fosfato pH = 7,4 (p 0,05) 68
Tabela 18. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em metanol (p<0,0001), BioEstat® 5.0 69
Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em metanol (p 0,05)..... 70
Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) entre dois dias de análise de precisão 71

Tabela 21. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas para cálculo de LD e LQ 71
Tabela 22. Porcentagem de recuperação do APC para cálculo de exatidão..... 72
Tabela 23. Porcentagem de recuperação do APC para cálculo de robustez..... 73
Tabela 24. Resumo das análises feitas durante o estudo de Estabilidade Acelerada 74
Tabela 25. Valores de viscosidade das emulsões ECPC310817#PL, #1, #2, #3 e #4 durante estudo de Estabilidade Acelerada, mPas (M ± DP)..... 76
Tabela 26. Valores de pH das emulsões ECPC310817#PL, #1, #2, #3 e #4 durante estudo de Estabilidade Acelerada (M ± DP) 83

LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
ABIHPEC	Associação Brasileira para a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos
ABTS	*2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*
A/O	Água em óleo
AMH	Ágar Mueller-Hinton
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Ácido p-cumárico
ATCC	*American Type Culture Collection*
C	Concentração
CAM	Membrana corioalantóica
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CI	*Color index*
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CME	Concentração média experimental
CT	Concentração teórica
CTRL -	Controle negativo
CTRL +	Controle positivo
D	Diluição

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsufóxido

DoE *Design of Experiments* (Desenho de Experimentos)

DPPH *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

DPR Desvio Padrão Relativo

ECPC Emulsão cosmética contendo ácido p-cumárico

EDTA.2Na Etileno Diamino Tetra Acetato de Sódio

EPPC Emulsão cosmética sem ácido p-cumárico (placebo)

EtOH Etanol

FDA *Food and Drug Administration*

F/T Freeze and Thaw (Congelamento e descongelamento)

G Força G (gravidade)

g Grama

gl Graus de liberdade

H_2O Água

HaCat Queratinócito humano

HDFa *Human Dermal Fibroblast* (Fibroblasto humano)

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC_{50} ou IC50 Concentração inibitória 50%

INCI *International Nomenclature of Cosmetic Ingredientes* (Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos)

IS Índice de irritação

L Litro

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

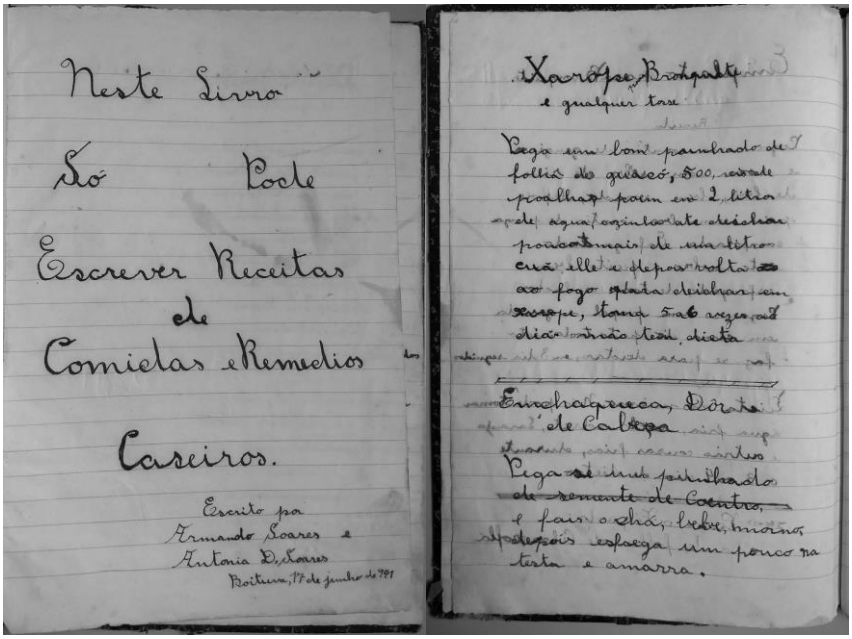
M	Molar
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
MEM	*Minimum Essential Media*
MetOH	Metanol
mL	Mililitro
mPas	Mili Pascal
MQ	Média dos quadrados
MTT	*3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*
NAD	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Nm	Nanômetros
O/A	Óleo em água
PBS	*Phosphate Buffer Saline* (Tampão Fosfato)
pH	Potencial hidrogeniônico
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Resolução
RPM	Rotações por minuto
SE	Solução estoque
SQ	Soma dos quadrados
SQR	Substância química de referência
ST	Sem tratamento
TP	*Tape stripping*
TSB	Caldo Soja Tripticaseína

