

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -  
UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado  
contendo ácido cafeico**

Caroline Magnani Spagnol

**ARARAQUARA/SP**

**2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -  
UNESP**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - ARARAQUARA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado  
contendo ácido cafeico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientanda: Caroline Magnani Spagnol

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Hérica Regina Nunes Salgado

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

**ARARAQUARA/SP**

**2014**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

**S733e** Spagnol, Caroline Magnani  
Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido  
cafeico / Caroline Magnani Spagnol . – Araraquara, 2014  
146 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”.  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Herida Regina Nunes Salgado  
Coorientador: Marcos Antonio Corrêa

1. Ácido cafeico. 2. Cosméticos. 3. Emulsão. 4. Antienvhecimento. 5. Permeação  
cutânea I. Salgado, Hérica Regina Nunes, orient. II. Corrêa, Marco Antonio, coorient. III.  
Titulo.

**CAPES: 40300005**

## *Dedicatória*

*Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro, presente em todos os momentos felizes e nas horas de angústia.*

*Dedico também a meus pais e à minha “irmãzinha”, pois sempre estiveram prontos a me apoiar, não medindo esforços para que eu pudesse tornar-me quem eu sou e atingir meus objetivos oferecendo-me carinho, força, consolo, sendo exemplos para minha vida e meu porto seguro.*

*Muito obrigada por tudo!*

*Ao meu marido, Heitor, que enfrentou ao meu lado os momentos mais difíceis, por todo carinho, paciência e compreensão que sempre me dedicou.*

*Eu te amo muito! Obrigada por estar sempre presente!*

*“Vida é o amor existencial.  
Razão é o amor que pondera.  
Estudo é o amor que analisa.  
Ciência é o amor que investiga.  
Filosofia é o amor que pensa.  
Religião é o amor que busca a Deus.  
Verdade é o amor que eterniza.  
Ideal é o amor que se eleva.  
Fé é o amor que transcende.  
Esperança é o amor que sonha.  
Caridade é o amor que auxilia.  
Fraternidade é o amor que se expande.  
Sacrifício é o amor que se esforça.  
Renúncia é o amor que depura.  
Simpatia é o amor que sorri.  
Trabalho é o amor que constrói.  
Indiferença é o amor que se esconde.  
Desespero é o amor que se desgoverna.  
Paixão é o amor que se desequilibra.  
Ciúme é o amor que se desvaira.  
Orgulho é o amor que enlouquece.  
Sensualismo é o amor que se envenena.*

*Finalmente, o ódio, que julgas ser a antítese do amor, não é senão o próprio amor que adoeceu gravemente.”*

**Francisco Cândido Xavier**

## *Agradecimentos*

À minha orientadora, professora Doutora **Hérida Regina Nunes Salgado**, por ter lido e corrigido incansavelmente todos os meus trabalhos, pela confiança, compreensão, incentivo e colaboração.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Marcos Antonio Corrêa**, por ter me orientado durante todo período de estágio, pelos ensinamentos e pela amizade.

À professora Dra. **Vera Lucia Borges Isaac** pela companhia nos congressos, pela amizade e prontidão em ajudar em todos esses anos.

A toda minha **família**, em especial minhas tias que sempre estiveram presentes me auxiliando em todos os momentos.

Aos professores de outros laboratórios: Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof.<sup>a</sup> Dra. Maria Palmira Gremião, Prof.<sup>a</sup> Dra. Beatriz S. F. Cury, Prof.<sup>a</sup> Dra. Regina Cicarelli. Aos meus **colegas** de laboratório, que dividiram aprendizados, alegrias, conquistas, frustrações, tristezas, anseios que a pesquisa nos proporciona: Ana Carolina, Bruna, Gabi, Dani, Ilza, Nathália, Thais, Isabela, Fátima, Carol Kogawa, Andressa, Mariane, Eliane e Tahisa. À Fabíola, Jéssica, Natália, entre outros que compartilharam seus equipamentos e conhecimentos comigo.

À secretaria de pós-graduação, em especial a *Cláudia, Flávia, Daniela e Joyce*.

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

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

À **Fapesp** (Fundação de Amparo à Pesquisa) pelo apoio financeiro concedido.

## RESUMO

Os compostos fenólicos ocorrem de maneira universal no reino vegetal, sendo os ácidos cinâmicos integrantes desse grupo de compostos orgânicos. O ácido cafeico (AC) é um desses representantes, com potente ação antioxidante e induz a produção de colágeno, prevenindo o envelhecimento precoce da pele. As clássicas emulsões são muito utilizadas pelo consumidor pelo sensorial agradável e refrescante que proporcionam, no entanto, preparações desenvolvidas na forma de filme ou película seca apresentam-se como uma alternativa tecnológica pela sua facilidade e segurança no transporte, já que o peso e risco de vazamento são inconvenientes praticamente eliminados. O objetivo deste trabalho foi estudar da eficácia, citotoxicidade, estabilidade, liberação, permeação e retenção do ácido cafeico veiculado em um filme e uma emulsão através de experimentos *in vitro*. Dentre os estudos realizados constam as avaliações do Fator de Proteção Solar *in vitro*, da atividade inibidora da tirosinase, da atividade antioxidante através de duas metodologias analíticas (DPPH e ABTS), avaliação do potencial citotóxico, caracterização qualitativa do AC por ultravioleta e infravermelho, validação de uma metodologia analítica para quantificação de AC por CLAE e espectrofotometria no UV e estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*. O AC apresentou elevada atividade antioxidante, pode ser usado como um aditivo para incremento do FPS de formulações e sua atividade despigmentante poderia até ser considerada quando for aplicado em elevadas concentrações. Pelos estudos de citotoxicidade *in vitro* realizados verificou-se que o AC é seguro nas concentrações utilizadas. Também foi observada uma elevada liberação do ativo da formulação e permeação reduzida, indicando que ele foi capaz de permanecer retido na epiderme/derme, local onde deve ter ação. Os métodos analíticos desenvolvidos foram validados assegurando todos os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez estabelecidos. A emulsão foi submetida a diversas condições de estresse e manteve-se estável ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade acelerada. Palavras-chave: Ácido cafeico, Cosméticos, Emulsão, Antienvelhecimento, Permeação Cutânea.

## ABSTRACT

Phenolic compounds occur universally in the plant kingdom and cinnamic acids are part of this group of organic compounds. The caffeic acid is one of these representatives with powerful antioxidant activity, increasing collagen production and preventing premature aging of the skin. The classic emulsions are widely used by the consumer by providing pleasant refreshing sensorial, however, preparations developed in the form of dry film are presented as a technological alternative for its ease and safety in transportation. The aim of this study was to evaluate the efficacy, cytotoxicity, stability, release, permeation and retention of caffeic acid in a film and an emulsion through *in vitro* experiments. Among the studies are the evaluations of the Sun Protection Factor, the inhibiting tyrosinase activity, antioxidant activity using two analytical methodologies (DPPH and ABTS), evaluation of the cytotoxic potential, qualitative characterization of caffeic acid by ultraviolet and infrared absorptions, validation of analytical methods for quantification of caffeic acid by HPLC and UV spectrophotometry, and release studies, skin permeation and retention *in vitro*. Caffeic acid showed high antioxidant activity. It can be used as an additive to increase the SPF of formulations and its depigmenting activity could even be considered when applied at high concentrations. It was found that the caffeic acid is safe in the concentrations used, for *in vitro* cytotoxicity studies. A high release of active compound and reduced permeation was also observed, indicating that it was able to remain retained in the epidermis/dermis, where it should have action. The analytical methods developed were validated ensuring all parameters of linearity, specificity, precision, accuracy and robustness established. The emulsion was subjected to various stress conditions and remained stable throughout the 90 days in the accelerated stability study.

**Keywords:** Caffeic acid, Cosmetics, Emulsion, Anti-aging, Skin Permeation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação química dos compostos fenólicos.....	25
<b>Figura 2</b> - Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico: R1=R2=R3=R4=H; ácido <i>o</i> -cumárico: R2=OH; ácido <i>p</i> -cumárico: R3=OH; ácido cafeico: R2=R3=OH; ácido ferúlico: R2=OCH3 e R3=OH.....	26
<b>Figura 3</b> - Estrutura química do ácido cafeico e a formação da <i>orto</i> -quinona. ....	28
<b>Figura 4</b> - Esquema dos tratamentos na placa de 96 poços.....	47
<b>Figura 5</b> - Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do ácido cafeico.....	48
<b>Figura 6</b> - Preparação da formulação em filme em escala laboratorial.....	50
<b>Figura 7</b> - Tubos reacionais para obtenção da curva analítica do ácido cafeico. ....	70
<b>Figura 8</b> - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido cafeico pelo método de inibição do radical DPPH. ....	71
<b>Figura 9</b> - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH. ....	71
<b>Figura 10</b> - Tubos reacionais para obtenção da curva analítica do ácido cafeico. ....	72
<b>Figura 11</b> - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido cafeico pelo método de inibição do radical ABTS. ....	72
<b>Figura 12</b> - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical ABTS.....	73
<b>Figura 13</b> - Representação da molécula de ácido cafeico (a) e ácido ascórbico (b). ....	74
<b>Figura 14</b> - Representação esquemática das etapas da melanogênese. DHI: dihidroxi-5,6-indol; TPR-2: DOPA cromo tautomerase; DHICA: dihidroxi-5,6- indol 2-carboxilato). ....	75
<b>Figura 15</b> - Placa de 96 poços referente à determinação atividade inibidora de tirosinase pelo ácido cafeico.....	76
<b>Figura 16</b> - Perfil de inibição de tirosinase pelo AC.....	77
<b>Figura 17</b> - Perfil de inibição de tirosinase pelo AA. ....	77
<b>Figura 18</b> - Cultura de células HepG2 (1 a 6) e células HaCat (7 a 12) com MTT.....	78
<b>Figura 19</b> - Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de AC.....	79
<b>Figura 20</b> - Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de ácido cafeico.....	79

<b>Figura 21</b> - Espectro na região ultravioleta da solução de ácido cafeico na concentração de 4 µg/mL em solução de etanol e água (40:60).....	80
<b>Figura 22</b> - Espectroscopia de absorção na região infravermelho de ácido cafeico em pastilhas de KBr.....	81
<b>Figura 23</b> - Emulsão base e emulsão com AC a 1%.....	83
<b>Figura 24</b> - Formulação em filme.....	84
<b>Figura 25</b> - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 40 µg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm.....	86
<b>Figura 26</b> - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e placebo do filme, na concentração de 40 µg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm.....	86
<b>Figura 27</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em HCl 0,001 M, a 80°C.....	87
<b>Figura 28</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE( escala ampliada) para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em NaOH 0,001 M, a 80°C.....	87
<b>Figura 29</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em NaOH 0,001 M, a 80°C, comparando a mesma solução em água no tempo 0.....	87
<b>Figura 30</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em água, a 35°C.....	88
<b>Figura 31</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em água, a 80°C.....	88
<b>Figura 32</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em luz ultravioleta.....	88
<b>Figura 33</b> - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3% a 80°C.....	89
<b>Figura 34</b> - Curva analítica do AC obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.....	90
<b>Figura 35</b> - Cromatograma do ácido cafeico em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL, obtidas pelo CLAE a 325 nm.....	90
<b>Figura 36</b> - Curva analítica para quantificação do AC utilizando tampão fosfato pH 7,4 + 1% de polissorbato 80 como sistema solvente.....	95

<b>Figura 37</b> - Curva analítica para quantificação do AC utilizando metanol como solvente.....	95
<b>Figura 38</b> - Curva analítica do AC obtida pelo método espectrofotométrico, utilizando como solvente a solução de etanol 40%. .....	97
<b>Figura 39</b> - Curvas de fluxo da emulsão base e da emulsão com AC.....	103
<b>Figura 40</b> - Curva da viscosidade <i>versus</i> taxa de cisalhamento das emulsões base e com AC. ....	105
<b>Figura 41</b> - Varredura de tensão da emulsão base e da emulsão com AC. ....	105
<b>Figura 42</b> - Varredura de frequência da emulsão base e da emulsão com AC. ....	106
<b>Figura 43</b> - Ensaio de fluência e relaxação da emulsão base e da emulsão com AC. .	107
<b>Figura 44</b> - Formulações base (esquerda) e com AC (direita) após o teste de centrifugação.....	110
<b>Figura 45</b> - Valores de pH da emulsão base submetida a condições de estresse durante 90 dias de análise. ....	111
<b>Figura 46</b> - Valores de pH da emulsão com AC submetida a condições de estresse durante 90 dias de análise. ....	111
<b>Figura 47</b> - Densidade da emulsão base mantida em diferentes condições durante os 90 dias de avaliação da estabilidade. ....	112
<b>Figura 48</b> - Densidade da emulsão com AC mantida em diferentes condições durante os 90 dias de avaliação da estabilidade.....	112
<b>Figura 49</b> - Gráfico das concentrações experimentais ( $\mu\text{g/mL}$ ) e o desvio padrão de AC na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas. ....	113
<b>Figura 50</b> - Perfil cinético de degradação de emulsão de ácido cafeico através dos gráficos de ordem zero (a), ordem 1 (b) e ordem 2 (c). ....	115
<b>Figura 51</b> - Porcentagem de liberação do ácido cafeico das emulsões contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. a: gráfico de barras, b: linha de tendência.....	117
<b>Figura 52</b> - Quantidade em $\mu\text{g}$ de ácido cafeico liberado da emulsão contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. ....	118
<b>Figura 53</b> - Porcentagem de liberação do ácido cafeico dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. a: gráfico de barras, b: linha de tendência.....	118

<b>Figura 54</b> - Quantidade em $\mu\text{g}$ de ácido cafeico liberado dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. ....	119
<b>Figura 55</b> - Modelo Higuchi para a emulsão 1% AC .....	120
<b>Figura 56</b> - Modelo Higuchi para a emulsão 0,5% AC.....	120
<b>Figura 57</b> - Modelo Higuchi para a emulsão 0,2% AC.....	120
<b>Figura 58</b> - Modelo Higuchi para o filme 1% AC.....	121
<b>Figura 59</b> - Modelo Higuchi para o filme 0,5% AC.....	121
<b>Figura 60</b> - Modelo Higuchi para o filme 0,2% AC.....	121
<b>Figura 61</b> - Porcentagem de permeação do ácido cafeico das formulações nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.....	123
<b>Figura 62</b> - Porcentagem de ácido cafeico retido no estrato córneo e na epiderme/derme nas formulações.....	125

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Termos descritivos no teste de solubilidade. ....	43
Tabela 2 - Composição dos reagentes para medida da atividade antioxidante pelo método ABTS .....	45
Tabela 3 - Composição percentual da emulsão proposta. ....	50
Tabela 4. Composição percentual da formulação em filme proposta .....	51
Tabela 5 - Classificação dos testes. ....	52
Tabela 6 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade. ....	53
Tabela 7 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE.....	59
Tabela 8 - Solubilidade do AC em diferentes solventes a 25 °C .....	69
Tabela 9 - Composição percentual e função dos componentes da emulsão proposta. ...	82
Tabela 10 - Composição percentual e função dos componentes da formulação em filme proposta. ....	84
Tabela 11 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido cafeico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico. ....	89
Tabela 12 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido cafeico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método .....	91
Tabela 13 - Teste F da precisão interanalista do método de CLAE. ....	91
Tabela 14 - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AC por CLAE .....	92
Tabela 15 - Valores obtidos no teste de recuperação do AC na emulsão utilizando o método por CLAE .....	93
Tabela 16 - Valores obtidos no teste de recuperação do AC no filme utilizando o método por CLAE .....	93
Tabela 17 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AC.....	94
Tabela 18 - Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do AC.....	96

Tabela 19 - Valores absorvâncias do ácido cafeico a 325 nm no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofotométrico.....	98
Tabela 20 - Teste F da precisão interanalista do método espectrofotométrico. ....	98
Tabela 21 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação do AC pelo método espectrofotométrico. ....	98
Tabela 22 - Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do AC por espectrofotometria.....	99
Tabela 23 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por espectrofotometria para análise de AC .....	100
Tabela 24 - Valor máximo de compliância e recuperação das formulações. ....	107
Tabela 25 - Média das concentrações experimentais ( $\mu\text{g/mL}$ ) e o desvio padrão de AC na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas. ....	114
Tabela 26 - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação das emulsões contendo 0,2, 0,5 e 1% de ácido cafeico.....	120
Tabela 27 - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% de AC .....	121
Tabela 28 - Valores médios e desvio padrão das medidas de FPS das formulações (AC= ácido cafeico; FQ= filtro químico), obtidos por duas diferentes metodologias, espectrofotometria clássica e de reflectância. ....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA: ácido ascórbico

A/O - Água em Óleo

Abs: Absorvância

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

AC: Ácido cafeico

ANOVA: *Analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de variação

DMSO: Dimetilsulfóxido

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

DPR: Desvio padrão relativo

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HaCat: queratinócitos metabolicamente incompetentes

HepG2: células de hepatoma humano

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

INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MEM: meio de cultura (*Minimum Essential Media*)

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

O/A - Óleo em Água

PBS: Tampão fosfato (*Phosphate Buffer Saline*)

pH: potencial hidrogeniônico

r: Coeficiente de correlação linear

UV/vis: Ultravioleta/visível

UV: Ultravioleta

v/v: Volume por volume

EM: Espectroscopia de massas

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida Associada ao Espectro de Massas

ESI – MS: Espectrometria de massas por ionização electrospray

RMN: Ressonância magnética nuclear

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	22
2.1	A pele .....	22
2.2	Envelhecimento precoce da pele.....	23
2.3	Ácido cafeico .....	25
	Atividade antioxidante .....	27
	Citotoxicidade.....	32
	Métodos analíticos .....	33
	Aspectos gerais .....	35
2.4	Sistemas para veiculação de ativos .....	35
	Sistemas emulsionados.....	36
	Filmes poliméricos.....	36
2.5	Avaliação da eficácia e segurança de cosméticos .....	37
3	OBJETIVOS .....	40
3.1	Objetivos específicos.....	40
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	41
	Material .....	41
	Equipamentos .....	41
	Métodos.....	43
4.1	Caracterização do ácido cafeico.....	43
4.1.1	Avaliação da solubilidade do ácido cafeico.....	43
4.1.2	Avaliação do potencial antioxidante .....	44
4.1.2.1	Método de Inibição do radical DPPH.....	44
4.1.2.2	Método de inibição do radical ABTS.....	44
4.1.3	Determinação atividade inibidora de tirosinase .....	45

4.1.4 Avaliação do potencial citotóxico .....	46
4.1.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta .....	48
4.1.6 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho .....	49
4.2 Preparação das formulações .....	49
4.3 Desenvolvimento e validação de métodos quantitativos.....	51
Especificidade e Seletividade .....	53
Linearidade .....	54
Precisão .....	54
Limite de detecção .....	55
Limite de quantificação .....	55
Exatidão.....	55
Robustez.....	56
4.3.1 Validação do método de quantificação do AC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) .....	56
4.3.1.1 Especificidade/seletividade.....	57
4.3.1.2 Linearidade .....	57
4.3.1.3 Precisão .....	58
4.3.1.4 Limite de detecção.....	58
4.3.1.5 Limite de quantificação .....	58
4.3.1.6 Exatidão .....	58
4.3.1.7 Robustez .....	59
4.3.1.8 Curvas analíticas com solventes diferentes .....	59
4.3.2 Validação do método de quantificação do AC por espectrofotometria na região do ultravioleta60	
4.3.2.1 Especificidade/seletividade.....	60
4.3.2.2 Linearidade .....	60
4.3.2.3 Precisão .....	61
4.3.2.4 Limite de detecção.....	61

4.3.2.5 Limite de quantificação .....	61
4.3.2.6 Exatidão .....	61
4.3.2.7 Robustez .....	62
4.4 Caracterização dos sistemas .....	62
4.4.1 Caracterização do filme .....	62
4.4.1.1 Exame macroscópico dos filmes .....	62
4.4.1.2 Determinação do perfil de absorção de água .....	62
4.4.1.3 Propriedades mecânicas .....	63
4.4.2 Caracterização da emulsão .....	63
4.4.2.1. Caracterização reológica .....	63
4.4.2.2 Avaliação da estabilidade .....	64
4.4.2.2.1 Teste de centrifugação .....	64
4.4.2.2.2 Avaliação macroscópica .....	64
4.4.2.2.3 Determinação do pH .....	65
4.4.2.2.4 Determinação da densidade .....	65
4.4.2.2.5 Determinação do teor de AC .....	65
4.5 Avaliação do perfil de liberação do AC a partir das formulações e a permeação e retenção cutâneas do AC .....	66
4.5.1 Avaliação da liberação do AC contido nas formulações .....	66
4.5.2 Avaliação da permeação cutânea do AC contido nas formulações .....	67
4.5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AC contido nas formulações. ....	67
4.6 Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Fator de Proteção Solar das emulsões .....	68
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
5.1 Caracterização do ácido cafeico .....	69
5.1.1 Avaliação da solubilidade do ácido cafeico .....	69
5.1.2 Avaliação do potencial antioxidante .....	70
5.1.2.1 Método de inibição do radical DPPH .....	70

5.1.2.2 Método de inibição do radical ABTS .....	72
5.1.3 Determinação atividade inibidora de tirosinase .....	75
5.1.4 Avaliação do potencial citotóxico .....	78
5.1.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta .....	80
5.1.6 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho .....	81
5.2 Preparação das formulações .....	82
5.3 Desenvolvimento e validação de métodos quantitativos.....	85
5.3.1 Validação do método de quantificação do AC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	85
5.3.1.1 Especificidade/ seletividade.....	85
5.3.1.2 Linearidade .....	89
5.3.1.3 Precisão.....	91
5.3.1.4 Limite de detecção.....	91
5.3.1.5 Limite de quantificação .....	92
5.3.1.6 Exatidão .....	92
5.3.1.7 Robustez .....	93
5.3.1.8 Curvas analíticas com solventes diferentes .....	94
5.3.2 Validação do método de quantificação do AC por espectrofotometria na região do ultravioleta96	
5.3.2.1 Especificidade/ seletividade.....	96
5.3.2.2 Linearidade .....	97
5.3.2.3 Precisão.....	97
5.3.2.4 Limite de detecção.....	98
5.3.2.5 Limite de quantificação .....	99
5.3.2.6 Exatidão .....	99
5.3.2.7 Robustez .....	100
5.4 Caracterização dos sistemas .....	100
5.4.1 Caracterização do filme .....	100

5.4.1.1 Exame macroscópico dos filmes .....	100
5.4.1.2 Determinação do perfil de absorção de água .....	100
5.4.1.3 Propriedades Mecânicas .....	101
5.4.2 Caracterização da emulsão .....	102
5.4.2.1 Caracterização reológica.....	102
5.4.2.2 Avaliação da estabilidade .....	108
5.4.2.2.1 Teste de centrifugação .....	109
5.4.2.2.2 Avaliação Macroscópica.....	110
5.4.2.2.3 Determinação do pH.....	110
5.4.2.2.4 Determinação da densidade .....	112
5.4.2.2.5 Determinação do teor de AC por espectrofotometria na região do ultravioleta. .....	113
5.5 Avaliação do perfil de liberação do AC a partir das formulações e a permeação e retenção cutâneas do AC .....	116
5.5.1 Avaliação da liberação do AC contido nas formulações.....	116
5.5.2 Avaliação da permeação cutânea do AC contido nas formulações .....	122
5.5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AC contido nas formulações. ....	124
5.6 Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do fator de proteção solar das emulsões.....	126
6 CONCLUSÃO .....	127
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra cosmético vem do grego *kosmein*, fazendo referência a enfeitar, adornar, embelezar. No entanto, desde a Antiguidade até os dias atuais, os cosméticos ultrapassam o conceito de serem simplesmente preparações destinadas a conservar a beleza, já que cuidar bem da pele não é simples ato de vaidade, mas importante requisito para a manutenção da saúde e bem-estar geral do indivíduo (CORRÊA, 2012).