UFC	Unidade formadora de colônia
UI	Unidade internacional
UV-VIS	Ultravioleta-visível
V	Volume

1 INTRODUÇÃO

A pele que habitamos exerce fascínio sobre os seres humanos desde os períodos mais primitivos. Durante toda a história da humanidade houve relatos correlacionando a pele com suas funções de manutenção da vida, preservação da saúde e diferenciação das pessoas em tribos, comunidades ou classes sociais. A utilização de minerais, raízes, folhas, unguentos, elixires entre outros datam de períodos anteriores a 3.000 anos antes da era cristã até os dias atuais. A pintura do corpo como demonstração de poder e força frente ao inimigo e como atrativo sexual são conhecidos tanto na Pré-História como no Egito Antigo e ainda que o uso dessas "técnicas" tenha sido feito inicialmente de forma empírica, há indícios que elas evoluíram à medida que a habilidade e inteligência humanas também evoluíram. Existem relatos arqueológicos em que a rainha Cleópatra utilizava pós, loções ou pomadas para a área dos olhos preparados com sais de chumbo que não eram encontrados naturalmente no Egito ou região próxima. (UNGÁR et al., 2002).

A Figura 1 mostra um fragmento do livro de receitas escrito na década de 1940 pelos avós maternos do autor onde pode ser observado ainda que de forma estritamente empírica, não apenas a "receita" de um "medicamento" indicado para uma determinada patologia, mas também os detalhes do modo de preparo, as quantidades de cada ingrediente e sua posologia.



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 1. Fragmento do Livro de Receitas de Família

A medida que as ciências evoluíram, surgiram produtos específicos para uso sobre a pele, os chamados cosméticos. O termo cosmético origina-se do grego κοσμητικός, *kosmetikós* e tem origem no termo grego *kosmetés*, que descrevia o escravo ou ajudante que era responsável por arrumar as roupas, perfumes e pinturas de sua senhora. Esses objetos eram chamados *kósmesis*, que explica a palavra "cosméticos" ("Origem da palavra Cosméticos", [s.d.]). Com o surgimento dos cosméticos surge, também, a necessidade de regulamentação desse setor e assim são criados tópicos específicos sobre cosméticos nas legislações das agências regulatórias, como a Agência Regulatória Americana (FDA) criada em 1906 e a Agência Regulatória Brasileira (ANVISA) criada em 1999, entre outras agências (SALVADOR; CHISVERT, 2007).

Nesse cenário evolutivo, o segmento cosmético passa a desempenhar papel importante na sociedade não apenas por oferecer produtos cada vez mais tecnológicos, mas também pela possibilidade de desenvolver e disponibilizar produtos específicos às necessidades da população, que apresenta expectativa de vida cada vez maior (KASRIEL-ALEXANDER, 2016).

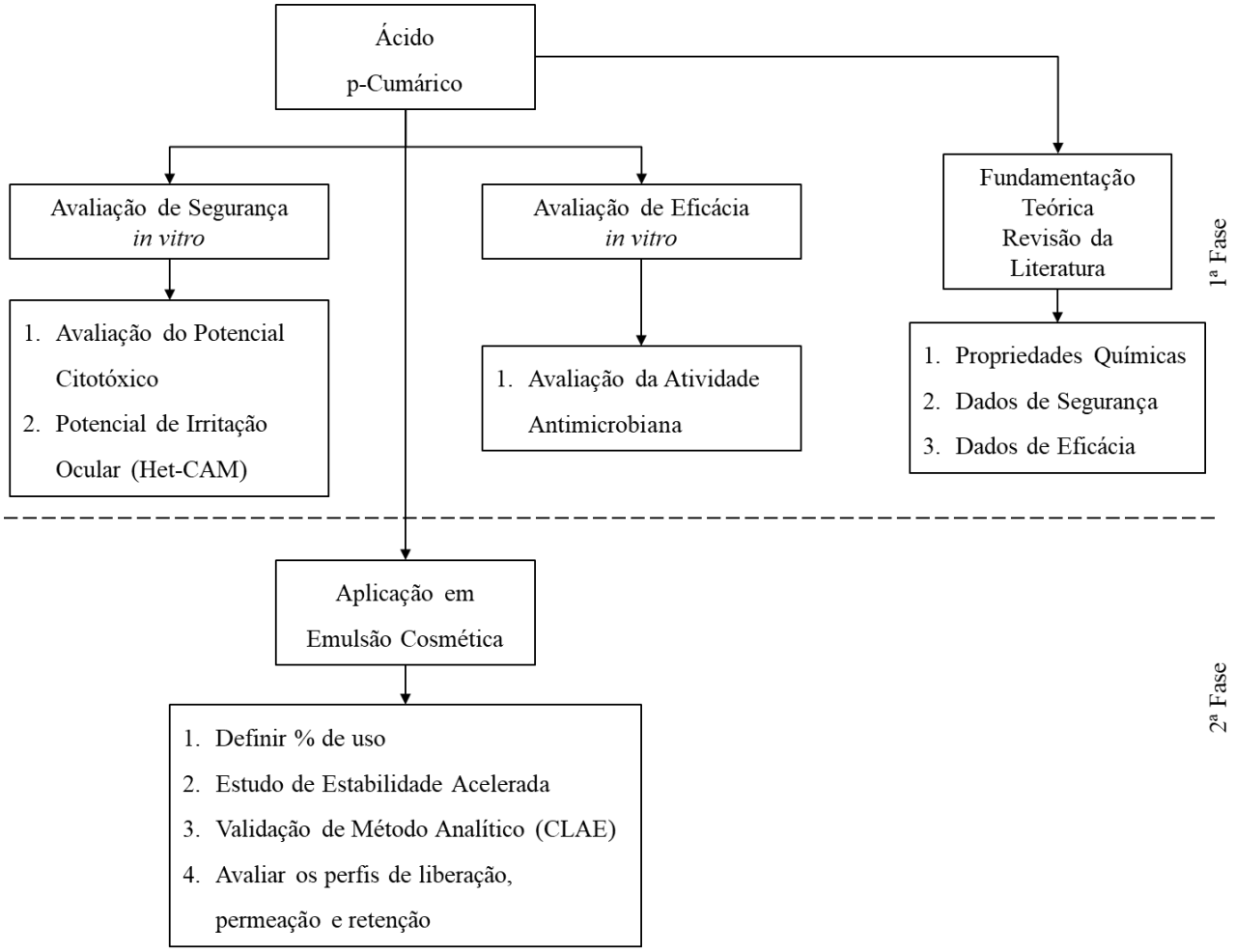
Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população brasileira em 2018 ultrapassou os 209 milhões de habitantes, sendo 51,09 e 48,91% mulheres e homens, respectivamente. Do total da população brasileira 9,22% apresenta idade acima dos 65 anos ("IBGE | Projeção da população", [s.d.]).

Segundo dados da Associação Brasileira para a Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), o Brasil representa 6,9% do consumo mundial de produtos cosméticos, ocupando a 4ª posição em faturamento e a 8ª em consumo de produtos para cuidados com a pele (ABIHPEC, 2016).

Esses dados ratificam a importância do desenvolvimento de produtos seguros e eficazes que atendam às necessidades de cada grupo populacional (KASRIEL-ALEXANDER, 2016). Por esses motivos e tendo como base os dados históricos, tecnológicos e mercadológicos, nosso grupo de pesquisa dedicou-se a estudar os compostos fenólicos com potencial para uso em produtos cosméticos. Entres esses compostos fenólicos estão os ácidos p-cumárico, gálico, ferúlico, caféico, carnósico, vanílico, gentísico, ursólico, entre outros.