A qualidade de vida está diretamente ligada à estabilidade emocional, autoestima e à autoimagem positiva. A aparência da pele humana revela muito sobre seu portador já que reflete emoções, hábitos e tempo de vida (SABATOVICH & KEDE, 2004).

Cada vez mais estratégias têm sido sugeridas para que se mantenha a pele mais saudável e com aparência mais jovem, entre elas consta a utilização de compostos antioxidantes (MENON et al., 2009; LOBO et al., 2010).

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais que ocorrem de maneira universal no reino vegetal e fazem parte de um grande e complexo grupo de substâncias orgânicas. Os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma grande diversidade de compostos fenólicos, os quais conferem defesa contra os ataques dos radicais livres, que são formados como subprodutos provenientes do processo de fotossíntese e contra injúrias dos tecidos (SOARES, 2002). Dentre os compostos fenólicos, existem os derivados do ácido cinâmico, também chamados de fenilpropanoides, que são estruturas com nove carbonos, sendo o ácido cafeico (AC) um representante deste grupo.

Está claro que os consumidores buscam, cada vez mais, cosméticos mais eficientes, que se aproximem da definição de produto cosmetodermatológico, ou seja, apresentando realmente algum efeito biológico, principalmente na prevenção do envelhecimento precoce e de doenças como cânceres causados pela ação dos radicais livres no material genético celular. Portanto, assim como medicamentos, estes produtos devem também oferecer segurança ao consumidor.

Recentemente, a indústria cosmética e os pesquisadores têm procurado utilizar experimentos *in vitro*, em substituição a modelos animais, para o desenvolvimento de testes de eficácia e segurança de matérias-primas cosméticas, bem como as formulações cosméticas.

Além disso, o Regulamento CE 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009, relativo aos produtos cosméticos, banuiu os ensaios de toxicidade *in vivo* para ingredientes cosméticos a partir do ano de 2009, sendo que determinados ensaios, como para avaliação de dose tóxica (*repeated dose toxicity* – RDT) foram banidos desde março de 2013. Esta medida tomada pela União Europeia é uma tendência a ser adotada em todo o mundo. Seguindo esta tendência de substituição dos ensaios *in vivo* em cosméticos, este estudo utilizou técnicas *in vitro* para a avaliação da segurança e eficácia do produto desenvolvido.

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para obter diferenciação, qualitativa ou quantitativa, da capacidade antioxidante de compostos, tanto através de testes sem a utilização de células (testes químicos) ou utilizando culturas celulares (testes biológicos). Os testes químicos são mais rápidos e simples de serem executados (SOARES et al., 2005).

Com o intuito de manutenção da pele mais saudável e com aparência mais jovem, atenuando assim os efeitos do envelhecimento, cada vez mais estratégias têm sido sugeridas (MENON et al., 2009).

As emulsões são muito utilizadas como sistemas de liberação de ativos cosméticos para uso tópico, pois são além de serem mais aceitáveis pelos usuários, são de fácil aplicação e espalhamento na pele (GENARO, 2000; SMITH et al., 2000; FONSECA, 2007), de tal forma que, colher informações sobre o comportamento do AC presente nestes sistemas e possivelmente predizer o comportamento que tal inclusão proporciona no produto final é mais do que uma necessidade, é uma exigência

A utilização de filmes poliméricos no setor farmacêutico e alimentício não é novidade (BUNHAK et al., 2007), no entanto, despontam como inovação no segmento cosmético. Filmes poliméricos são preparações desenvolvidas na forma de uma película seca que ao serem aplicados na pele úmida, devem ser dissolvidos rapidamente, deixando sobre a mesma seus componentes. O benefício que esses produtos trazem é que podem ser transportados de modo prático e seguro, já que o peso e o risco de vazamento são inconvenientes praticamente eliminados (SINGH et al., 2008).

Um grande número de formulações tópicas com ação antioxidante tem sido lançado nos últimos anos, no entanto, poucos estudos relacionam a eficácia destes produtos e a segurança quanto à sua permeação através da pele. A relevância deste estudo baseia-se no uso cada vez mais frequente de cosméticos, dessa forma estudos que evidenciem e esclareçam as suas funções são de extrema importância.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A pele

A pele é um dos maiores órgãos do corpo humano, em um adulto pesa por volta de 4 kg, cobrindo uma superfície de cerca de 2 m<sup>2</sup> e recebe 1/3 da circulação sanguínea do corpo. Tem a espessura de alguns milímetros ( $2,97 \pm 0,28$  mm) e é responsável por separar a rede circulatória do sangue e os demais órgãos do corpo do ambiente externo. Ela ajuda a manter a temperatura corporal, evitando a perda excessiva de água pelo corpo, além de proteger o indivíduo contra a entrada de agentes químicos e ambientais danosos, particularmente os infecciosos como as bactérias, impurezas e radiação solar. Além disso, possui funções metabólicas, imunológicas e táteis (CHIEN, 2001).

Possui ainda várias estruturas anexas, que são os pelos, as unhas e as glândulas sudoríparas e sebáceas (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004).

A ciência, através da Cosmetologia, vem desenvolvendo vários estudos com o objetivo de melhorar a aparência da pele ou prevenir possíveis danos com a utilização de ativos (WILKINSON & MOORE, 1990; MENON et al., 2009).

A pele é composta por uma porção epitelial de origem ectodérmica, que chamamos de epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. O limite entre a epiderme e a derme é irregular, apresentando saliências e reentrâncias das duas camadas que se ajustam entre si (CORRÊA, 2012).

A epiderme pode ser dividida em duas partes: epiderme viável, onde ocorre a proliferação das células, que sofrem alterações e dão origem às células mortas do estrato córneo; e o estrato córneo, parte mais superficial, onde se realizam os mais variados estudos de penetração cutânea (PIROT et al., 1998; KUMAR et al., 2007).

O estrato córneo é formado por uma estrutura bifásica de lipídio-proteína e tem aproximadamente de 10 a 20 µm de espessura (PIROT et al., 1998), sendo composto por células anucleadas (corneócitos) dispersas em uma matriz rica em lipídios não polares. Essa matriz é constituída principalmente por ceramidas (18%), ácidos graxos livres (19%), esteroides (14%) e triacilgliceróis (25%). O estrato córneo requer no mínimo 10% de umidade para que sua flexibilidade seja mantida, e a camada de lipídios intercelulares é a responsável direta por evitar a perda de água transcutânea (FARTASCH, 1997).

Assim, pela sua estrutura e composição, o estrato córneo é a principal barreira limitante à difusão percutânea de fármacos (CORRÊA, 2012).

A derme é o elemento de sustentação e nutrição da epiderme e seus anexos. É um tecido essencialmente fibroso, constituído de fibras colágenas e elásticas, imersas em um gel mucopolissacarídico, onde o elemento celular principal é o fibroblasto. A camada superior da derme é formada por papilas que se projetam em direção à epiderme e que contêm vasos sanguíneos e linfáticos, as terminações nervosas e os apêndices cutâneos, como folículos pilosos, glândulas sebáceas e sudoríparas. Contém entre 20 e 40% da água total do corpo graças, em parte, às propriedades hidrofílicas dos proteoglicanos, responsáveis pela elasticidade e flexibilidade da pele (CHIEN, 2001).

Abaixo e em continuidade com a derme está a hipoderme, ou tecido subcutâneo, que, embora tenha a mesma origem da derme, não faz parte da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Este tecido subcutâneo funciona como uma reserva de gordura, com propriedades isolantes e protetoras; não possui um papel na penetração cutânea de fármacos porque se situa abaixo do sistema vascular. O acúmulo de gordura neste tecido representa um dos fatores contribuintes para a força tênsil da pele (SINGH et al., 2000).

## **2.2 Envelhecimento precoce da pele**

Algumas alterações podem ser observadas na pele ao longo dos anos em decorrência do envelhecimento, tais como ressecamento, pigmentação, aparecimento de rugas finas, sinais de flacidez até mesmo o surgimento de neoplasmas malignos. Essas alterações ocorrem devido ao afinamento da pele ocasionado pela redução no número de fibras colágenas. Isso é ainda mais frequente nas mulheres, em que a carência de estrógeno após a menopausa acarreta além da perda da massa óssea, um decréscimo nos níveis de colágeno na pele (YAAR & GILCHREST, 2001).

O envelhecimento é um processo natural e um tanto complexo, no qual os desgastes biológicos a nível celular resultam na diminuição da capacidade de realizar funções normais, tais como renovação celular (YAAR & GILCHREST, 2001). No entanto, alguns fatores podem ser responsáveis por acelerar este processo de envelhecimento (HADSHIEW et al., 2000).

Os fatores genéticos que levam ao envelhecimento são denominados fatores intrínsecos e podem alterar o metabolismo das células, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio a nível intracelular (HADSHIEW et al., 2000).

Já os fatores extrínsecos são fatores exógenos aos quais somos continuamente expostos e são representados principalmente pela exposição à radiação solar ultravioleta que contribui significativamente para o envelhecimento prematuro da pele. A exposição à fumaça do cigarro também é um fator extrínseco, já que o benzopireno nela contido atua fortemente no DNA modificando as bases de guanina. O uso excessivo de álcool, a má nutrição e a exposição aos poluentes emitidos pelos carros, indústrias, queimadas e substâncias químicas lançadas no meio ambiente sem controle também exacerbam a formação de radicais livres no organismo, levando ao envelhecimento (BERRA et al., 2006; TAGAMI, 2008; MENON et al., 2009).

As radiações solares ultravioletas são didaticamente divididas em três partes: UVA (315–400 nm), UVB (280–320 nm) e UVC (100–280 nm). A UVC, apesar de ser muito energética, é absorvida pela atmosfera e, por isso, não atinge a pele humana. Desta forma devemos nos preocupar com os danos causados à pele pela radiação UVA e UVB que não são bloqueadas pela camada de ozônio e atingem mucosas, os olhos e a pele (COUTEAU et al., 2001).

A radiação UVA é a responsável pela pigmentação imediata, o bronzeado e não provoca eritema, já a UVB é eritematógena (CORRÊA, 2012). Ambas podem ser refletidas, espalhadas ou absorvidas quando atingem a pele e ao serem absorvidas produzem modificações em moléculas gerando os radicais livres que causam danos oxidativos ao material genético, proteínas e lipídios celulares (PINNELL, 2003; MCCULLOUGH & KELLY, 2006), podendo causar fotoenvelhecimento e até câncer de pele (WULF et al., 2004; MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2004).

Contudo, a pele possui três sistemas naturais de proteção à penetração da radiação ultravioleta, sendo eles, a camada córnea, a secreção sudorípara e a melanina (CORRÊA, 2012).

O espessamento da camada córnea, além de impedir a perda de água e de não permitir a penetração de substâncias indesejáveis, tem a finalidade de absorver parte da radiação incidente (THOMSON, 1995; CORRÊA, 2012). O suor contém ácido urocânico, que tem capacidade de absorver radiação ultravioleta (HANSON et al., 1997; HANSON & SIMON, 1998). A melanina, pigmento responsável pela coloração da pele,

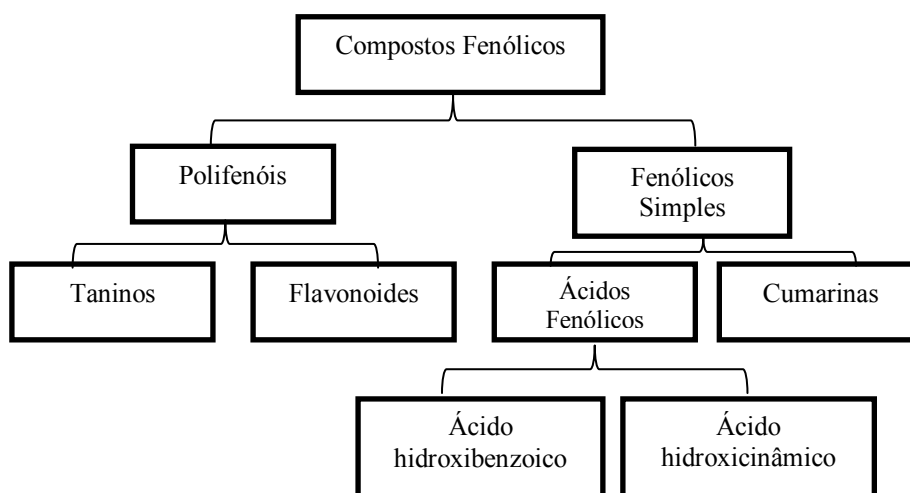
absorve em ampla faixa de comprimento de onda além de atuar sinergicamente com antioxidantes (NIELSEN et al., 2006; BRENNER & HEARING, 2008).

Cada vez mais estratégias têm sido sugeridas para que se mantenha a pele mais saudável e com aparência mais jovem, entre elas consta a utilização de compostos antioxidantes (MENON et al., 2009; LOBO et al., 2010).

### 2.3 Ácido cafeico

Os compostos fenólicos ocorrem de maneira universal no reino vegetal e fazem parte de um grande e complexo grupo de substâncias orgânicas. Os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma grande diversidade de compostos fenólicos, os quais conferem defesa contra os ataques dos radicais livres, que são formados como subprodutos provenientes do processo de fotossíntese e contra injúrias dos tecidos (SOARES, 2002). Os compostos fenólicos podem ser classificados em dois grandes grupos: grupo dos compostos fenólicos simples e grupo dos compostos polifenólicos, que podem ser observados através do quadro mostrado na Figura 1 (MELO & GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001).

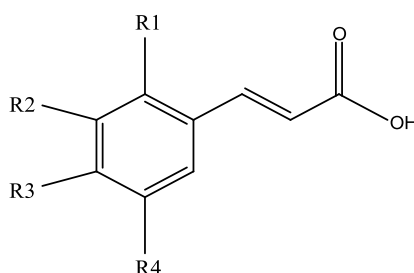
**Figura 1** - Classificação química dos compostos fenólicos.



Fonte: Adaptada de MELO & GUERRA, 2002; BURNS et al., 2001.

Os derivados do ácido cinâmico, também chamados de fenilpropanoides, são estruturas com nove carbonos (Figura 2). O ácido cafeico (AC) é um representante deste grupo.

**Figura 2** - Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos. Ácido cinâmico:  $R_1=R_2=R_3=R_4=H$ ; ácido *o*-cumárico:  $R_2=OH$ ; ácido *p*-cumárico:  $R_3=OH$ ; ácido cafeico:  $R_2=R_3=OH$ ; ácido ferúlico:  $R_2=OCH_3$  e  $R_3=OH$ .



Os consumidores exigem cada vez mais produtos e alimentos de alta qualidade que sejam minimamente processados e preferentemente sem conservantes. Aliado a isto, a legislação está cada dia mais rigorosa sobre o uso de conservantes, o que tem desafiado as indústrias (BRASIL, 2012). Por essa razão, compostos antimicrobianos naturais, como os polifenóis (WEN et al., 2003) começaram a ser utilizados.

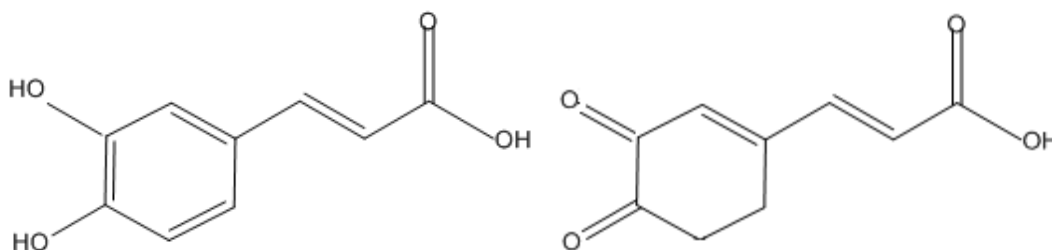
O AC é um dos metabólitos hidroxicinamatos ou fenilpropanoides mais amplamente distribuído nos tecidos das plantas. Este polifenol está presente em muitas fontes alimentares, incluindo bebidas de café, mirtilos, maçãs e cidras (CLIFFORD, 2000). Além dos alimentos, o AC está presente em vários medicamentos de uso popular, na maioria, à base de própolis (LUSTOSA et al., 2008). Além de agir como um inibidor carcinogênico (HUANG et al., 1992; GREENWALD, 2004), também é conhecido como um antioxidante e antibacteriano *in vitro*, podendo contribuir, para a prevenção de aterosclerose e outras doenças cardiovasculares (SANCHEZ-MORENO et al., 2000; VINSON et al., 2001; Worldwide Chemical Information, Trading & Advertising, 2014).

## Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes (SOARES et al., 2005). Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes, como quelantes de metais agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. Os ácidos fenólicos caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila ou metoxila na molécula, que conferem propriedades antioxidantes (DOSSIE DE ANTIOXIDANTES, 2014).

Os fenilpropanoídeos atuam como antioxidantes por eliminação dos radicais livres de oxigênio (CHEN & HO, 1997; MEYER et al., 1998) e quelando íons metálicos pró-oxidantes, especialmente ferro (PAIVA-MARTINS et al., 2002; HYNES et al., 2004). Os grupos hidroxila dessas moléculas conferem a atividade antioxidante, mas eles não são os únicos fatores na determinação da potência de suas atividades. No caso do ácido ferúlico, existe um único grupo hidroxila *para*-substituído em um anel aromático que está ligado a uma cadeia lateral conjugada. Esta *para*-substituição permite que os elétrons livres do radical fenóxi fiquem deslocalizados ao longo de toda molécula e, portanto, estabilizados (GRAF, 1992). A substituição *orto* do grupo metóxi, um doador de elétrons, é também um fator de aumento da estabilidade do radical fenóxi e, portanto, aumenta a sua eficiência antioxidante (CUVELIER et al., 1992; TERAQ et al., 1993). A presença de um segundo grupo hidroxila na posição *orto*, além da posição *para*, é conhecido por aumentar a atividade antioxidante devido à estabilização por uma ressonância adicional e formação *o*-quinona (Figura 3) (GRAF, 1992; CUVELIER, 1992; BRAND-WILLAMS, 1995). Isto pode ser usado para explicar o fato de que a eficiência de antioxidantes como AC é maior do que a do ácido ferúlico.