Esse estudo envolvendo a aplicação do ácido p-cumárico foi desenvolvido em duas fases. Na primeira fase foram verificadas as propriedades químicas e os dados de

segurança e eficácia do ácido p-cumárico através da fundamentação teórica e revisão da literatura. Nessa fase foram executados também estudos *in vitro* para determinação de sua segurança e eficácia. Na segunda fase foram desenvolvidas emulsões cosméticas para aplicação de diferentes concentrações do ácido p-cumárico, determinação da estabilidade físico-química e avaliação dos perfis de liberação, permeação e retenção cutâneas (Figura 2).



Fonte: Autor

Figura 2. Organograma do estudo com o ácido p-cumárico

6 CONCLUSÕES

O estudo de avaliação do potencial citotóxico do APC mostrou que a concentração tóxica para as células HDFa é cerca de 4 vezes maior que a concentração para as células HaCat. Isso pode estar relacionado ao metabolismo de cada célula. O APC apresentou baixo potencial de irritação ocular pelo método da Membrana Corioalantóica. Esses resultados sugerem que as concentrações de APC propostas para as emulsões podem ser consideradas seguras.

O APC apresentou atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas, o que poderá permitir seu uso como agente antimicrobiano isolado ou em associação com outros antimicrobianos. A concentração de APC correspondente ao IC_{50} para as células HDFa apresentou índice de seletividade para todos os microrganismos estudados.

As emulsões permaneceram estáveis ao longo dos 3 meses de estudo de estabilidade, ainda que algumas alterações tenham sido observadas em tempos e temperaturas distintas.

Os estudos de liberação, permeação e retenção cutânea permitiram entender o comportamento do APC após sua liberação da emulsão cosmética. Após 12 horas quase todo APC tinha sido liberado da formulação e em 24 horas parte dele foi quantificado no estrato córneo e parte na epiderme/derme. A diferença entre a quantidade de APC retida e a quantidade permeada, pode estar diretamente relacionada à técnica empregada para a extração do ativo das peles de orelha de porco e a solubilidade do APC em propilenoglicol.

Nossos resultados sugerem que o APC pode ser considerado eficaz, seguro e estável para uso em produtos cosméticos, inclusive naqueles para uso na região dos olhos, ainda que testes complementares sejam necessários. A perspectiva a partir desse estudo é entender se há sinergismo entre os ativos estudados pelo nosso grupo de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ABDI. Agencia Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Guia de Microbiologia**: controle microbiológico na indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. ABIHPEC; SEBRAE. 2015. p. 1–109.

ABIHPEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Panorama do Setor de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. São Paulo: Abihpec, jul. 2016. p. 1–30.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILâNCIA SANITÁRIA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004. v. 1

AL-MADHAGI, W. M. et al. Chemical profiling and biological activity of Peperomia blanda (Jacq.) Kunth. **Peer J**, v. 6, p. e4839, 2018.

ÁLVAREZ-GÓMEZ, F. et al. UV Photoprotection, Cytotoxicity and Immunology Capacity of Red Algae Extracts. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 2, 18 jan. 2019.

ANVISA. **Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos: Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos**. Brasília: ANVISA, 2008.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2012.

BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R. Evaluation of Synergistic Antibacterial and Antioxidant Efficacy of Essential Oils of Spices and Herbs in Combination. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0131321, 2015.

BRASIL. Resolução RDC Nº 166, de 24 de Julho de 2017. "Validação de métodos analíticos". Brasília: Agência de Vigiância Sanitária, 2017.

CELIKTAS, O. Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553–559, 2007.

CHANG, F.-P. et al. Three New Iridoid Derivatives Have Been Isolated from the Stems of Neonauclea reticulata (Havil.) Merr. with Cytotoxic Activity on Hepatocellular Carcinoma Cells. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 2297, 8 set. 2018.

CHEN, J. L.; STEELE, T. W. J.; STUCKEY, D. C. Metabolic reduction of resazurin; location within the cell for cytotoxicity assays. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 2, p. 351–358, 1 fev. 2018.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **Journal of the Science of Food and**

Agriculture, v. 80, n. 7, p. 1033–1043, 15 maio 2000.

CORRÊA, M. A. **Cosmetologia Ciência e Técnica**. 1ª ed. São Paulo: Medfarma, 2012.