**Figura 3** - Estrutura química do ácido cafeico e a formação da *orto*-quinona.



O AC tem demonstrado ser um protetor de  $\alpha$ -tocoferol em lipoproteína de baixa densidade (LDL) (LARANJINHA et al., 1996). Além disso, a sua conjugação com outros produtos, tais como com os ácidos clorogênicos e caftárico demonstrou atividade antioxidante mais potente em diversos sistemas (MEYER et al., 1998;. FUKUMOTO & MAZZA, 2000).

Antioxidantes fenólicos naturais, incluindo o ácido cafeico e ácido ferúlico, ganharam atenção notável como promissores agentes fotoprotetores (YAMADA et al. 2006; MURRAY et al., 2008) e também têm estado presentes em produtos de cuidado para pele pela sua atividade antioxidante. Contudo, a literatura mostra poucas evidências sobre a utilidade dos ácidos hidroxicinâmicos para proteger a pele dos danos da fotoxidativos.

O metabolismo celular normal produz radicais livres, que incluem as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, que são derivados tanto de processos metabólicos normais e essenciais ao organismo (endógenos), quanto da exposição a fatores ambientais (exógenos) como poluição, radiações, pesticidas, tabaco, entre outros. Os radicais livres podem causar efeitos benéficos ou deletérios à saúde (HADSHIEW et al., 2000; YAAR e GILCHREST, 2001; MENON et al., 2009).

A importância das espécies reativas de oxigênio (ROS) e os radicais livres têm atraído atenção crescente ao longo das últimas décadas. ROS incluem radicais livres tais como radicais ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ) e espécies reativas de oxigênio tais como  $H_2O_2$  e oxigênio singlete ( $O_2$ ). Estas moléculas exacerbam fatores de lesão celular e processo de envelhecimento (GÜLÇIN et al., 2002).

ROS são continuamente produzidos durante eventos fisiológicos normais e eles podem facilmente iniciar a peroxidação de lipídeos da membrana, conduzindo à

acumulação de peróxidos lipídicos (DUH et al., 1999; BÜYÜKOKUROGLU et al., 2001). No entanto, as células desenvolveram mecanismos antioxidantes para protegerem-se da toxicidade promovida pelos radicais livres. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem: enzimas que removem cataliticamente os radicais como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD); proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre como, por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar espécies reativas de oxigênio via auto-oxidação como, por exemplo, glutathiona e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico (AA) e  $\beta$ -caroteno (CADENAS, 1989; BERRA et al., 2006).

Quando há desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, com predomínio dos oxidantes ocorre o estresse oxidativo (SCHAFER & BUETTNER, 2001; FINKEL & HOLBROOK, 2000), que está relacionado com danos lipídicos, proteicos e genéticos e por isso, implica em uma grande variedade de doenças humanas, assim como no processo de envelhecimento (VALKO et al., 2007).

Os radicais livres também agem sobre o tecido cutâneo, sendo originados principalmente por ações exógenas, como é o caso da radiação ultravioleta. Dependendo da dose, tempo de exposição, comprimento de onda e área exposta, a radiação ultravioleta pode causar desde queimaduras na pele e envelhecimento cutâneo precoce até danos ao DNA celular cutâneo e câncer de pele (COTINGUIBA et al., 2013).

Assim, o envelhecimento natural da pele associado à ação dos radicais livres provoca redução da hidratação da pele, eventualmente pigmentação e rugas finas, sinais de flacidez e aumento da possibilidade de aparecimento de neoplasmas. Outra mudança dérmica é a diminuição das fibras colágenas que torna a pele mais fina. Essas alterações são ainda mais evidenciadas após a menopausa, em que ocorre uma rápida diminuição dos níveis de colágeno na pele e na massa óssea, sugerindo que o estrógeno influencia na síntese de colágeno tanto na pele quanto na massa óssea (YAAR & GILCHREST, 2001).

Com o intuito de manutenção da pele mais saudável e com aparência mais jovem, atenuando assim os efeitos do envelhecimento, cada vez mais estratégias têm sido sugeridas (MENON et al., 2009). A utilização de compostos antioxidantes naturais ou sintéticos em alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres (LOBO et al., 2010).

Fotoenvelhecimento da pele é uma das preocupações dermatológicas mais comuns e pode tornar-se um importante problema de saúde por que está correlacionada com um aumento do risco de câncer de pele (YAAR & GILCHREST, 2007). A radiação UVA pode provocar danos clínicos, alterações histológicas e bioquímicas na pele através de alterações nas células e nas proteínas da matriz extracelular, incluindo o colágeno, responsável pela integridade estrutural da pele (FISHER et al., 1997; TYRRELL, 2012).

A radiação UVA (315-400 nm) tem demonstrado elevar a metaloproteinase-1 da matriz extracelular (colagenase MMP-1), a maior enzima proteolítica produzida pelas células da pele, que incluem os queratinócitos e fibroblastos (BRENNAN et al., 2003; PHILIPS et al., 2003). Esta ativação está relacionada ao estresse oxidativo, que ocorre quando há uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e/ ou depleção de defesas antioxidantes nas células (POLTE et al., 2004; PYGMALION et al., 2010).

Antioxidantes naturais e sintéticos agem como sequestradores de radicais livres e têm demonstrado promover fotoproteção da pele através da revogação da indução da atividade da MMP-1 mediada pela radiação UVA, além de regular a proliferação de queratinócitos e fibroblastos na pele (PHILIPS et al., 2003; WERTZ et al., 2004; VENDITTI et al., 2011).

A radiação ultravioleta A (UVA) desempenha um papel fundamental na patogênese do envelhecimento prematuro da pele através de citotoxicidade aos queratinócitos e degradação do colágeno, um componente principal da matriz extracelular, que fornece apoio estrutural. A proteção contra danos mediados por UVA através dos sistemas de defesa antioxidante tem sido proposta como um possível mecanismo pelo qual compostos de origem vegetal diminuem o processo de envelhecimento precoce da pele (PLUEMSAMRAN et al., 2012).

Além disso, sob estímulo da radiação solar UVA e UVB, os queratinócitos da pele humana podem secretar óxido nítrico (um radical envolvido nas reações de oxidação). O óxido nítrico (NO) parece ter grande participação na formação de eritema e inflamação da pele (HALLIWELL, 2012). Saija e colaboradores (2000) provaram que tanto o ácido cafeico quanto o ferúlico agem sequestrando radicais NO. À luz destas observações, a administração tópica de antioxidantes encontra interesse considerável, uma vez que representa uma estratégia efetiva para proteger a pele contra dano oxidativo mediado pelos raios UV (LOBO et al., 2010).

A extensão do eritema ocasionado pela radiação UVB pode ser monitorada por meio de espectrofotometria de refletância e por avaliação visual para o estudo *in vivo* dos danos na pele após exposição aguda à radiação UV (ALVES et al., 2013). Os ácidos cafeico e férulico, dissolvidos em soluções aquosas saturadas a pH 7,2, provaram proporcionar significativa fotoproteção à pele contra o eritema induzido pela radiação UV (SAIJA et al., 2000).

Os produtos antienvhecimento vêm sendo cada vez mais valorizados nos últimos anos e dentre eles destacam-se aqueles com ativos antioxidantes em sua composição (ABIHPEC, 2014).

Um estudo realizado por Gülçin (2006) mostrou claramente a eficácia antioxidante do AC empregando-se diferentes métodos de determinação da atividade antioxidante *in vitro*, incluindo a atividade antioxidante total resultante pela aplicação do método tiocianato férrico, método de inibição do radical ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>, radical ânion superóxido e atividade quelante de metais. Tais ensaios foram aplicados em comparação com compostos antioxidantes convencionais, tais como BHA, BHT,  $\alpha$ -tocoferol, um antioxidante natural e trolox, que é um análogo hidrossolúvel do tocoferol.

Marti-Mestres e colaboradores (2007) estudaram três fenilpropanoides antioxidantes relacionados com a limpeza de radicais superóxido e radicais hidroxila, dentre eles o AC. Verificou-se a permeação cutânea desses compostos, já que podem ser usados na dermocosmética, a fim de proteger a pele contra o estresse oxidativo induzido por radiação UV. Foi observado que o AC conseguiu ultrapassar todas as camadas da pele de orelha de porco, podendo apresentar uma atividade sistêmica. Saija e colaboradores (2000) também realizaram estudos de permeação com pele humana e também comprovaram a capacidade do ácido cafeico e férulico em permear a pele, característica independente do pH da solução receptora ser 3,0 ou 7,2.

Como a radiação solar penetra profundamente na pele, deve-se garantir que substâncias aplicadas topicamente consigam permear através do estrato córneo, o principal obstáculo contra permeação de substâncias exógenas através da pele e que atinjam as camadas mais profundas a fim de promover satisfatória fotoproteção (TRAN, et al., 2008; WANG, et al., 2010).

A absorção de um composto na pele é determinada pelas suas características físico-químicas, sendo a lipofilicidade e o peso molecular as mais importantes quando se trata do processo de permeação (ALLEVATO, 2007). Assim, a alta lipofilicidade do

ácido cafeico e do ácido ferúlico pode contribuir para a permeação através do estrato córneo.

Os ácidos cafeico e ferúlico também demonstram eficiência em proteger a fosfatidilcolina da peroxidação provocada pela radiação UV, o que é relevante já que a fosfatidilcolina é um dos principais constituintes de bicamadas lipídicas das membranas celulares (SAIJA et al., 1999).

### **Citotoxicidade**

O ácido cafeico e seus derivados, como o fenil éster do ácido cafeico, têm ação contra câncer bucal e no cólon, bem como são inibidores da ciclo-oxigenase II (COX-2) (MICHALUART et al., 1999; WEYANT et al., 2000; CESCHEL et al., 2002). Sabe-se também que são citotóxicos para tumores, mas não para as células normais (CHIAO et al., 1995; RUSSO et al., 2002).

Uma análise por citometria de fluxo mostrou que o AC e seus derivados provocaram aprisionamento celular de células de carcinoma epidermoide oral, Meng-1 (OEC-M1) na fase G2/M de divisão celular. Tais efeitos diferenciais sobre o câncer mostram que estes compostos podem ser úteis na quimioterapia do câncer oral (LEE et al., 2005).

Vários compostos antioxidantes naturais foram testados por Ketsawatsakul (2007), dentre eles AC, catequina, epicatequina e quercetina para avaliar a redução da citotoxicidade induzida por peroxinitrito em células de condrossarcoma. Esta observação sugere que dietas ricas em compostos antioxidantes são capazes de limitar a citotoxicidade das células.

Um derivado do AC, o fenil éster do ácido cafeico foi utilizado por Koru e colaboradores (2009) e foi verificado que ele inibiu o crescimento e secreção de IL-6, e induziu apoptose de forma dose e tempo dependentes em células de mieloma múltiplo ARH-77. Por isso, tanto o AC quanto seu derivado merecem um estudo mais aprofundado como um agente eficaz contra o mieloma múltiplo.

O tratamento de camundongos com própolis, fenil éster do ácido cafeico e com o próprio AC reduziu significativamente o número de nódulos tumorais no pulmão dos animais, cujos nódulos pulmonares foram gerados por injeção de células tumorais viáveis por via intravenosa. Em estudos *in vitro*, a própolis não afetou o crescimento de

células tumorais, enquanto o fenil éster do ácido cafeico e o AC expressaram um forte efeito citotóxico às células (BASIC et al., 1998).

A p38, uma proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), responde a estímulos como calor, choques, citocinas, radiação UV e está diretamente envolvida na proliferação celular e produção de NO (DING et al., 2008). O AC reduz significativamente a expressão do RNAm de IL-10 induzida por UVB em murinos e também inibe a ativação de p38- MAPK (STANIFORTH et al., 2006). O AC também atenua a capacidade migratória de queratinócitos malignos (YANG et al., 2013).

### **Métodos analíticos**

Não existe até hoje nenhum método analítico para determinação e quantificação de AC nos compêndios oficiais, no entanto a maioria dos artigos atuais preconiza quantificação da referida substância por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Para determinação de ácidos rosmarínico e cafeico em várias ervas aromáticas, como alecrim, sálvia, tomilho, hortelã, erva-cidreira e lavanda, foi desenvolvido e validado um método por CLAE. O sistema de separação consistia numa coluna fase reversa C18, um sistema de eluição de gradiente de metanol/água contendo ácido fosfórico, e um detector de arranjo de fotodiodos. O método demonstrou-se simples, sensível, reprodutível e ideal para a análise rápida de rotina (WANG et al., 2003).

Para quantificação da solução receptora em um estudo de permeação, a cromatografia foi realizada em uma coluna ODS Hypersil (tamanho de partícula: 5 µm, 25 cm x 4,0 mm). A fase móvel foi acetonitrila:água (18:82), contendo 2% de ácido acético. A vazão foi fixada em 1,0 mL/min. Cada amostra foi filtrada antes da injeção utilizando filtro Millex e uma alíquota (20 µL) foi injetada no aparelho de CLAE. A detecção foi efetuada a 302 nm (SAIJA et al., 2000).

Marti-Mestres e colaboradores (2007) também realizaram estudo de permeação aplicando 50 µL da formulação teste (2% de AC, em transcutol-propilenoglicol 1:1) sobre a pele da orelha de porco e utilizaram solução salina isotônica (NaCl 0,9%) com 1% de gentamicina a pH 7,0 como solução receptora. Esta solução foi mantida a temperatura de 37°C e nestas condições a temperatura da pele é 32°C, que corresponde à temperatura *in vivo* da superfície corpórea. A quantificação da solução receptora também se deu por CLAE com detector UV, coluna C-8 fase reversa (5 µm x 25 cm x 3

mm) a 40°C. A fase móvel foi acetonitrila: água (18:80) com 2% de ácido acético e vazão de 0,5 mL/min. A detecção foi a 330 nm e o tempo de retenção foi aproximadamente 6,0 minutos.

Técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas na separação, purificação, quantificação e identificação de substâncias. Embora a CLAE seja um método robusto, é mais adequada para misturas com as composições conhecidas. Para identificação de substâncias desconhecidas em amostras complexas os métodos mais adequados são a Espectroscopia de Massas (EM) ou Cromatografia Líquida Associada ao Espectro de Massas LC-MS/MS. Muitos trabalhos têm sido publicados nos últimos anos sobre a análise de AC por LC-MS/MS .

Um exemplo da identificação do AC em uma matriz complexa foi realizada para a análise simultânea de alcamidas e derivados do AC em extratos de *Echinacea purpurea*. A análise foi realizada por CLAE fase reversa acoplada à espectrometria de massas por ionização *electrospray* (ESI - MS). A vazão foi ajustada para 0,2 mL/min e os eluentes foram A=água + 1 % de ácido acético e B=acetonitrila. As condições de gradiente foram as seguintes: 90 % de A em B durante 4 min; 90-60 % de A em B de 4 a 15 min; 60-40 % de A em B 15 a 30 minutos; 100 % de B de 30 para 35 min; 90 % de A em B 35-43 min. A saída da coluna de CLAE foi conectada diretamente à fonte de ionização por *electrospray* de um espectrômetro de massas *ion trap*. O espectrômetro de massas foi operado no modo de íons negativos para os primeiros 15 minutos da análise, em seguida, transferido para o modo de íons positivos. O tempo total de análise foi de 43 minutos. Este novo método mostrou-se eficaz para o controle de qualidade destes extratos que exigem métodos rápidos para determinar sua composição química (WANG et al., 2004).

Outro método foi desenvolvido e validado para avaliar de forma qualitativa e quantitativa os extratos hidroalcoólicos *Myrcia bella*. No total, 24 constituintes foram caracterizados, incluindo os ácidos fenólicos, tais como o AC, por meio de extensas análises cromatográficas preparativas, juntamente com técnicas de espectroscopia de massas e ressonância magnética nuclear (RMN). Isso mostra que a espectroscopia de massas e a RMN são técnicas muito úteis para identificação direta e rápida dos constituintes após isolamento (SALDANHA et al., 2013).

O plasma é outro tipo de matriz de complexa em que AC pode ser encontrado. Um método foi desenvolvido e validado para determinação simultânea de hidroxicinamatos como AC, ácido di-idrocafeico, ácido ferúlico, ácido di-idroferúlico e

ácido isoferúlico no plasma humano como metabólitos derivados do consumo de café. A determinação foi feita utilizando-se CLAE acoplada a espectrofotômetro de massas com ionização por *electrospray* no modo negativo (GUY et al., 2009). Estas mesmas técnicas foram utilizadas em conjunto para desenvolver um método simples, rápido e sensível para quantificação simultânea de ácido clorogênico e AC em plasma de ratos (WANG et al., 2006).

### Aspectos gerais

Nome genérico: Ácido Cafeico (CAS 331-39-5)

Nome químico: 3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid

Fórmula química: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>

Composição percentual: C 60,00%; H 4,48%; O 35,52%

Massa molecular: 180,16 g/mol

Densidade: 1,478 g/cm<sup>3</sup>

Propriedades físico-químicas: Apresenta-se na forma de um pó cristalino amarelo claro.

Parcialmente solúvel em água fria. Facilmente solúvel em água quente e etanol.

Ponto de fusão: 223-225°C

Categoria: Antioxidante.

Biossíntese: O ácido cafeico é biossintetizado através de uma hidroxilação do ácido clorogênico.

pKa: O pKa do AC foi calculado usando *software* ACD/Labs 6.0 que exibiu valores de 12,79 e 9,97 para as hidroxilas e 4,04, para o grupo carboxílico presentes na estrutura química do AC.

Log P: 1,42 ± 0,36

### 2.4 Sistemas para veiculação de ativos

Os cosméticos são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado (BRASIL,

2005; SANFELICE & TRUITI, 2010). O Brasil é o terceiro maior mercado de cosméticos do mundo e este segmento é um dos mais bem-sucedidos da atualidade (PACHIONE, 2006). Esse crescimento é decorrente de lançamentos constantes de novos produtos, visando atender às necessidades do mercado e exigências do consumidor.

Dentre as maiores necessidades do mercado cosmético estão os produtos com ação antioxidante, que visam proteger a pele dos danos provocados pelos radicais livres. No entanto, para que possam ter efeito, as substâncias antioxidantes precisam ser liberadas da formulação na qual estão incorporadas e devem ser capazes de permear as barreiras naturais da pele. Por isso, a escolha do sistema de liberação a ser empregado deve ser criteriosa (CLÉMENT et al., 2000).

### **Sistemas emulsionados**

As emulsões são muito utilizadas como sistemas de liberação de fármacos ou de ativos cosméticos para uso tópico, pois são muitas as vantagens que elas oferecem sob o ponto de vista farmacêutico e cosmético (GENARO, 2000; SMITH et al., 2000; FONSECA, 2007).

Entretanto, os sistemas emulsionados são termodinamicamente instáveis, pois são formados por misturas complexas, de uma grande variedade de excipientes com características apolares ou polares, imiscíveis entre si, e são estabilizadas por um agente tensoativo emulsificante. Dependendo da fase externa ou também denominada dispersante, as emulsões podem ser classificadas em O/A (óleo em água) e A/O (água em óleo) (SILVA & SOARES, 1996; PRISTA, 2008; CORRÊA, 2012).

Durante o desenvolvimento de uma emulsão cosmética, além do aspecto estético da formulação, o delineamento das propriedades físicas e da estabilidade é fundamental (MOSTEFA et al., 2006), pois as emulsões podem sofrer alterações em decorrência da temperatura, transporte e tempo de armazenamento (ISAAC et al., 2008).

### **Filmes poliméricos**

A utilização de filmes poliméricos no setor farmacêutico e alimentício não é novidade, já que servem de revestimento para sistemas terapêuticos sólidos orais,

controle de liberação de fármacos e para a obtenção de embalagens ou produtos comestíveis biodegradáveis (BUNHAK et al., 2007; SINGH et al., 2008).

A produção de cosméticos em filme, particularmente no Brasil, ainda não é comum. Dentre as diferentes possibilidades, vale ressaltar o desenvolvimento de produtos destinados a serem aplicados em pequenas áreas tais como as dos olhos ou faciais.

Filmes poliméricos são preparações desenvolvidas na forma de uma película seca que ao serem aplicados na pele úmida, devem ser dissolvidos rapidamente, deixando sobre a mesma seus componentes. O benefício que esses produtos trazem é que podem ser transportados de modo prático e seguro, já que o peso e o risco de vazamento são inconvenientes praticamente eliminados.

Um exemplo de agente formador de filme já muito utilizado industrialmente é o Pullulan<sup>®</sup>, produto comercial formado por fermentação à base de polissacarídeo natural, constituído de unidades de maltotriose (KHAN et al., 2007). Ele pode ser usado como substituto do amido, como agente adesivo, para melhorar a aparência e a vida de prateleira e em embalagens comestíveis na indústria de alimentos, e na produção de cápsulas, comprimidos, pílulas, grânulos e sistemas de liberação controlada na indústria farmacêutica (KHAN et al., 2007; SINGH et al., 2008).

Por não ser tóxico nem irritante para o corpo humano, pode ser aplicado em qualquer cosmético, mas tem sido mais utilizado como ingrediente em produtos para a área dos olhos, em xampus, dentifrícios, pós e loções cosméticas (SINGH et al., 2008).

## **2.5 Avaliação da eficácia e segurança de cosméticos**

Até há pouco tempo, os cosméticos não apresentavam riscos ou danos à saúde, ou se os apresentavam, simplesmente não eram considerados. Atualmente, em virtude da conscientização das pessoas, juntamente com a globalização e o avanço tecnológico, a avaliação da eficácia e segurança de um cosmético, tornou-se um dos itens de maior importância na produção de um produto. Os serviços de atendimento ao consumidor foram sendo criados nas empresas, impulsionando a cosmetovigilância, regulamentada no Brasil pela RDC 332/05 (BRASIL, 2005) o que contribuiu com a eliminação de caráter “supérfluo” atribuído ao produto cosmético (CHIARI et al., 2012b).

O consumidor está cada dia mais preocupado com sua saúde e aparência, e com as agressões ambientais a que é continuamente exposto. Portanto, cabe à ciência o

desafio de trazer para mercado produtos que tenham a arte científica, acoplada à eficácia, segurança e preservação ambiental (CHIARI et al., 2012b)..

É atribuída ao fabricante importador ou responsável técnico a total responsabilidade de inserir no mercado um produto que apresente segurança nas condições normais e previsíveis de uso. Porém, como não se pode excluir a possibilidade de riscos, o técnico responsável deverá recorrer aos recursos existentes com o intuito de reduzir possíveis danos ao usuário (BRASIL, 2003).

Diante da complexidade dos parâmetros que envolvem a avaliação do risco, deve ser observado principalmente o dano, o perigo e o risco que o produto poderá causar, considerando os parâmetros toxicológicos dos ingredientes com base em dados atualizados, observando as condições de uso do produto cosmético e o perfil do consumidor alvo (ROGIERS & PAUWELS, 2008).

Com o objetivo de oferecer segurança aos usuários, garantindo que as substâncias utilizadas nos cosméticos não causem danos aos seres humanos, muitos deles são testados em animais (BAKER & BRUNER, 1997; DRILL & LAZAR, 1997).

Dentre os testes utilizados para avaliação de segurança de produtos cosméticos em animais estão: toxicidade aguda oral, comedogenicidade, teste de sensibilidade de pele, irritação ocular, fototoxicidade e citotoxicidade. Existe uma grande divergência na opinião dos pesquisadores a respeito da utilização de animais em pesquisa e, portanto, cabe a eles o bom senso e a busca de abordagens alternativas, evitando sempre que possível a morte e o sofrimento desnecessários dos animais de experimentação (GOLDBERG, 1989; ALTERNATIVES TO ANIMAL TESTING, 2003; FILIPE & GOMES, 2006; BRASIL, 2012).

Para evitar a utilização abusiva de animais, o meio científico tem aplicado a política dos 3 Rs (*replace, reduce, refine*) introduzida por Russel & Burch (1959), que significa substituir, reduzir e refinar. Esta política não impede a utilização dos modelos animais na pesquisa, porém, defende a sua utilização de forma adequada e humanitária (MARONA & LUCCHESI, 2003).

Como alternativa para utilização de animais, existem os testes *in vitro*, que embora não sejam completamente intercambiáveis aos ensaios biológicos, fornecem resultados preliminares e exploratórios a respeito da eficácia e segurança de produtos cosméticos.

Recentemente, foi aprovado o Projeto de Lei nº 777 que proíbe o uso de animais para desenvolvimento, experimentos e testes de produtos cosméticos, de

higiene pessoal, de perfumes e seus componentes em todo o Estado de São Paulo. Testes em animais para fabricação de cosméticos estão proibidos e a multa para quem descumprir a lei será de aproximadamente R\$ 1 milhão, por animal (BRASIL, 2014).

Ensaio como a avaliação da atividade antioxidante, avaliação da atividade inibidora de tirosinase, determinação do fator de proteção solar (FPS) da formulação, avaliação do perfil de liberação da formulação, entre outros, são ensaios que podem ser realizados inicialmente *in vitro* podendo prever a eficácia evitando o uso de animais em etapas pré-clínicas.

Assim como a avaliação da eficácia, a segurança de produtos cosméticos pode ser avaliada com testes *in vitro* como é o caso do ensaio de citotoxicidade, que não garante a segurança do produto, mas fornece informações preliminares importantes a respeito da concentração do produto capaz de provocar letalidade celular.

Os testes *in vitro* tornaram-se importantes ferramentas para que a avaliação da segurança e eficácia de produtos cosméticos seja assegurada o que também é uma tendência visto que o Regulamento (CE) nº 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relacionados aos produtos cosméticos, já não aceitam a realização de testes em animais.

### 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar da eficácia, citotoxicidade, estabilidade, liberação, permeação e retenção do ácido cafeico veiculado em um filme e uma emulsão através de experimentos *in vitro*.

#### 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a solubilidade do AC em diversos solventes.
- Avaliar atividade inibidora da tirosinase e atividade antioxidante do AC.
- Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* do AC.
- Caracterizar qualitativamente o AC por espectrofotometria na região do ultravioleta e infravermelho.
- Desenvolver emulsões e preparação cosmética em filme.
- Avaliar o Fator de Proteção Solar *in vitro*.
- Validar metodologia analítica para quantificação de AC por CLAE e espectrofotometria na região do ultravioleta.
- Avaliação da estabilidade acelerada e caracterização reológica da emulsão.
- Caracterização do filme através de exame macroscópico, perfil de absorção de água e propriedades mecânicas.
- Realizar estudos de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Água destilada, água ultrapura, obtida por sistema Milli-Q® (Malsheim, França), etanol (Synth, Tec-Lab e Chemis), tampão fosfato pH 7,4, metanol (J.T. Baker®, Xelostoc, México), grau CLAE; ácido acético (J.T. Baker®, EUA) grau analítico. Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico (Galena), ABTS (Sigma), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), meio de cultura MEM (Cultilab), soro fetal bovino (Cultilab), antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) (Sigma), tripsina (Gibco), PBS (phosphate buffer saline), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), álcool isopropílico (Merck), Cetareth – 20, Cetoesterayl alcohol, Glyceryl stearate, Diisopropyl adipate, Ethylhexyl stearate, Methylparaben, Propylparaben, EDTA, Propylene glycol, Pullulan, Rapithix-100, ácido cafeico (Sigma Aldrich), ácido cafeico (Nanjing Zelang Medical Technology). Placas estéreis de 96 poços para cultura celular (TPP), tubos de 15 mL estéreis (TPP), garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm<sup>2</sup> (TPP), membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich), fita adesiva (Scotch - 3M). Foi utilizada membrana de nitrato de celulose de 0,45 µm de diâmetro de poro e 47 mm de diâmetro (Sartorius®, Gettinge, Alemanha) para filtrar a fase móvel e membrana com poro de 0,45 µm e 15 mm de diâmetro (Macherey-Nagel®, Düren, Alemanha) para filtrar as soluções de AC padrão e amostra.

### Equipamentos

Pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), estufa de ar circulante (Soc Fabel modelo 170), centrífuga (Eppendorf 5810 R), centrífuga Fanem-Baby, leitor de placas (Bio-rad Model 550), equipamento de permeação Microette (Hanson Research), ultra-som (Unique Ultrasonic Clear), agitador de tubos (Phoenix AP56), dermatômetro (Nouvag TCM300), câmera digital (Sony DSC-S500), estufa de CO<sub>2</sub> (Shel Lab), estufa (Quimis), peagômetro digital (Gehaka PG 1800), balança analítica (Bel Engineering). O sistema cromatográfico utilizado foi o cromatógrafo a líquido Waters®, composto de bomba cromatográfica gradiente binária

Waters®, injetor manual Rheodyne Breeze® 7725i e detector de absorvância UV-VIS Waters® 2487; equipado com *software* Empower®. Foi utilizada coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters). As soluções constituintes da fase móvel foram desgaseificadas em ultrassom (Unique®, Indaiatuba, Brasil). O reômetro foi o AR2000ex da TA Instrument com sensor do tipo cone-placa de 40 mm (Serial Number: 993466). Espectrofotômetro SHIMADZU modelo IR-PRESTIGE 21 na espectrofotometria de absorção na região do infravermelho e o equipamento espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu®, modelo UVmini-1240 para espectrofotometria na região do ultravioleta. Analisador universal de textura (TA-XT2 - Stable Micro Systems) equipado com prova em aço inoxidável com ponteira esférica (D=2,5cm).

## Métodos

### 4.1 Caracterização do ácido cafeico

#### 4.1.1 Avaliação da solubilidade do ácido cafeico

Embora o teste de solubilidade não possa ser tomado no sentido estrito de constante física, ele complementa os demais ensaios, sendo preditivo na determinação da melhor solubilidade para testes quantitativos, podendo ter um valor definitivo caso a substância não apresente a solubilidade mínima exigida, principalmente, no solvente água (Farmacopeia Brasileira, 2010).

Todas as determinações foram realizadas em tubos de ensaio com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, com auxílio de micropipetas e agitador Phoenix modelo AT: 56. Os solventes utilizados foram: água purificada, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, tampão fosfato (pH 7,4) com 1% de polissorbato 80, solução de etanol: água 40:60 pH 2,5 ajustado com ácido acético glacial. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

Foram transferidos 10 mg de ácido cafeico para os tubos de ensaios, aos quais foram adicionadas alíquotas crescentes de solvente sob agitação em agitador para observação quanto à dissolução do produto. O ensaio de solubilidade foi realizado a 25°C conforme o preconizado na Farmacopeia Brasileira, 2010. A solubilidade encontrada é designada por termos descritivos como consta nas monografias e os seus significados estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Termos descritivos no teste de solubilidade.

<b>Termo descritivo</b>	<b>Solvente</b>
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira.

## 4.1.2 Avaliação do potencial antioxidante

### 4.1.2.1 Método de Inibição do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo metodologia descrita por Mensor et al. (2001) e Chiari et al. (2012).

Um mililitro da solução aquosa de AC, em diferentes concentrações (de 0 a 4,57 µg/mL), foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,004%). As soluções foram mantidas ao abrigo da luz e após 30 minutos foi determinada a absorvância das soluções a 515 nm.

Foram utilizadas soluções controle contendo apenas 1 mL de água e 2,5 mL da solução metanólica de DPPH a 0,004%. A média das absorvâncias destas amostras foi usada como a absorvância máxima, servindo para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (Equação 1) (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ inibição do radical DPPH} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_{amostra}}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$  é a absorvância do DPPH em 515 nm na ausência de amostra (controle)

$Abs_{amostra}$  é a absorvância do DPPH em 515 nm na presença de amostra.

O ensaio também foi realizado para o ácido ascórbico, como padrão antioxidante, em diferentes concentrações.

O ensaio do DPPH para cada concentração foi realizado em triplicata.

### 4.1.2.2 Método de inibição do radical ABTS

A atividade antioxidante do AC pelo método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS<sup>++</sup>) foi avaliada seguindo método proposto por Almeida et al. (2013).

O radical ABTS é formado através de uma reação com persulfato de potássio. Inicialmente, preparou-se uma solução estoque de 7 mM de ABTS (192 mg diluídos em 50 mL de água) e outra solução estoque de 140 mM de persulfato de potássio (378,4 mg

em 10 mL de água). Para a preparação do radical, misturou-se 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução estoque de persulfato de potássio. Esta solução foi mantida a temperatura ambiente por 16 h em frasco âmbar. Decorrido este tempo, diluiu-se uma alíquota desta mistura em etanol, a fim de obter absorvância de aproximadamente  $0,7 \pm 0,05$ . Em seguida, transferiu-se 3 mL dessa solução a 11 tubos de ensaio. Nos mesmos tubos, foram acrescentados volumes crescentes de solução estoque de AC na concentração de 300 µg/mL e volumes decrescentes de água, sendo que cada concentração foi realizada em triplicata. As quantidades das substâncias e as respectivas concentrações de AC no tubo estão representadas na Tabela 2. O mesmo experimento foi realizado substituindo o AC pelo ácido ascórbico (AA).

Tabela 2 - Composição dos reagentes para medida da atividade antioxidante pelo método ABTS.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Volume solução estoque de AA/AC (µL)	0	5	7	10	12	15	17	20	22	25	30
Volume água (µL)	30	25	23	20	18	15	13	10	8	5	0
Volume solução de ABTS (mL)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Concentração final de AA/AC (µg/mL)	0	0,49	0,69	0,99	1,18	1,48	1,68	1,98	2,17	2,47	2,97

Posteriormente, foram determinadas as absorvâncias a 734 nm de todos os tubos de ensaio, visto que uma vez conhecida a absorvância, é possível calcular a porcentagem de inibição do radical livre através da equação 2 (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ inibição do radical ABTS} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_{amostra}}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$  é a absorvância do ABTS em 734 nm na ausência de amostra (controle)

$Abs_{amostra}$  é a absorvância do ABTS em 734 nm na presença de amostra

#### 4.1.3 Determinação atividade inibidora de tirosinase

A avaliação da atividade inibidora de tirosinase do AC foi realizada segundo Khzaeli e colaboradores (2009). Este método tem como princípio a inibição da atividade da tirosinase, o que implica diminuição da transformação de L-dopa em dopaquinona por reações catalisadas pela enzima. Em placas de 96 poços foram

adicionados 80 µL da solução de AC em diferentes concentrações (0 a 22,2 mg/mL), 45 µL de solução de L-dopa (4,5 mM) e 25 µL de solução de tirosinase (80 unidades/mL), em todas as soluções utilizou-se tampão fosfato pH 6,8 como solvente. Após 10 minutos, os valores de absorvância foram analisados em leitor de placas a 490 nm.

O mesmo procedimento foi realizado utilizando diferentes concentrações de ácido ascórbico (0 a 0,53 mg/mL) para compará-lo com a atividade inibidora de tirosinase do AC.

Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da atividade da tirosinase e são calculados segundo a equação (3):

$$\%inibição = \left(1 - \frac{Abs\ amostra}{Abs\ controle}\right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Em que,

% Inibição = porcentagem de inibição da atividade da tirosinase;

$Abs_{amostra}$  = absorvância na presença de amostra em 490 nm;

$Abs_{controle}$  = absorvância quando a concentração de AC é nula em 490 nm.

A partir dos valores de porcentagem de inibição foi possível obter a curva analítica e calcular a porcentagem de inibição expressa em valor de  $IC_{50}$ , quantidade de substância necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase.

#### 4.1.4 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação de citotoxicidade foi realizada através do método de MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide), ensaio colorimétrico em que se determina a quantidade de cristais insolúveis de coloração violeta, formados por meio da reação de redução do MTT em células vivas (MOSMANN, 1983).

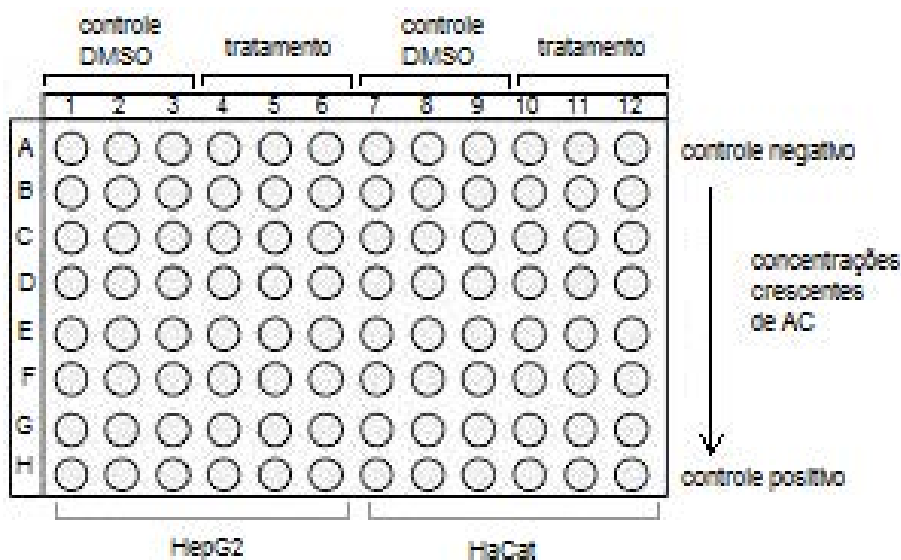
Para esse método foram utilizados dois tipos de células humanas: células de hepatoma humano que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos (HepG2) e queratinócitos metabolicamente incompetentes (HaCat); cultivadas em meio de cultura MEM (*Minimum Essential Media*) com soro fetal bovino a 10% e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL).

As culturas foram mantidas em estufas a 37°C em atmosfera de 5% de  $CO_2$  durante, aproximadamente, quatro semanas. A densidade celular requerida para os

ensaios de citotoxicidade (MTT) foi de  $1 \times 10^6$  células/mL. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos, então, semeadas em placas de 96 poços, e em seguida, adicionou-se MEM com soro fetal bovino para neutralizar a ação da tripsina.

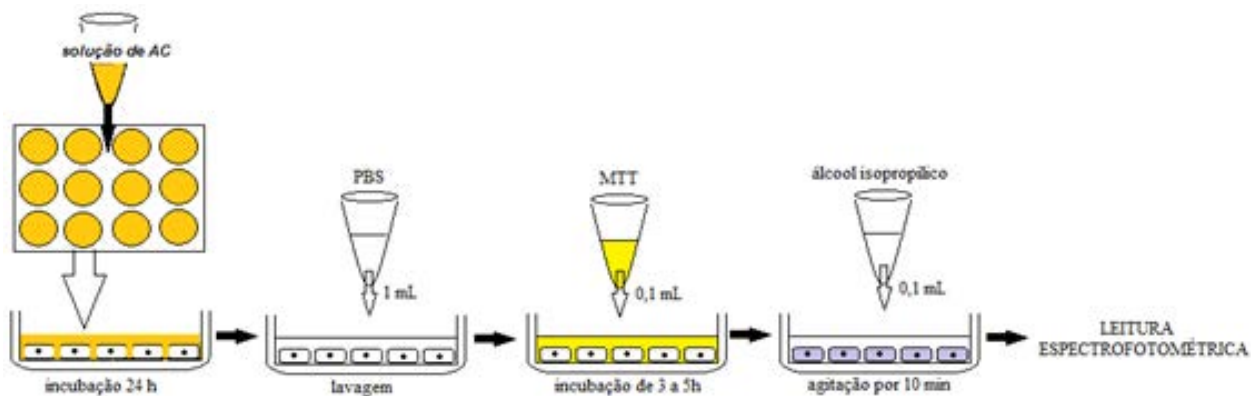
As placas foram incubadas por 24 horas para a adesão efetiva das células aos poços. Como controle positivo, adicionou-se 1 mL de DMSO a 10% nas células. O controle negativo foi preparado com MEM e soro fetal bovino. Por fim, diferentes concentrações de AC (solubilizado em MEM com 0,5% de DMSO) foram adicionadas nos poços. Para verificar o efeito do DMSO utilizado para a solubilização do AC sobre as células, um controle com DMSO foi utilizado para cada concentração de tratamento (Figura 4). Após a realização dos tratamentos, as placas foram novamente incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

**Figura 4** - Esquema dos tratamentos na placa de 96 poços.



Decorrido este tempo, o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (BRUGGISSER et al., 2002) e 100 µL de MTT (1 mg/mL PBS) foram adicionados em cada poço. A presença de cristais violeta de formazana foi observada depois de 3 a 5 horas de incubação a 37°C e protegido da luz UV. O método pode ser observado no esquema da Figura 5.

**Figura 5** - Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do ácido cafeico.



Fonte: Adaptado de Chiari et al., 2012a.

Para a solubilização dos cristais de formazana, 100  $\mu\text{L}$  de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorvância, em comprimento de onda de 595 nm, foi realizada em leitor de placas.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang et al. (2004) e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas. Para as diferentes linhagens foi calculado o  $\text{IC}_{50}$ . Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

#### 4.1.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

A espectrofotometria na região do ultravioleta é um importante recurso utilizado na quantificação de substâncias, uma vez que está relacionada com a estrutura eletrônica da molécula. Baseia-se no fato de a absorvidade de um composto químico ser constante dependendo da intensidade da radiação incidente, concentração e caminho óptico, embora dependa de fatores como: estrutura molecular do composto, solvente, temperatura e comprimento da radiação (WATSON, 1999).

O espectro na região ultravioleta foi obtido utilizando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de espessura. A varredura espectrofotométrica foi feita entre 200 e 400 nm com uma solução de AC na concentração de 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  utilizando-se como solvente etanol:

água (40:60). Isto foi realizado com o objetivo de verificar o comportamento das leituras e máximos de absorvância da substância de referência.

#### **4.1.6 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho**

Foi utilizado espectrofotômetro SHIMADZU modelo IR-PRESTIGE 21 nas leituras. O AC foi exatamente pesado e dessecado em estufa a 105°C durante 1 hora e em seguida foi realizada a compressão com KBr para confecção das pastilhas. Os espectros foram obtidos com 1,0 mg de AC, utilizando-se dispersões de 150,0 mg de brometo de potássio previamente dessecado.