DRAELOS, Z. D.; THAMAN, L. A. **Cosmetic Formulation of Skin Care Products**. Phenix, Arizona: Taylor & Francis, 2006.

DrugBank. [Base de Dados]. Disponível em: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB04066>. Acesso em: 20 fev. 2019.

GEETHA, N. P. et al. HPLC Method for Determination of p -coumaric acid from the Medicinal Herb Leptadinia reticulata. **International Journal of Phytomedicine**, v. 3, n. 3, p. 319–324, 2011.

GUEDES, T. A. Comparando equações de regressão em dados de saúde. **Acta Scientiarum Technology,** v. 23, n. 6, p. 1531–1535, 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Projeção da população. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/>. Acesso em: 23 out. 2018.

ICCVAM-Recommended Test Method Protocol: Hen's Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. 2010.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). ICCVAM. Recommended Test Method Protocol : Hen ' s Egg Test – Chorioallantoic Membrane (HET-CAM) Test Method. **ICCVAM Test Method Evaluation Report**, v. 13, n. 10, p. B30–B38, 2010.

ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.

IWATA, H.; SHIMADA, K. **Formulas, Ingredients and Production of Cosmetics**. Tokyo: Springer, 2013.

JAŚKIEWICZ, M. et al. Antimicrobial Activity of Selected Antimicrobial Peptides Against Planktonic Culture and Biofilm of Acinetobacter baumannii. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 1, p. 317–324, 24 mar. 2019.

JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE AND THE WORKING PARTY ON CHEMICALS, PESTICIDES AND BIOTECHNOLOGY. Guidance notes on dermal absorption. Series on Testing and Assessment No. 156 JT03305971. Document complet disponible sur OLIS

dans son format d'origin. Paris, France: OECD Environment, Health and Safety Publications, 2011. 72p. Disponível em: <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/48532204.pdf>. Acesso em: 22 out. 2018.

KADOMA, Y. et al. Radical-Scavenging Activity of Dietary Phytophenols in Combination with co-Antioxidants Using the Induction Period Method. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10457–10470, 15 dez. 2011.

KARTHIKEYAN, R.; DEVADASU, C.; SRINIVASA BABU, P. Isolation, Characterization, and RP-HPLC Estimation of P-Coumaric Acid from Methanolic Extract of Durva Grass (Cynodon dactylon Linn.) (Pers.). **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

KASRIEL-ALEXANDER, D. Top 10 Global Consumer Trends for 2017. **Euromonitor International**, v. 61, n. February, p. 29–76, 2016.

KIM, K. W. et al. Terahertz dynamic imaging of skin drug absorption. **Optics Express**, v. 20, n. 9, p. 9476, 2012.

LAZIĆ, Ž. R. **Design of Experiments in Chemical Engineering**. Germany: WILEY-VCH, 2005.

LEE, J. D. et al. Percutaneous permeability of 1-phenoxy-2-propanol, a preservative in cosmetics. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 103, p. 56–62, 1 abr. 2019.

LI, L. et al. Protective effect of polysaccharide from Sophora japonica L. flower buds against UVB radiation in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 191, p. 135–142, 1 fev. 2019.

LOU, Z. et al. p-Coumaric acid kills bacteria through dual damage mechanisms. **Food Control**, v. 25, n. 2, p. 550–554, 1 jun. 2012.

LOWENTHAL, J. N. **Six sigma project management : a pocket guide**. Milwaukee, WI: ASQ Quality Press, 2001.

MARQUARDT, C. et al. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). **European journal of medical research**, v. 15, n. 5, p. 204–9, 2010.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33–54, mar. 2002.

MARUNO, M. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele**. Ribeirão Preto: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 9 out. 2009.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E.; ZAKARIA, Z. A. Reactivity of phenolic compounds towards free radicals under in vitro conditions. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5790–5798, 8 set. 2015.

MCKENZIE, B. et al. The hen's egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 1–8, 25 jul. 2015.

MIKI, K. et al. Evaluation of optimization workflow using design of experiment (DoE) for various field configurations in volumetric-modulated arc therapy. 2018.

MOHAMMED, H. S. et al. Quantitative and qualitative toxicological evaluation of thiol-ene "click" chemistry-based polyanhydrides and their degradation products. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 104, n. 8, p. 1936–1945, 1 ago. 2016.