#### **4.2 Preparação das formulações**

Os constituintes das emulsões inicialmente propostas para este estudo, descritos na Tabela 3, foram devidamente pesados em balança semi-analítica, em recipientes apropriados. As emulsões foram preparadas por mistura direta da fase aquosa aquecida a 70-80°C que foi vertida sobre a fase oleosa a 60-70°C, com agitação manual ou mecânica até completa homogeneização (PRISTA, 2008; CORREA, 1997). O AC foi adicionado na concentração de 1%, em massa na fase oleosa da emulsão.

As emulsões foram armazenadas em frasco opaco de dupla face, hermeticamente fechados, ao abrigo da luz e do calor.

Tabela 3 - Composição percentual da emulsão proposta.

INCI name	%
Cetearyl Alcohol	4,0
Ceteareth – 20	2,0
Ethylhexyl Stearate	1,5
Glyceryl Stearate	1,0
Propylene Glycol	3,0
Dissodium EDTA	0,05
Methylparaben	0,18
Propylparaben	0,02
Sodium Polyacrylate (Rapithix A-100)	1,5
Water	q.s.p. 100%

A formulação em filme foi produzida em escala laboratorial, cuja composição está descrita na Tabela 4. O agente filmógeno (Pullulan<sup>®</sup>) foi disperso em água, em agitação e aquecimento até 60°C. Após completa dispersão, o aquecimento foi interrompido e, em temperatura de 45°C, foram adicionados os demais componentes, ainda em agitação, até a obtenção de um gel viscoso. O AC também foi adicionado na concentração de 1% em massa neste sistema. Após a manipulação, 0,3 g do gel obtido foram aplicados nos moldes da célula de Franz, cuja área é de 1,77 cm<sup>2</sup>. Após secagem a temperatura ambiente, até 85 % do peso, o filme formado foi submetido aos testes de liberação (SANFELICE & TRUITI, 2010).

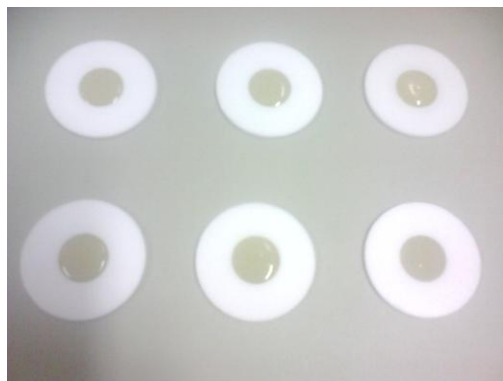
**Figura 6** - Preparação da formulação em filme em escala laboratorial.

Tabela 4 - Composição percentual da formulação em filme proposta

INCI name	%
Pullulan	12
Sodium Polyacrylate (Rapithix A-100)	1
Propylene Glycol	3
PEG-12 Dimethicone	2
Water	q.s.p. 100%

### 4.3 Desenvolvimento e validação de métodos quantitativos

É fundamental o desenvolvimento de metodologias que permitam quantificar fármacos em matérias-primas e produtos acabados para seu controle de qualidade tanto no âmbito da indústria farmacêutica e cosmética como em farmácias magistrais. O desenvolvimento de métodos analíticos exige a adoção de procedimentos de validação que conferem a confiabilidade necessária para a aplicação das técnicas de quantificação.

Validação é o ato documentado que atesta que qualquer procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva aos resultados esperados (BRASIL, 2003). Segundo a RDC nº 17, de 16 de abril de 2010, a validação é parte essencial de Boas Práticas de Fabricação (BPF), um elemento da garantia da qualidade associado a um produto ou processo em particular.

A validação é, assim, a ferramenta usada para demonstrar que um método analítico mede realmente o que foi destinado a medir, e, portanto, é adequado para a sua função/finalidade (TAVERNIERS et al., 2004). Desta forma, a validação é parte importante do programa de garantia de qualidade e tem por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para a proposta pretendida (ICH, 2005).

Segundo a RE nº899, de 23 de maio de 2003, no caso de metodologia analítica não descrita em farmacopeias ou formulários oficiais, devidamente reconhecidos pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros relacionados:

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade
- Precisão

- Limite de detecção (sensibilidade)
- Limite de quantificação
- Exatidão
- Robustez

Esses parâmetros são fundamentais para o desenvolvimento de um método analítico (ERMER, 2001), porém outros como a disponibilidade de instrumentos e equipamentos, rapidez, custo reduzido, formação de resíduos, simplicidade e baixo risco ocupacional também devem ser considerados.

Os testes são classificados em 4 categorias. Para cada categoria é exigido um conjunto de testes. Na Tabela 5 encontra-se a classificação dos testes e na Tabela 6, os ensaios necessários para a validação de um método analítico, segundo preconizado pela RE 899 de 29/05/2003.

Tabela 5 - Classificação dos testes.

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade do teste</b>
<b>I</b>	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias primas
<b>II</b>	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias primas
<b>III</b>	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
<b>IV</b>	Testes de identificação

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

Tabela 6 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
		Quantitativo	Ensaio limite		
<b>Especificidade</b>	Sim	Sim	Sim	*	Sim
<b>Linearidade</b>	Sim	Sim	Não	*	Não
<b>Intervalo</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Precisão</b>	Sim	Sim	Não	Sim	Não
<b>Repetibilidade</b>					
<b>Intermediária</b>	**	**	Não	**	Não
<b>Limite de detecção</b>	Não	Não	Sim	*	Não
<b>Limite de</b>	Não	Sim	Não	*	Não
<b>Quantificação</b>					
<b>Exatidão</b>	Sim	Sim	*	*	Não
<b>Robustez</b>	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: RE 899, de 29 de maio de 2003.

\*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

\*\*se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

Assim, para os métodos analíticos desenvolvidos e validados neste trabalho os parâmetros analisados foram:

### **Especificidade e Seletividade**

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

Para análise quantitativa (teor) e análise de impurezas, a especificidade pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras (fármaco ou medicamento) contaminadas com quantidades apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais.

### Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Se houver relação linear aparente após exame visual do gráfico, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, interseção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,99.

### Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra. Repetibilidade (precisão intracorrída): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária (precisão intercorrída): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo de uma série de medidas.

A precisão pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 4:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

DP = é o desvio padrão

CMD = a concentração média determinada

O valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5%.

### **Limite de detecção**

É a menor quantidade que uma substância presente em uma amostra, pode ser detectada, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinação do limite de detecção (LD), a equação 5 é utilizada (ICH, 2005):

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{IC} \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas;

IC= inclinação da curva analítica.

### **Limite de quantificação**

Representa a concentração mais baixa da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, sob as condições experimentais especificadas. Para determinação do limite de quantificação (LQ), a fórmula utilizada é mostrada na equação 6 (ICH, 2005).

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica.

IC= inclinação da curva analítica.

### **Exatidão**

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Pode ser determinada pela aplicação do teste de recuperação da concentração média do analito em diferentes concentrações e pelo desvio padrão relativo. No teste de recuperação adiciona-se quantidade conhecida

de substância química de referência na amostra ou placebo (placebo enriquecido) e calcula-se o percentual recuperado pelo método através da comparação dos resultados do método proposto com os obtidos por um método já caracterizado, cuja exatidão, tenha sido estabelecida, como por exemplo, um método farmacopeico, ou ainda pode ser inferida, uma vez estabelecida a precisão, linearidade e especificidade do método sendo inferida através da equação da reta linear.

### **Robustez**

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso rotineiro.

Na avaliação da robustez constata-se a suscetibilidade do método a variações nas condições analíticas e, assim, as precauções que devem ser incluídas no procedimento para controlar o processo.

#### **4.3.1 Validação do método de quantificação do AC por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Diversas condições cromatográficas foram testadas, a fim de encontrar aquela que permitisse a quantificação confiável do fármaco, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica, além de diminuir a geração de resíduos.

Para a quantificação de AC nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, foi necessário adequar uma metodologia eficiente utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizado o equipamento Waters<sup>®</sup>, composto de bomba cromatográfica gradiente binária Waters 1525, injetor manual Rheodyne Breeze 7725i com detector UV Waters 248. A fase móvel foi composta por etanol e água purificada (40: 60) v/v com pH 2,5 ajustado com ácido acético, coluna RP<sub>18</sub> (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), vazão 0,7 mL/min, injeção de 10 µL, detecção a 325 nm, solução de padrão e amostra 40 µg/mL diluídas na fase móvel.

Foram pesados analiticamente 20 mg de AC e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com etanol, obtendo-se solução com concentração de 200 µg/mL (solução estoque). Aliquotas de 500 a 3000 µL desta

solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com fase móvel, obtendo-se soluções com as concentrações finais de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/ mL.

Para a validação da metodologia foram avaliados os parâmetros especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2003).

#### **4.3.1.1 Especificidade/seletividade**

A avaliação da especificidade foi realizada com três alíquotas de padrão do AC na concentração de 40 µg/mL, três alíquotas da amostra e do placebo da emulsão e do filme, preparados com 0,3125g de placebo para 25 mL de etanol, filtração, diluição desta solução, na proporção de 1:5 de fase móvel. Para atingir a concentração final requerida de 40 µg/ mL as amostras foram preparadas com concentração de 1,6% de AC.

Após filtração em membrana de celulose regenerada, com membrana de 0,45 µm, as alíquotas foram injetadas no cromatógrafo. Quando as impurezas e produtos de degradação não estão disponíveis, a seletividade pode ser avaliada submetendo-se o analito a condições de estresse, que forçam a obtenção de produtos de degradação, sendo possível verificar a interferência destes produtos na análise. Porém, o método por CLAE não é capaz de identificar os compostos gerados. Esta análise foi realizada submetendo-se o padrão de AC na concentração de 40 µg/mL em água, solução de hidróxido de sódio 0,001 M, solução de ácido clorídrico 0,001 M, solução de peróxido de hidrogênio 3% e luz ultravioleta (254 nm), por um período de oito horas. Desta forma, foi possível verificar a presença de picos de degradação que possam interferir na análise.

#### **4.3.1.2 Linearidade**

Para avaliação da linearidade foram preparadas seis soluções padrão do AC em diferentes concentrações, em triplicata: Padrão 1: 10 µg/mL; Padrão 2: 20 µg/mL; Padrão 3: 30 µg/mL; Padrão 4: 40 µg/mL; Padrão 5: 50 µg/mL; Padrão 6: 60 µg/mL. Verificando-se a relação linear e os resultados foram tratados pelo coeficiente de variação em relação ao fator de resposta de cada concentração.

#### **4.3.1.3 Precisão**

Foi avaliada por meio da repetibilidade, na qual sete réplicas da solução de AC na concentração de 40,0 µg/mL foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista e o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises foi calculado.

Também foi realizada a precisão intermediária, análise entre diferentes analistas no mesmo dia, e o desvio padrão relativo foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de AC preparadas pelos diferentes analistas.

#### **4.3.1.4 Limite de detecção**

O limite de detecção (LD) do AC foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a Equação 5, p.72, anteriormente apresentada.

#### **4.3.1.5 Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi obtido de com base nos mesmos dados descritos, segundo a Equação 6, p.72, anteriormente apresentada.

#### **4.3.1.6 Exatidão**

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração, 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3), em relação à concentração de trabalho, de solução de AC às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 32; 40 e 48 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, é possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7 - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE

	Volume adicionado de amostra (100 µg/mL) (mL)	Volume adicionado de padrão (100 µg/mL) (mL)	Concentração final teórica (µg/mL)*
<b>A</b>	2,0	-	20
<b>R1</b>	2,0	1,2	32
<b>R2</b>	2,0	2,0	40
<b>R3</b>	2,0	2,8	48
<b>P</b>	-	2,0	20

\* Cada nível de concentração foi preparado em triplicata em balão volumétrico de 10 mL.

#### 4.3.1.7 Robustez

Foi avaliada por meio de modificações nas condições cromatográficas previamente estabelecidas. Injetou-se em CLAE o padrão 40 µg/mL alterando-se as variáveis:

- Comprimento de onda: 323 nm, 325 nm e 327 nm.
- Vazão da fase móvel: 0,65 mL/min, 0,70 mL/min e 0,75 mL/min.
- Proporção da fase móvel: etanol e água 35: 65, 40: 60 e 45: 55.
- Volume de injeção: 8 µL, 10 µL e 12 µL.
- Fabricante do etanol: JT Baker<sup>®</sup> e Tedia<sup>®</sup>.

O parâmetro que apresentar maior variação nas medições deverá ser controlado e monitorado durante as análises de rotina (BRASIL, 2003).

#### 4.3.1.8 Curvas analíticas com solventes diferentes

Após o método ter sido validado, duas novas curvas analíticas foram construídas com outros solventes utilizados neste estudo. A validação foi efetuada utilizando a fase móvel como solvente para o AC, entretanto, na avaliação da liberação do AC da formulação, da permeação e retenção cutâneas, foi utilizado como solvente tampão fosfato (pH = 7,4) com 1% de polissorbato 80 e metanol.

### **4.3.2 Validação do método de quantificação do AC por espectrofotometria na região do ultravioleta**

Para a quantificação de AC durante os 90 dias do estudo de estabilidade, foi necessário adequar uma metodologia eficiente utilizando-se espectrofotometria no ultravioleta. Foi utilizado o equipamento espectrofotômetro UV/Vis, Shimadzu®, modelo UVmini-1240.

Foi preparada solução estoque com AC na concentração de 100 µg/mL utilizando como solução solvente etanol e água purificada (40: 60). Alíquotas de 200 a 800 µL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume foi completado com etanol e água (40: 60), obtendo-se soluções com as concentrações finais de 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 µg/mL.

Para a validação da metodologia foram avaliados os parâmetros especificidade e seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

#### **4.3.2.1 Especificidade/seletividade**

Uma solução estoque da amostra foi preparada a partir da pesagem de 0,3125 g de creme, contendo 0,8% de AC. Essa alíquota foi diluída em 25 mL de etanol obtendo-se uma solução de amostra com concentração final de AC igual a 100 µg/mL. Para obtenção de três concentrações, baixa, média e alta de AC foram transferidos 300, 500 e 700 µL desta solução e transferidos para balão de 10 mL, completando-se o volume com solução de etanol e água (40:60). A leitura espectrofotométrica dessas soluções foi determinada, com três réplicas de cada e os valores comparados com as concentrações teóricas AC (3, 5 e 7 µg/mL), determinando-se o DPR.

#### **4.3.2.2 Linearidade**

Para avaliação da linearidade, foram preparadas sete soluções padrão do AC em diferentes concentrações, em triplicata: Padrão 1: 2 µg/mL; Padrão 2: 3 µg/mL; Padrão 3: 4 µg/mL; Padrão 4: 5 µg/mL; Padrão 5: 6 µg/mL; Padrão 6: 7 µg/mL, Padrão 7: 8 µg/mL. Em seguida a linearidade foi determinada através dos cálculos de regressão linear dos valores de absorvâncias em relação às concentrações das soluções padrão usando o método dos mínimos quadrados.

#### 4.3.2.3 Precisão

Foi avaliada por meio da repetibilidade, na qual sete réplicas da solução de AC na concentração de 5,0 µg/mL foram analisadas no mesmo dia, sob as mesmas condições experimentais e pelo mesmo analista e o desvio padrão relativo (DPR) entre as análises foi calculado.

Também foi realizada a análise entre analistas diferentes no mesmo dia e o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para as respostas obtidas para as sete réplicas da solução de AC preparadas pelos diferentes analistas.

#### 4.3.2.4 Limite de detecção

O limite de detecção (LD) do AC foi determinado a partir das três curvas analíticas obtidas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a Equação 5, p. 72, anteriormente apresentada.

#### 4.3.2.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação foi obtido com base nos mesmos dados descritos, segundo a Equação 6, p.72, anteriormente apresentada.

#### 4.3.2.6 Exatidão

A exatidão foi determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do método, sendo verificada a partir de nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 7).

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ Teórica} \times 100 \quad \text{Equação 7}$$

#### 4.3.2.7 Robustez

Foi avaliada utilizando-se a solução padrão a 5 µg/mL alterando-se algumas das condições previamente estabelecidas:

- Comprimento de onda: 323 nm, 325 nm e 327 nm.
- Proporção solução etanol/água 35: 65, 40: 60 e 45: 55.
- Fabricante do etanol: Chemis<sup>®</sup> e Tec-Lab<sup>®</sup>.

O parâmetro que apresentar maior variação nas medições deverá ser controlado e monitorado durante as análises de rotina, sendo que o desvio padrão relativo entre as medidas deve ser menor que 5% (BRASIL, 2003).

### 4.4 Caracterização dos sistemas

#### 4.4.1 Caracterização do filme

##### 4.4.1.1 Exame macroscópico dos filmes

Os filmes produzidos foram mantidos em dessecador e análises macroscópicas foram realizadas, a fim de detectar a presença de bolhas, fissuras e/ou rachaduras, a fim de garantir sua integridade.

##### 4.4.1.2 Determinação do perfil de absorção de água

O perfil de absorção de água, também chamado de perfil de intumescimento dos filmes foi determinado em dispositivo de Enslin (VOIGT, 2000, CURY et al., 2009). Uma seção de cerca de 1 cm<sup>2</sup> de cada filme foi precisamente pesada e imediatamente disposta sobre a placa de vidro sinterizado do dispositivo. Em intervalos de tempo pré-determinados (30 s, 1 min, 2 min e 5 min), o volume de líquido absorvido pelo filme foi mensurado na pipeta do dispositivo. As análises foram conduzidas em meio aquoso. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de líquido absorvido em relação à massa da amostra, de acordo com a equação 8:

$$\%I = \frac{V}{m} \quad \text{Equação 8}$$

Em que  $m$  é a massa inicial da película (g);  $V$  = volume (mL) de absorção médio;  $\% I$  = grau de absorção de água do filme (%).

#### 4.4.1.3 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas dos filmes foram avaliadas em analisador universal de textura (TA-XT2 - Stable Micro Systems) equipado com prova em aço inoxidável com ponteira esférica ( $D = 2,5$  cm). Secções dos filmes ( $n = 6$ ) foram fixadas em suporte metálico com orifício circular ( $D = 5$  cm) e a sonda metálica foi fixada a uma célula de carga de 5 kg e descera perpendicularmente à superfície do filme com velocidade de 0,1 mm/s até perfurar o filme. Curvas de força *versus* deslocamento foram registradas e utilizadas para determinar a resistência à perfuração ( $R_p$ ) (Equação 9) e o alongamento na perfuração ( $A_p$ ) (Equação 10) (MUSCHERT et al., 2009; LIMMATVAPIRAT et al., 2007):

$$R_p = \frac{F}{A}, \quad \text{Equação 9}$$

Em que  $F$  é a força requerida para a ruptura do filme e  $A$  é a área da secção do filme ( $A = \pi r^2$ ), em que  $r$  é o raio do orifício.

$$A_p \% = \frac{\sqrt{r^2 + d^2} - r}{r} \cdot 100, \quad \text{Equação 10}$$

em que  $r$  é o raio do filme exposto no orifício da placa e  $d$  o deslocamento do dispositivo do ponto de contato até a ruptura do filme.

#### 4.4.2 Caracterização da emulsão

##### 4.4.2.1. Caracterização reológica

Uma amostra de emulsão isenta e outra adicionada de AC (base) foram caracterizadas reologicamente por meio do reômetro AR2000ex da TA Instrument. Os ensaios foram realizados utilizando o sensor do tipo cone-placa de 40 mm (Serial Number: 993466) e os dados analisados pelo TA Data Analysis.

O comportamento reológico foi avaliado pela determinação de:

- Propriedade de fluxo das amostras, com taxa de cisalhamento de 0 - 100  $s^{-1}$  por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente;
- Varredura de tensão, com tensão de cisalhamento de 0,1-10 Pa com frequência constante de 1 Hz;

- Varredura de frequência, submetendo as amostras à tensão de cisalhamento constante de 1 Pa, utilizando frequências variáveis de 0,1 a 50 Hz.
- Fluência e relaxação com tensão de cisalhamento de 1 Pa por 300 segundos e recuperação por mais 300 segundos, cessando a tensão aplicada;

Todos os ensaios foram realizados à temperatura de  $32 \pm 1^\circ \text{C}$  e, em triplicata. Os gráficos foram plotados no software Origin 7.0.

#### **4.4.2.2 Avaliação da estabilidade**

Após a manipulação da emulsão, foram separadas alíquotas que foram submetidas a diferentes temperaturas:  $-5^\circ\text{C}$ ,  $5^\circ\text{C}$ ,  $25^\circ\text{C}$  (temperatura ambiente),  $45^\circ\text{C}$ , exposição luminosa e ciclos de congelamento/descongelamento. O estudo de estabilidade foi conduzido conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA (2004) e Isaac et al. (2008).

Foram consideradas as características organolépticas (aspecto, cor, odor) e as características físicas (valor de pH e densidade), separação de fases e/ou coalescência, e avaliação do teor durante 90 dias tomando-se como amostra de referência, considerada padrão, as avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação da fórmula).

##### **4.4.2.2.1 Teste de centrifugação**

Foi realizado para avaliar a manutenção da estabilidade das formulações base, quanto à separação de fases e coalescência, conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, série qualidade 1, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A centrifugação ocorreu a 980, 1800 e 3.000 rpm durante 15 min com 5 g de amostra 24 h após manipulação (CADWALLAGER, 1989; BRASIL, 2004).