Molbase (Shanghai). Chemical Encyclopedia Database. Disponível em: <http://www.molbase.com/en/index.html/?utm_source=google&utm_medium=cpc &utm_term=chemical structure online&gclid=CjwKCAjworfdBRA7EiwAKX9HeGjaxZvNeS9KoIPAGKvkIN1sRxu218zIrSDK5gTreCM4Ulc8NguW5RoCM6QQAvD_BwE>. Acesso em: 19 out. 2018.

Origem da palavra Cosméticos. Disponível em: <https://hridiomas.com.br/origem-da-palavra-cosmeticos/>. Acesso em: 23 out. 2018.

PAYE, M.; BAREL, A. O.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. New York: Marcel Dekker, 2001.

PEI, K. et al. p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2952–2962, 1 jul. 2016.

PubChem Compounds Database. National Institutes of Health (NIH). Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, 2019. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/637542#section=Top>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SALVADOR, A.; CHISVERT, A. **Analysis of Cosmetic ProductsAnalysis of Cosmetic Products**Elsevier, , 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**. 1ª ed. Alemanha: Artliber, 2006.

SEOK, J. K.; BOO, Y. C. p-Coumaric Acid Attenuates UVB-Induced Release of Stratifin from Keratinocytes and Indirectly Regulates Matrix Metalloproteinase 1 Release from Fibroblasts. **The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology**, v. 19, n. 3, p. 241–7, maio 2015.

SHEKHAWAT, L. K. et al. Design of Experiments Applications in Bioprocessing: Chromatography Process Development using Split DOE. **Biotechnology Progress**, 2018.

Sigma-Aldrich®. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c9008?lang=pt&region=BR>. Acesso em: 20 fev. 2019.

SINGH, D. P.; GOVINDARAJAN, R.; RAWAT, A. K. S. High-performance liquid chromatography as a tool for the chemical standardisation of Triphala—an Ayurvedic formulation. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 2, p. 164–168, 1 mar. 2008.

SOUZA, C.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Development of a HPLC method for determination of four UV filters in sunscreen and its application to skin penetration studies. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 12, p. e4029, dez. 2017.

STOJKOVIĆ, D. et al. In situ antioxidant and antimicrobial activities of naturally occurring caffeic acid, p -coumaric acid and rutin, using food systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 13, p. 3205–3208, out. 2013.

TANG, Y. et al. Assessing the dyeing efficiency and irritation potentials of plant hair dyes: A multi-analytical in vitro approach. **Journal of Cosmetic Dermatology**, 18 fev. 2019.

TILGASE, A. et al. Effect of the oncolytic ECHO-7 virus Rigvir® on the viability of cell lines of human origin in vitro. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 6, p. 1033–1049, 2018.

TÓTH, G. et al. Characterization of antioxidant phenolics in Syringa vulgaris L. flowers and fruits by HPLC-DAD-ESI-MS. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 6, p. 923–932, 1 jun. 2016.

UNGÁR, T. et al. Revealing the powdering methods of black makeup in Ancient

Egypt by fitting microstructure based Fourier coefficients to the whole x-ray diffraction profiles of galena. **Citation: Journal of Applied Physics**, v. 91, p. 23512, 2002.

VARKA, E.-M. Stability Study of O/W Cosmetic Emulsions Using Rosmarinus officinalis and Calendula officinalis Extracts. **Open Journal of Applied Sciences**, v. 02, n. 03, p. 139–145, 2012.

VELOZO-SÁ, V. S. et al. In vitro cytotoxicity and in vivo zebrafish toxicity evaluation of Ru(II)/2-mercaptopyrimidine complexes. **Dalton Transactions**, 2019.

YEMMEN, M. et al. Antioxidant activities, anticancer activity and polyphenolics profile, of leaf, fruit and stem extracts of Pistacia lentiscus from Tunisia. **Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)**, v. 63, n. 9, p. 87–95, 30 set. 2017.

ZABKA, M.; PAVELA, R. Antifungal efficacy of some natural phenolic compounds against significant pathogenic and toxinogenic filamentous fungi. **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1051–1056, 1 out. 2013.