##### **4.4.2.2.2 Avaliação macroscópica**

As formulações foram avaliadas quanto a alterações na coloração, aspecto e odor, além da observação de possível separação de fases e/ou coalescência, tomando-se como referência as avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação).

#### 4.4.2.2.3 Determinação do pH

Foi determinado em peagômetro após diluição das amostras a 10%, conforme protocolo proposto (BRASIL, 2004). Os valores de pH foram determinados em triplicata, durante 90 dias (estabilidade acelerada), nas amostras submetidas às temperaturas -5°C, 5°C, 25°C, 45°C, ciclo -5/45C e exposição a luz solar (BRASIL, 2004).

#### 4.4.2.2.4 Determinação da densidade

A determinação da densidade relativa das formulações foi realizada por picnometria, conforme descrito na Farmacopeia Brasileira (2010) durante os estudos de estabilidade física. O valor da densidade relativa foi obtido após a realização do cálculo mostrado na equação 11.

$$D_r = \frac{M_c - M_v}{M_a - M_v} \quad \text{Equação 11}$$

Em que:

$D_r$  = densidade relativa

$M_c$  = Massa do picnômetro com emulsão

$M_v$  = Massa do picnômetro vazio

$M_a$  = Massa do picnômetro com água

#### 4.4.2.2.5 Determinação do teor de AC

A concentração de AC nas emulsões ao longo do tempo foi avaliada através do método validado por espectrofotometria na região do ultravioleta. Para isso 0,0125 g do creme foi diluído em 25 mL de solução de etanol: água (40: 60), obtendo-se a concentração teórica de AC igual a 5 µg/mL e após dois minutos em ultrassom para facilitar solubilização, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro a 325 nm.

#### 4.5 Avaliação do perfil de liberação do AC a partir das formulações e a permeação e retenção cutâneas do AC

Os ensaios foram realizados com a emulsão e o filme contendo o AC nas concentrações de 1, 0,5 e 0,2%, respectivamente. Os dados obtidos foram avaliados em relação com os resultados da atividade antioxidante e citotóxica do AC, com o objetivo de determinar qual a concentração eficiente e segura de ativo a ser utilizada.

##### 4.5.1 Avaliação da liberação do AC contido nas formulações

A avaliação da liberação do AC a partir da emulsão e do filme foi efetuada de acordo com metodologia descrita por Marquele et al. (2006) e OECD (2004). Os ensaios de liberação foram desenvolvidos utilizando células de Franz modificadas com área de difusão de 1,77 cm<sup>2</sup>, no equipamento Microette (Hanson Research) e membrana de celulose (Sigma- Aldrich).

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 7,0 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4) com 1% de polissorbato 80. Amostras de 300 mg da emulsão ou filme foram dispostas sobre a membrana. A solubilidade do ativo na solução receptora foi testada para garantir *sink conditions*.

Foi feita uma solução supersaturada de AC em solução receptora até a observação de precipitação, então o sobrenadante foi filtrado e quantificado por CLAE. Obteve-se que a concentração de AC nesta solução foi de 13 mg/mL, ou seja, essa é a quantidade máxima de AC que pode ser solubilizada na solução receptora.

Embora os estudos de liberação tenham sido efetuados com as formulações contendo o AC nas concentrações de 1, 0,5 e 0,2%, considerou-se a maior concentração, de 1% para os cálculos da *sink condition*. Foram aplicados na célula de Franz 300 mg de formulação, contendo 3mg de AC. Para garantir a *sink condition*, uma quantidade 10x superior do que a aplicada deve ser solubilizada em 7mL de solução receptora. Portanto no mínimo 30mg de AC devem ser solubilizados em 7mL, o que corresponde a uma solubilidade mínima de 4,28 mg/mL.

Esses resultados garantem a *sink condition* já que a solubilidade do AC na solução receptora (13 mg/mL) composta por tampão fosfato pH 7,4 com 1% de

Polisorbate 80 é cerca de 3 vezes superior do que a solubilidade mínima necessária para garantir a condição *sink* (4,28 mg/mL).

A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a  $37 \pm 5^\circ \text{C}$  por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas. A avaliação da quantidade de AC liberada da formulação foi realizada após 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.

Os experimentos foram repetidos seis vezes para cada tempo e concentração de AC. A quantificação foi realizada em triplicada por CLAE.

#### **4.5.2 Avaliação da permeação cutânea do AC contido nas formulações**

Este ensaio foi desenvolvido da mesma forma como descrito anteriormente para avaliar a liberação do AC, porém, foi utilizada membrana biológica. A membrana biológica escolhida foi pele dissecada da orelha de porco, sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme. As orelhas suínas não escaldadas foram adquiridas do Abatedouro Olhos d'água (Ipuã - SP). Antes do início do experimento as peles foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele equivalente à epiderme e derme (500  $\mu\text{m}$ ) com o auxílio do dermatômetro (Nouvag TCM300).

#### **4.5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AC contido nas formulações.**

A metodologia foi executada de acordo com Marquele-Oliveira e colaboradores (2007). Antes da utilização da pele da orelha de porco, o tecido foi primeiramente submetido à remoção do estrato córneo pela técnica de *tape stripping*. Para isso, 15 pedaços de fita adesiva (3M) foram colados e removidos da área de difusão da pele. As fitas adesivas foram mergulhadas em metanol (4 mL) para a extração do ativo. Esta suspensão foi submetida à sonicação por 15 minutos e agitação em vórtex por 1 minuto. O sobrenadante foi avaliado por CLAE.

Em seguida, recortou-se a região em que a emulsão ou filme com AC estava em contato com a pele da orelha de porco. As peles foram imersas em metanol (4 mL) para a extração do ativo. A suspensão também foi submetida à sonicação por 15 minutos e agitação em vórtex por 1 minuto. O sobrenadante obtido foi analisado por CLAE.

#### 4.6 Avaliação “*in vitro*” do Fator de Proteção Solar das emulsões

A fim de verificar se o AC influenciaria o fator de proteção solar de filtros solares químicos, as formulações foram acrescidas de Ethylhexyl Methoxycinnamate (7,5%; m/m) e avaliadas pela mesma metodologia. O Fator de Proteção Solar (FPS) das emulsões foi avaliado por dois métodos, um espectrofotométrico, utilizando a técnica proposta por Mansur e colaboradores (1986) e citado recentemente por Corrêa e colaboradores (2007), e outro utilizando o equipamento Optometrics SPF-290S.

Na técnica de Mansur, foram preparadas soluções em nove replicatas das formulações em etanol, para avaliação do FPS por espectrofotometria no ultravioleta. A técnica estipula que as concentrações finais das soluções sejam de 0,2 mg/mL. Depois de atingida esta concentração, as análises foram realizadas em espectrofotômetro na faixa de comprimento de onda entre 290 a 320 nm (ultravioleta B) em intervalos de 5 nm.

Para avaliação no Optometrics, 110 mg de formulação foram aplicados sobre a fita Transpore® para obtenção de filme da amostra com espessura de 2  $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Em seguida, a amostra foi exposta à lâmpada de xenônio, em faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm (ultravioleta B e A), possibilitando a determinação do fator de proteção solar em 12 replicatas pelo equipamento, este procedimento foi realizado em triplicata para cada formulação.

Na análise estatística foi determinada a média e o desvio padrão, além de análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização do ácido cafeico

#### 5.1.1 Avaliação da solubilidade do ácido cafeico

Os resultados obtidos foram apresentados segundo os termos descritivos disponíveis na Farmacopeia Brasileira (2010), a expressão partes refere-se à dissolução de 1 g do soluto em 1 mL do solvente. A fim de minimizar o consumo de amostra e solventes, as quantidades utilizadas neste teste foram adequadas proporcionalmente para 10 mg de soluto. Os resultados obtidos no teste de solubilidade para AC em diferentes solventes encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 - Solubilidade do AC em diferentes solventes a 25 °C

<b>Solventes</b>	<b>Termo descritivo</b>
Etanol	Solúvel
Água	Praticamente insolúvel
Metanol	Solúvel
Dimetilsulfóxido	Facilmente solúvel
Etanol: Água (40:60) pH 2,5	Ligeiramente solúvel
Tampão fosfato pH 7,4 + 1% de polissorbato 80	Ligeiramente solúvel

A solubilidade é um método qualitativo que caracteriza a amostra de acordo com a sua polaridade, sendo útil na identificação e pureza dos fármacos. Este parâmetro também é necessário para a determinação dos solventes a serem utilizados nos testes quantitativos. De acordo com os parâmetros avaliados, os resultados obtidos para o AC indicam que ele é facilmente solúvel em dimetilsulfóxido, solúvel em etanol e metanol, ligeiramente solúvel na solução de etanol: água (40:60) pH 2,5, pouco solúvel em tampão fosfato pH 7,4 acrescido de 1% de polissorbato 80 e praticamente insolúvel em água.

Não existem informações sobre a solubilidade do ácido cafeico em compêndios oficiais. No entanto, as informações encontradas no Merck Index (2001) comprovam a baixa solubilidade em água e alta solubilidade em etanol. Portanto, em nenhum dos testes subsequentes foi utilizado água como solvente exclusivo para AC.

## 5.1.2 Avaliação do potencial antioxidante

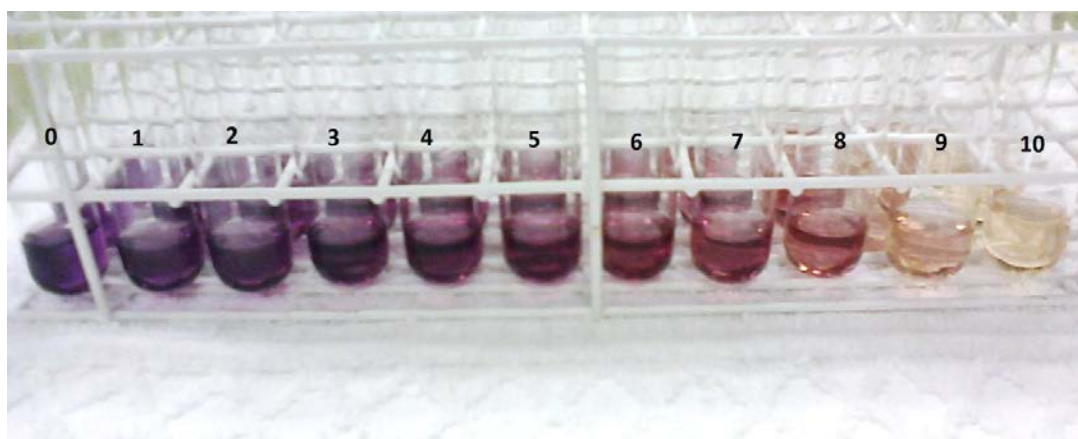
### 5.1.2.1 Método de inibição do radical DPPH

A avaliação prévia da atividade antioxidante do AC foi realizada a fim de comprovar informações presentes na literatura científica através de um método, simples, de baixo custo, eficaz e facilmente reproduzível, a inibição do radical DPPH. Deste modo, foi possível prever a viabilidade de escolha desta substância frente a tantas outras já existentes e comprovadamente eficazes. O método de inibição do radical DPPH é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 515 nm, uma vez que quando o radical é estabilizado, passa de coloração violeta a amarelo-claro (Figura 7).

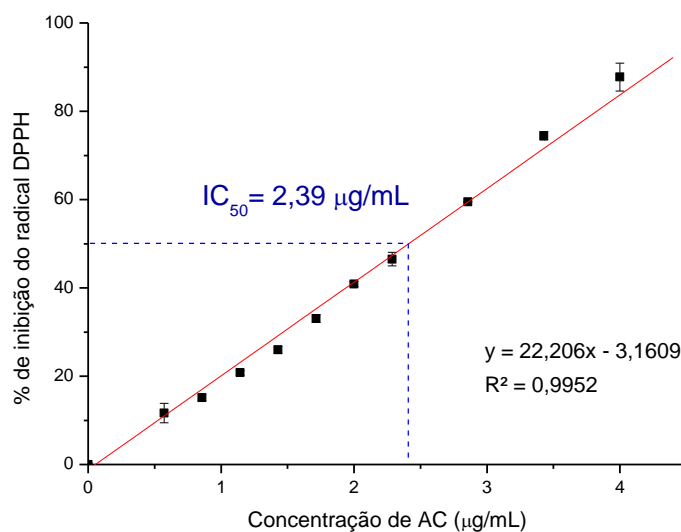
Para tanto, foram construídas duas curvas analíticas de atividade antioxidante, uma com AC, com concentrações de 0 a 4 µg/mL (Figura 8) e outra com ácido ascórbico, com concentrações de 0 a 4,57 µg/mL (Figura 9). A partir desta curva, foi obtida a equação da reta, que fornece informações suficientes para que seja calculada a quantidade de substância necessária para que seja alcançada a inibição de 50% dos radicais livres ( $IC_{50}$ ) presentes no meio de análise.

Através das equações da reta apresentadas nas Figuras 8 e 9 foi possível inferir que o  $IC_{50}$  do AC foi 2,39 e do ácido ascórbico foi 2,69, ou seja, uma menor quantidade de AC é necessária para inibir 50% do radical DPPH, o que demonstra uma maior atividade.

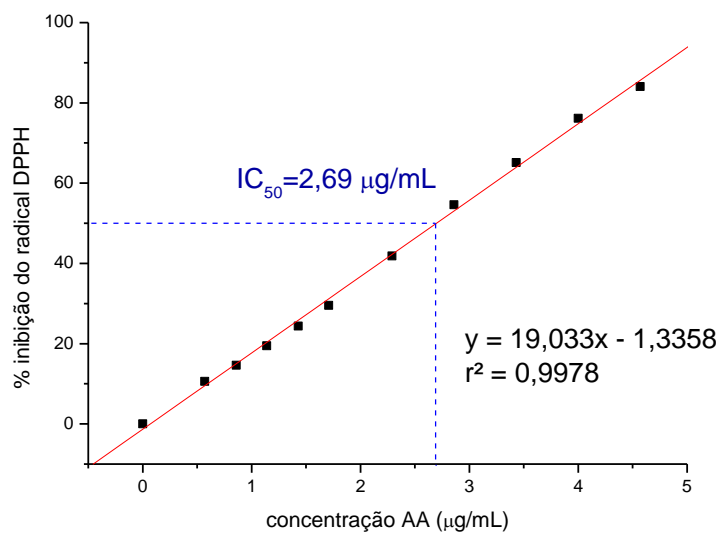
**Figura 7** - Tubos reacionais para obtenção da curva analítica do ácido cafeico.



**Figura 8** - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido cafeico pelo método de inibição do radical DPPH.



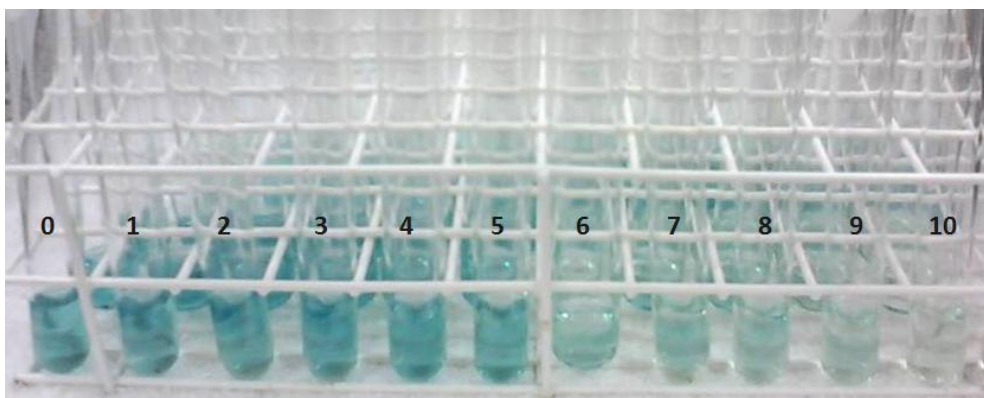
**Figura 9** - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH.



### 5.1.2.2 Método de inibição do radical ABTS

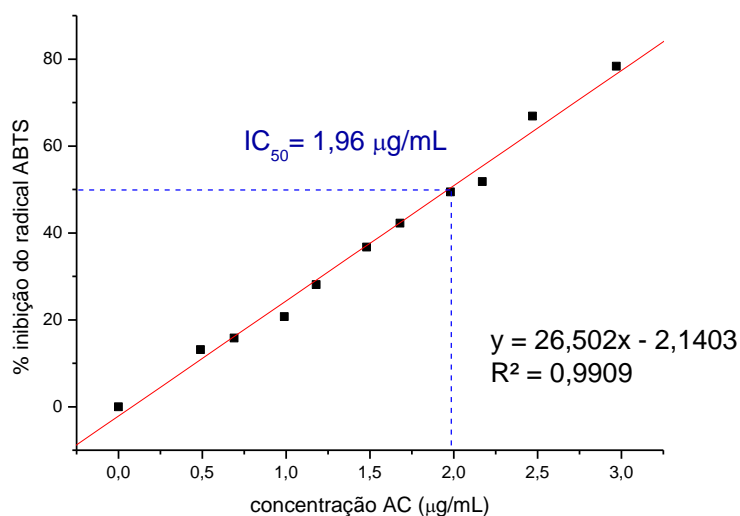
A avaliação da atividade antioxidante através do método de inibição do radical ABTS baseia-se no fato de que, na ausência de um antioxidante, o ABTS assume coloração verde escuro, mas quando é sequestrado por um antioxidante, torna-se verde claro. A coloração fica mais clara, conforme observado na Figura 10, à medida que a concentração do antioxidante aumenta.

**Figura 10** - Tubos reacionais para obtenção da curva analítica do ácido cafeico.



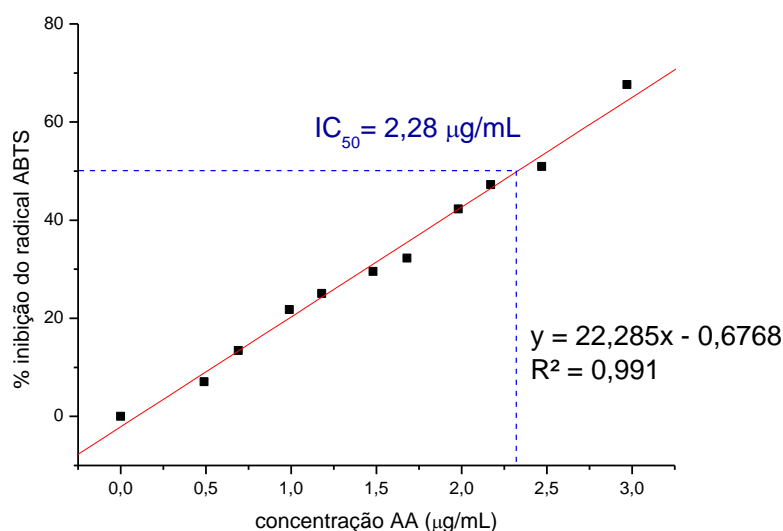
Com os resultados obtidos, foi possível construir um gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante. Obteve-se o seguinte resultado, demonstrado na Figura 11, com experimento realizado com o AC.

**Figura 11** - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido cafeico pelo método de inibição do radical ABTS.



A partir da equação da reta apresentada na Figura 11, foi calculado que o  $IC_{50}$  do AC (concentração necessária do antioxidante para inibir 50% do radical ABTS) é de 1,96  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Figura 12** - Curva analítica da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical ABTS.

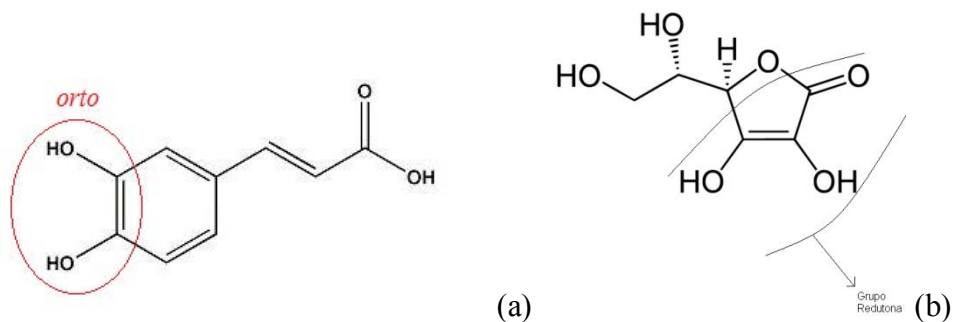


A partir da equação da reta apresentada na Figura 12, calcula-se que o  $IC_{50}$  do ácido ascórbico é de 2,28  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

A atividade dos antioxidantes é justificada pelo fato deles doarem um átomo de hidrogênio ou um elétron para o radical livre. Esse hidrogênio é mais facilmente abstraído pelo radical do que pelos hidrogênios alílicos de moléculas insaturadas. Dessa forma, é formado um radical inerte  $A^+$  (em que A=antioxidante). No caso do AC, esse radical é inativo uma vez que é estabilizado por ressonância (BIANCHI, 1999). O AC (Figura 13a) se comporta como um antioxidante uma vez que possui hidroxilas na posição *orto*, o que parece ser um fator favorável à oxidação (CHEN & HO, 1997). A facilidade da molécula de ácido ascórbico ser oxidada se deve ao fato dela possuir um grupo chamado redutona (molécula que possui uma estrutura de enodiol com um grupo carbonila adjacente), representado pela Figura 13b, que é altamente redutor (BOBBIO & BOBBIO, 1992).

Em virtude dos resultados, conclui-se que o AC é um antioxidante mais potente que o ácido ascórbico, uma vez que uma quantidade menor do primeiro é suficiente para inibir 50% do ABTS.

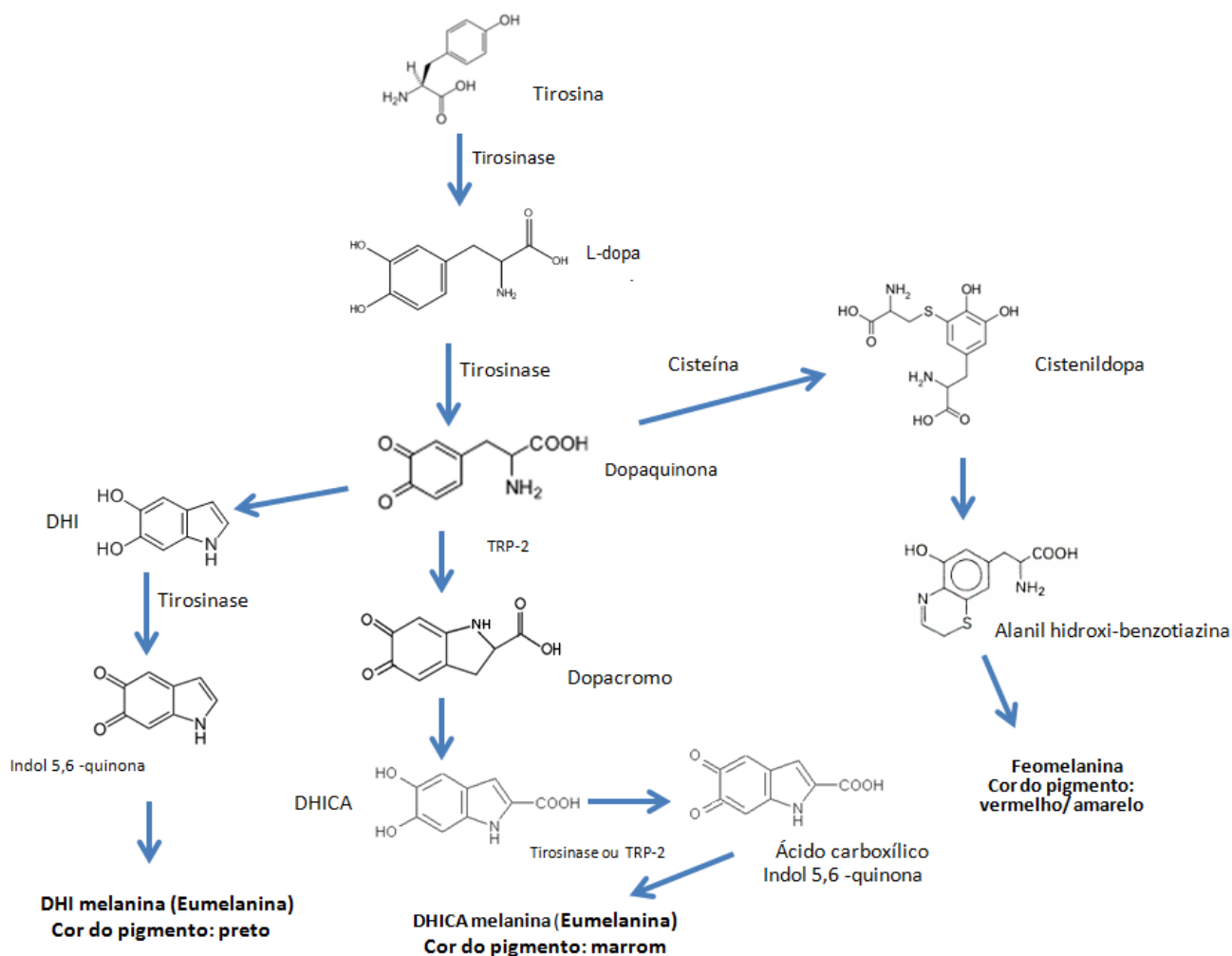
**Figura 13** - Representação da molécula de ácido cafeico (a) e ácido ascórbico (b).



### 5.1.3 Determinação atividade inibidora de tirosinase

A tirosinase é uma enzima cobre-dependente (metaloenzima) que participa da biossíntese de melanina (Figura 14), pigmento responsável pela coloração da pele de mamíferos.

**Figura 14** - Representação esquemática das etapas da melanogênese. DHI: dihidroxi-5,6-indol; TRP-2: DOPA cromo tautomerase; DHICA: dihidroxi-5,6- indol 2-carboxilato).



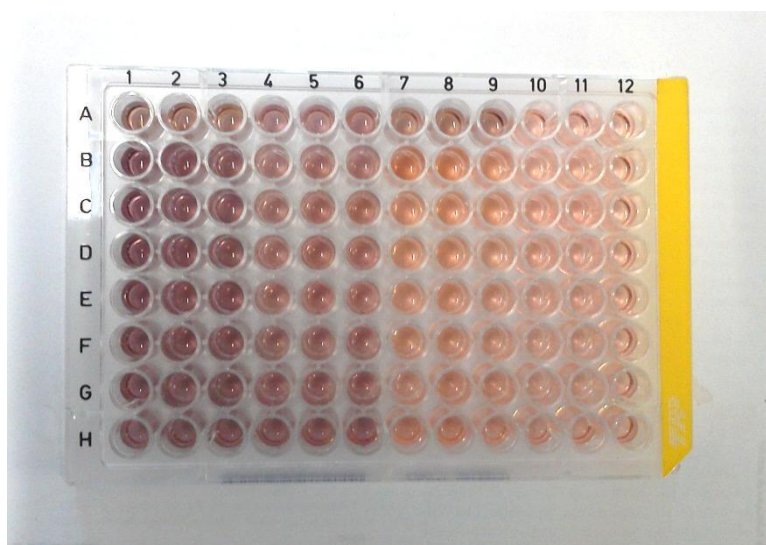
Fonte: Adaptado de PROTA, 1980; ALMEIDA, 2013.

Compostos que inibem a ação desta enzima podem ser utilizados em produtos dermatológicos a fim de diminuir a produção de melanina e, assim, clarear a pele.

Uma das reações no processo de biossíntese de melanina catalisada pela tirosinase é a oxidação da L-dopa a dopaquinona, portanto, como o AC apresentou potencial antioxidante, também foi avaliado seu potencial de inibir a atividade da tirosinase.

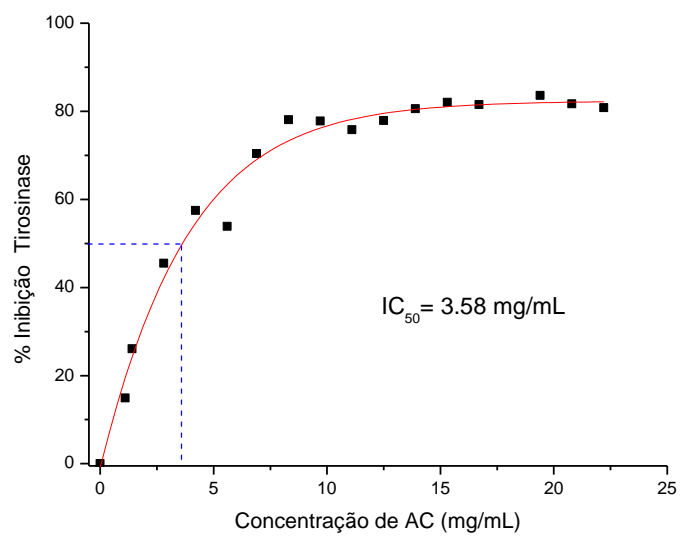
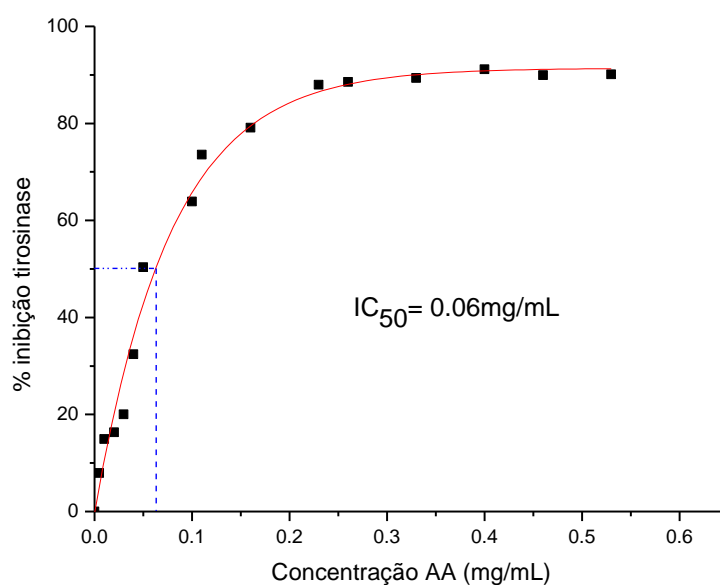
A Figura 15 mostra uma placa de 96 poços com coloração variando do castanho ao laranja claro conforme a concentração de AC aumentou. As 16 e 17 apresentam o perfil de inibição de tirosinase causada pelo AC e AA, respectivamente.

**Figura 15** - Placa de 96 poços referente à determinação atividade inibidora de tirosinase pelo ácido cafeico.



Comparando o  $IC_{50}$  do AA com o  $IC_{50}$  do AC, é possível inferir que o AC apresenta atividade inibitória de tirosinase, porém é necessária concentração superior de AC (3,58 mg/mL) para inibir a mesma quantidade de enzima que o AA inibe (0,06 mg/mL).

Além disso, também são necessárias maiores concentrações de AC para atingir o  $IC_{50}$  de inibição da tirosinase quando comparado com o  $IC_{50}$  do potencial antioxidante sendo, desta forma, mais adequado indicar o AC como um agente antienvhecimento, devido a sua atividade antioxidante, do que sugeri-lo como despigmentante, atividade que poderia até ser considerada, quando o AC for aplicado em elevadas concentrações.

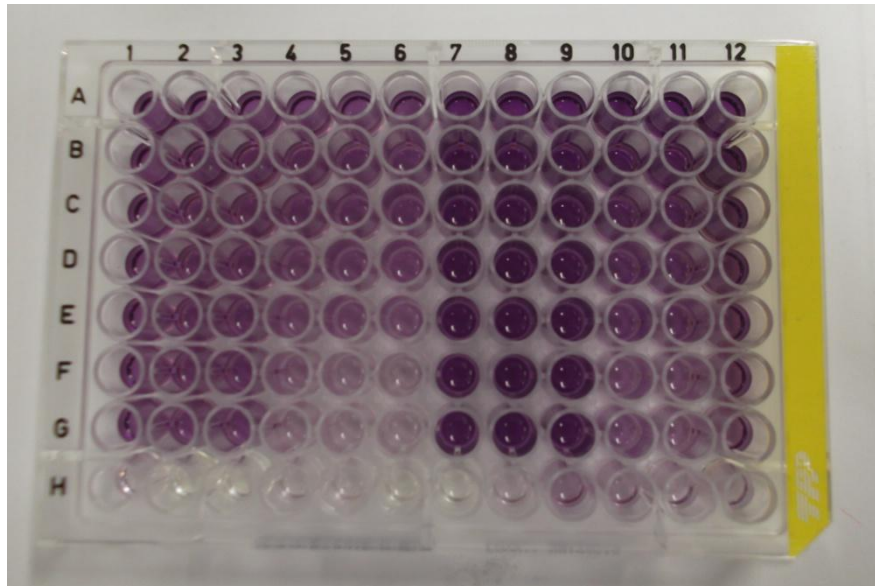
**Figura 16** - Perfil de inibição de tirosinase pelo AC.**Figura 17** - Perfil de inibição de tirosinase pelo AA.

### 5.1.4 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação da citotoxicidade do AC foi elaborada por meio de dois tipos celulares, a HepG2 e a HaCat. As células hepáticas HepG2 foram escolhidas para atuar como um parâmetro da principal via de metabolismo no organismo humano, assim possibilita avaliar a toxicidade do produto através do seu metabólito formado nessas células. Como o foco deste estudo está na área cosmética, os queratinócitos HaCat foram selecionados por se tratarem do principal tipo celular da pele (CHIARI et al., 2012a).

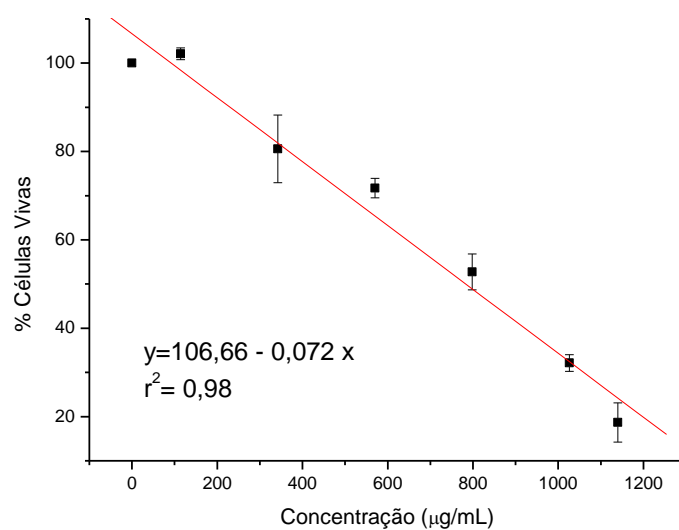
De acordo com Bruggisser et al. (2002), pode ocorrer uma interação entre o AC e o reagente MTT, possivelmente devido à ação antioxidante do AC que realiza a redução do sal MTT, formando os cristais de formazana da mesma forma que ocorre em células vivas, o que resulta em um falso-positivo. Para evitar esse problema, as placas de 96 poços foram lavadas delicadamente com PBS para a remoção do AC e, em seguida, foi adicionada a solução de MTT (Figura 18).

**Figura 18** - Cultura de células HepG2 (1 a 6) e células HaCat (7 a 12) com MTT.



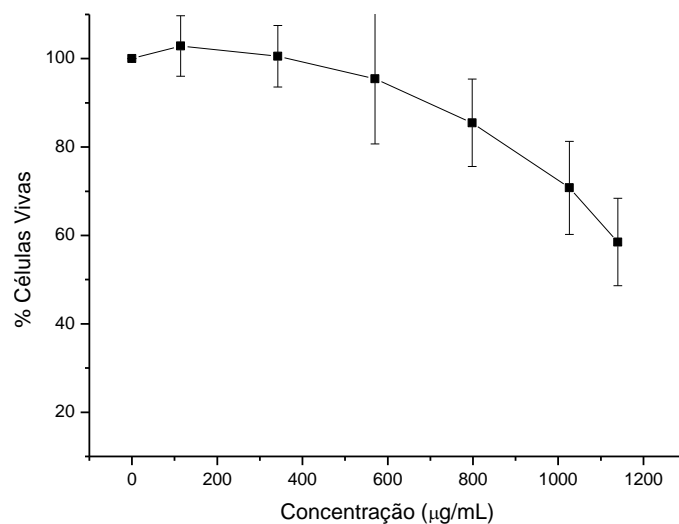
Na Figura 19, estão apresentados os resultados obtidos para a linhagem HepG2. Uma curva dose *versus* resposta foi construída, sendo então possível utilizar a equação da reta, gerada por regressão linear, para determinar a  $IC_{50}$  do AC, ou seja, a concentração do produto necessária para causar a letalidade de 50% das células.

**Figura 19** - Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações de AC.



O mesmo processo foi conduzido para as células HaCat e os resultados obtidos são observados na Figura 20.

**Figura 20** - Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações de ácido cafeico.



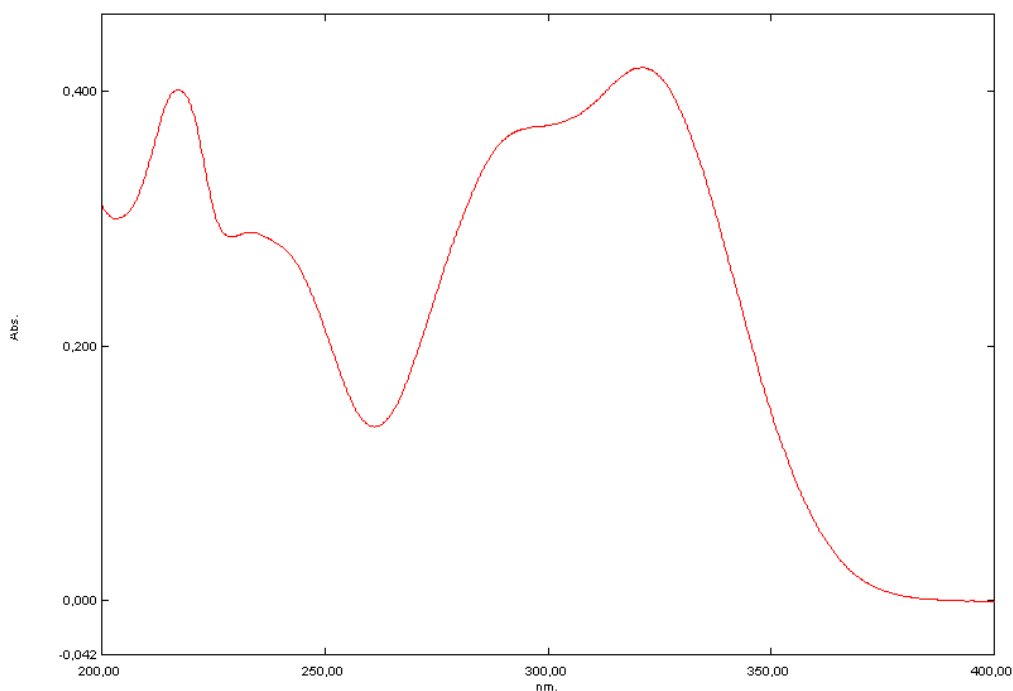
Os resultados são promissores, uma vez que a concentração de AC que inibiu o crescimento de 50% das células HepG2 ( $IC_{50}=781,8 \mu\text{g/mL}$ ) é aproximadamente 330 a 400 vezes maior que a concentração necessária para inibir 50% de radicais DPPH ( $IC_{50}$  DPPH=  $2,39 \mu\text{g/mL}$ ) e ABTS ( $IC_{50}$  ABTS=  $1,96 \mu\text{g/mL}$ ) respectivamente.

A concentração máxima de AC testada ( $1140 \mu\text{g/mL}$ ) não atingiu 50% de morte celular em células HaCat, podendo-se afirmar que o AC é seguro nas condições testadas, podendo ser aplicado em produtos de uso tópico.

### 5.1.5 Espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta

O ativo mostrou-se solúvel no solvente testado e os espectros de absorção da substância de referência apresentaram máxima absorvância em 325 nm (Figura 21) e foi este o comprimento de onda selecionado para prosseguir as análises por CLAE.

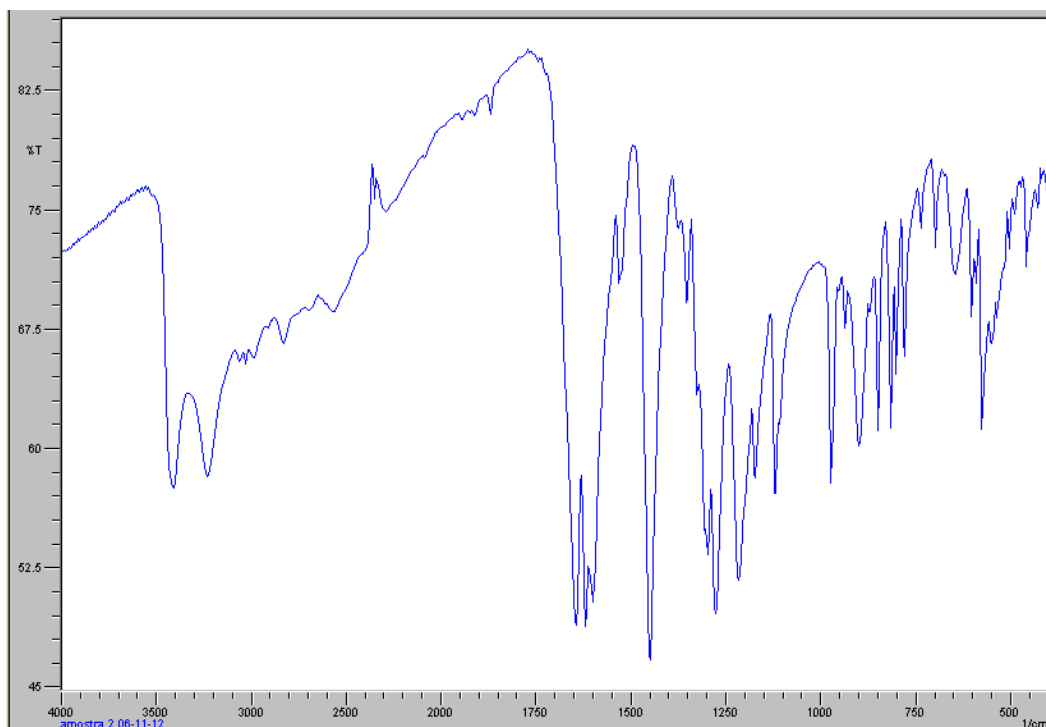
**Figura 21** - Espectro na região ultravioleta da solução de ácido cafeico na concentração de  $4 \mu\text{g/mL}$  em solução de etanol e água (40:60).



### 5.1.6 Espectrofotometria de absorção na região do infravermelho

Analisando o espectro de absorção do AC na região do infravermelho, apresentado na Figura 22, pode ser observado que as bandas fortes na região de 3600 a 3200  $\text{cm}^{-1}$  indicam estiramento axial do grupo  $\text{-OH}$ . Não existem bandas fortes em torno de 2900  $\text{cm}^{-1}$  já que o AC não apresenta estiramento  $\text{C-H}$  ( $\text{sp}^3$ ), que aparece em quase todos os espectros de compostos orgânicos. A existência de uma banda forte de 3200–3010 indica o estiramento da ligação  $\text{C-H}$  de alenos ( $\text{C-H}$   $\text{sp}^2$ ). A região de estiramento do grupo carbonila é de 1850-1650  $\text{cm}^{-1}$ , no entanto, esta banda pode ser significativamente deslocada para números de onda mais baixos, o que pode indicar um efeito de ressonância forte na estrutura do grupo carbonila. As bandas encontradas de 1600-1450  $\text{cm}^{-1}$  indicam a deformação axial de grupamento  $\text{C=C}$  do anel aromático (Figura 22).

**Figura 22** - Espectroscopia de absorção na região infravermelho de ácido cafeico em pastilhas de KBr.



## 5.2 Preparação das formulações

Como o objetivo deste trabalho foi produzir uma formulação que apresentasse a menor toxicidade possível, baixa concentração de componentes oleosos, devido à finalidade de uso (creme facial), além de ter o mínimo de componentes possíveis que pudessem comprometer as análises, uma emulsão com características simples foi desenvolvida (Tabela 9).

Tabela 9 - Composição percentual e função dos componentes da emulsão proposta.

<b>Matéria Prima</b>	<b>INCI name</b>	<b>Função</b>	<b>Composição Percentual</b>
Álcool cetosteárico	Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	4,0
Álcool cetosteárico etoxilado 20 OE	Ceteareth – 20	Tensoativo não-iônico	2,0
Estearato de octila	Ethylhexyl Stearate	Emoliente	1,5
Monoestearato de glicerila	Glyceryl Stearate	Agente de consistência	1,0
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante e solubilizante	3,0
EDTA dissódico	Dissodium EDTA	Sequestrante	0,05
Metilparabeno	Methylparaben	Conservante antimicrobiano	0,18
Propilparabeno	Propylparaben	Conservante antimicrobiano	0,02
Rapithix A-100	Sodium Polyacrylate	Polímero hidrofílico espessante	1,5
Água q.s.p.	Aqua		100

A fase hidrofóbica da emulsão foi preparada com álcool cetosteárico, um álcool graxo usado em cosméticos como agente sobreengordurante e espessante, principalmente em sistemas do tipo O/A e, também, pelo estearato de octila, um emoliente não-comedogênico de alta compatibilidade dérmica e médio coeficiente de espalhabilidade, possuindo amplo espectro de aplicação (ROWE et al., 2009).

O tensoativo utilizado, álcool cetosteárico etoxilado 20 OE, é do tipo não-iônico. Emulsões contendo este tipo de emulsionante são amplamente empregadas em cosméticos devido às suas características, como a compatibilidade com o pH cutâneo, estabilidade em diversos valores de pH e possibilidade de incorporação de diferentes substâncias ativas, como, por exemplo, o AC (JUNGINGER, 1997).

O monoestearato de glicerila é usado normalmente como emulsionante secundário, colaborando na estabilidade do sistema. Tem grande aplicação como doador

de consistência em emulsões, tanto óleo em água (O/A) como água em óleo (A/O) (BATISTUZZO et al., 2002).

Na fase hidrofílica foram incluídos os conservantes antimicrobianos, metilparabeno e propilparabeno; o propilenoglicol, como umectante e solvente para os parabenos; o EDTA Na<sub>2</sub> (ácido etilenodiamino tetra-acético dissódico), um agente sequestrante capaz de formar complexos muito estáveis com diversos íons metálicos (ROWE et al., 2009).

Os agentes de consistência usualmente empregados são de natureza graxa ou polimérica (SANCTIS, 2000). Nesta formulação, o espessante hidrofílico, Rapithix A-100, foi utilizado com a finalidade de produzir aumento da viscosidade da emulsão, sem a necessidade de adição de grandes quantidades de componentes graxos, uma vez que a intenção foi obter uma formulação com baixa concentração de material graxo. Além disso, este polímero auxilia no desenvolvimento de formulações estáveis, por causar o espessamento da fase aquosa da formulação, colaborando para a prevenção da separação de fases da emulsão (DEG, 2012).

Os produtos obtidos estão apresentados na Figura 23.

**Figura 23** - Emulsão base e emulsão com AC a 1%.



Como não existem produtos em filme contendo AC no mercado, a proposta foi trazer algo inovador, a fim de comparar os resultados dos testes, quando possível, com uma emulsão clássica.

Na Tabela 10 segue a composição e a função dos componentes da preparação em filme proposta neste trabalho (Figura 24).

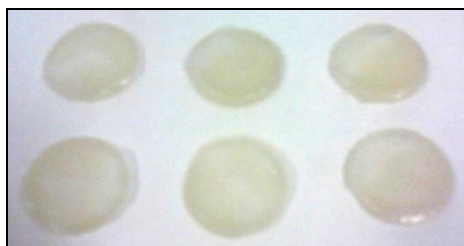
Tabela 10 - Composição percentual e função dos componentes da formulação em filme proposta.

Matéria Prima	INCI name	Função	Composição Percentual
Pullulan®	Pullulan	Agente filmógeno	12
Rapithix A-100	Sodium Polyacrylate	Agente geleificante	1
Propilenoglicol	Propylene Glycol	Umectante e solubilizante	3
Dimeticona	PEG-12 Dimethicone	Emoliente e Umectante	2
Água q.s.p.	Aqua		100

O Pullulan® utilizado nesta formulação é um material cuja viscosidade não é afetada por aquecimento, por mudanças de pH e pela maioria dos íons; apresenta excelentes propriedades adesivas quando seco, sendo capaz de formar um filme transparente, incolor, impermeável ao oxigênio, com excelentes propriedades mecânicas e que se dissolve facilmente em água, sendo ainda biodegradável. Por essas propriedades, o mesmo foi escolhido como agente formador de película (SINGH et al., 2008).

O Pullulan® forma soluções aquosas viscosas, mas não forma géis, por isso, como agente geleificante foi utilizado o RapiThix™ A-100 (*sodium polyacrylate*), homopolímero aniônico pré-neutralizado (SINGH et al., 2008).

**Figura 24** - Formulação em filme.



### **5.3 Desenvolvimento e validação de métodos quantitativos**

#### **5.3.1 Validação do método de quantificação do AC por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

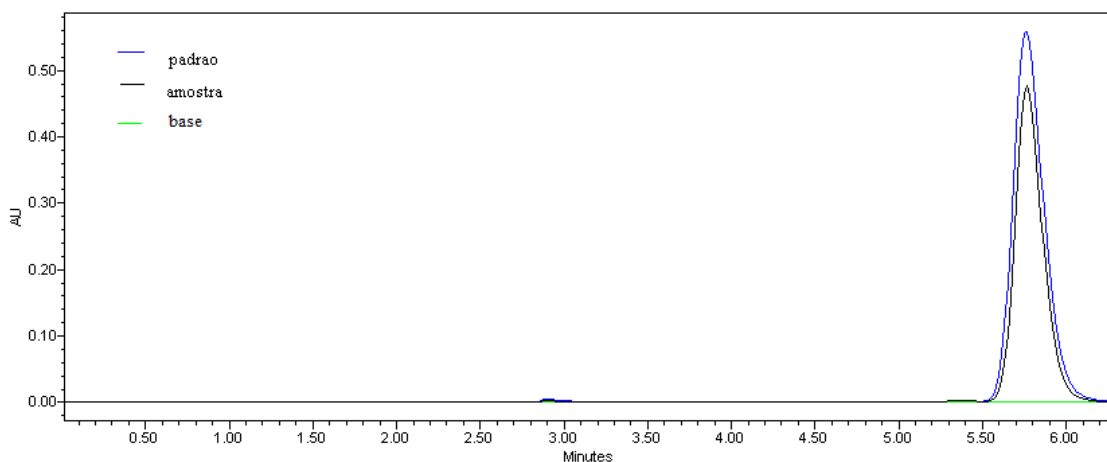
As condições testadas durante o desenvolvimento do método foram: fase móvel metanol: água purificada (40:60 v/v) ou etanol: água (40:60, v/v); vazão 1,0 mL/min, 0,7mL/min, 0,5mL/min; pH da fase móvel de 2,5 ou 3,0.

Através do estudo preliminar foi possível avaliar que a fase móvel composta por etanol: água purificada (40: 60, v/v), vazão 0,7 mL/min e pH da fase móvel de 2,5 foi a ideal para quantificação confiável do ativo, redução da assimetria do pico, redução de danos à coluna cromatográfica, além de diminuir a geração de resíduos tóxicos. Sob essas condições é que se seguiu a validação do método.

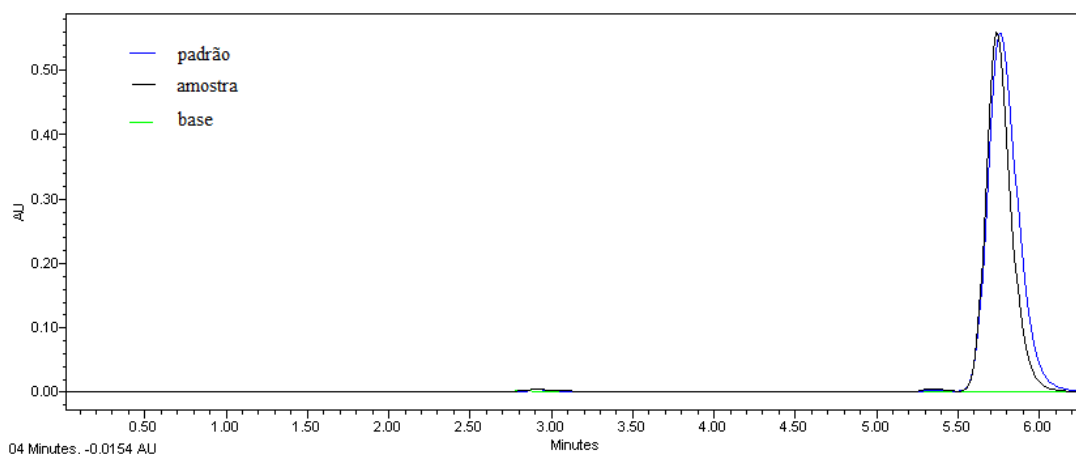
##### **5.3.1.1 Especificidade/ seletividade**

Na análise inicial injetou-se a base da emulsão e do filme. Não foram obtidos picos na solução com as bases, próximos ou no mesmo tempo de retenção do AC (aproximadamente 6 minutos), portanto, não interferiram na análise. As Figuras 25 e 26 representam a injeção da base e amostra das formulações em relação ao padrão de AC a 40 µg/mL.

**Figura 25** - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e base da emulsão, na concentração de 40 µg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm.

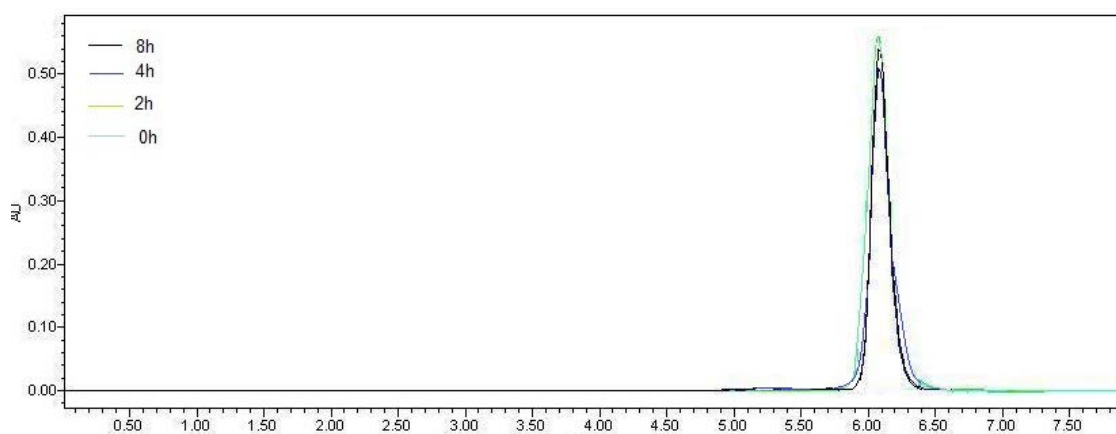


**Figura 26** - Cromatograma da injeção de padrão, amostra e placebo do filme, na concentração de 40 µg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), vazão 0,7 mL/min, detecção a 325 nm.

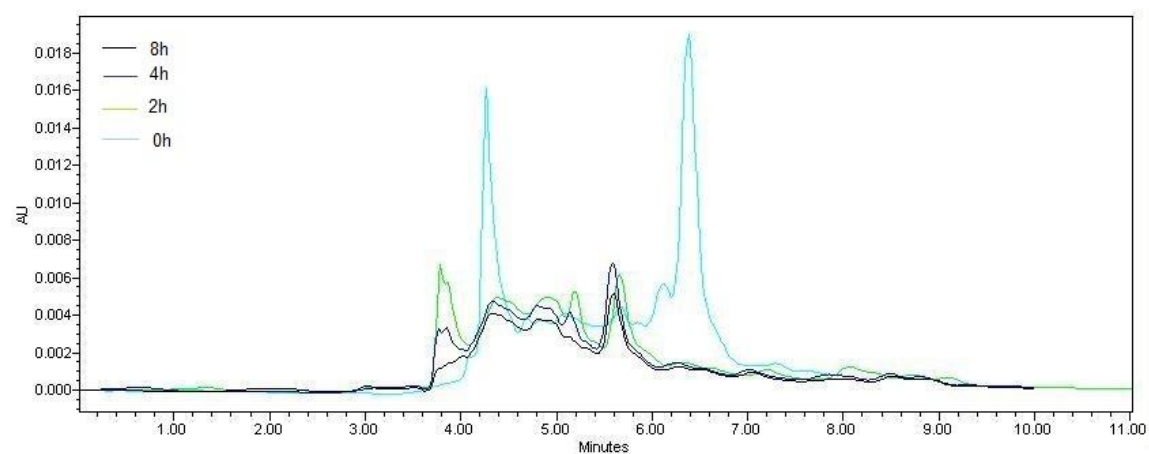


A seletividade também foi realizada utilizando-se o teste de estresse, já que os produtos de degradação deste ativo não estão disponíveis no mercado. Esta análise é utilizada para verificar a influência dos produtos de degradação no pico do princípio ativo. Portanto, injetou-se em CLAE diferentes soluções com concentração de 40 µg/mL do AC expostas a degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e em alta temperatura. Após o período de exposição, estas soluções foram imediatamente injetadas no CLAE e, deste modo, foram obtidos os cromatogramas que podem ser observados nas Figuras 27 a 33. Notou-se que não existem interferentes no pico de análise do AC, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do padrão.

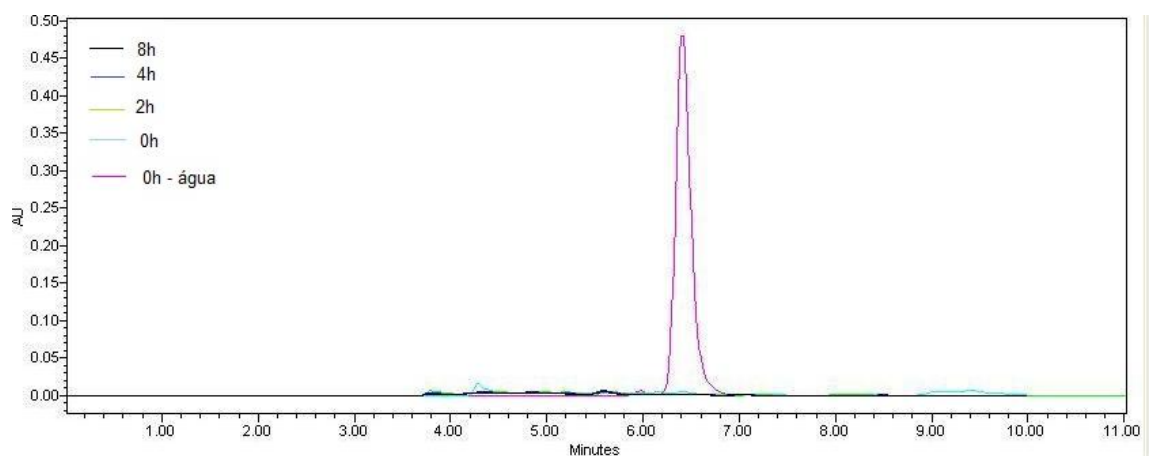
**Figura 27** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em HCl 0,001 M, a 80°C.



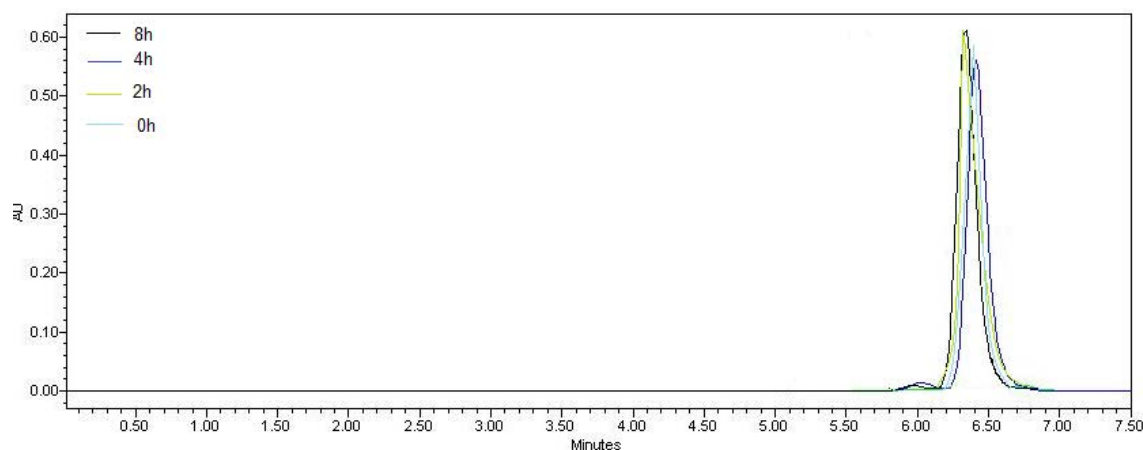
**Figura 28** - Cromatogramas obtidos por CLAE (escala ampliada) para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em NaOH 0,001 M, a 80°C.



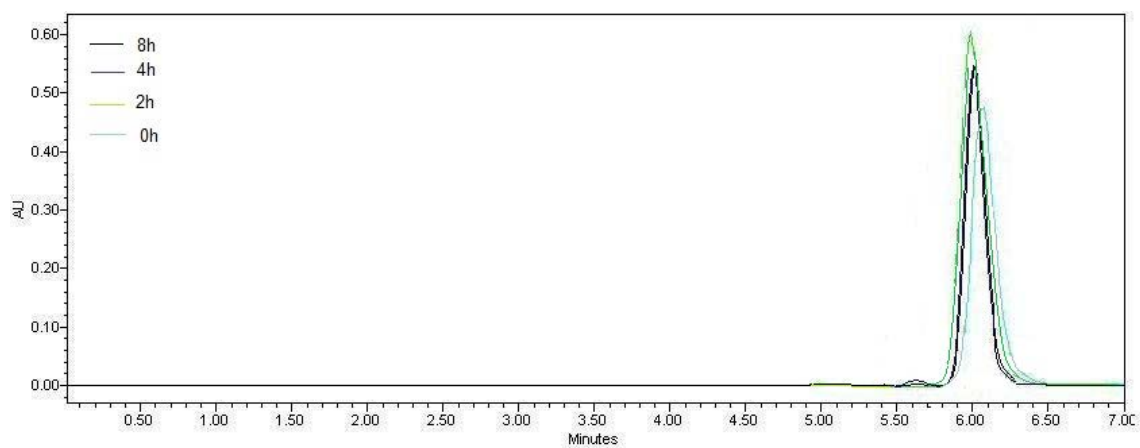
**Figura 29** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em NaOH 0,001 M, a 80°C, comparando a mesma solução em água no tempo 0.



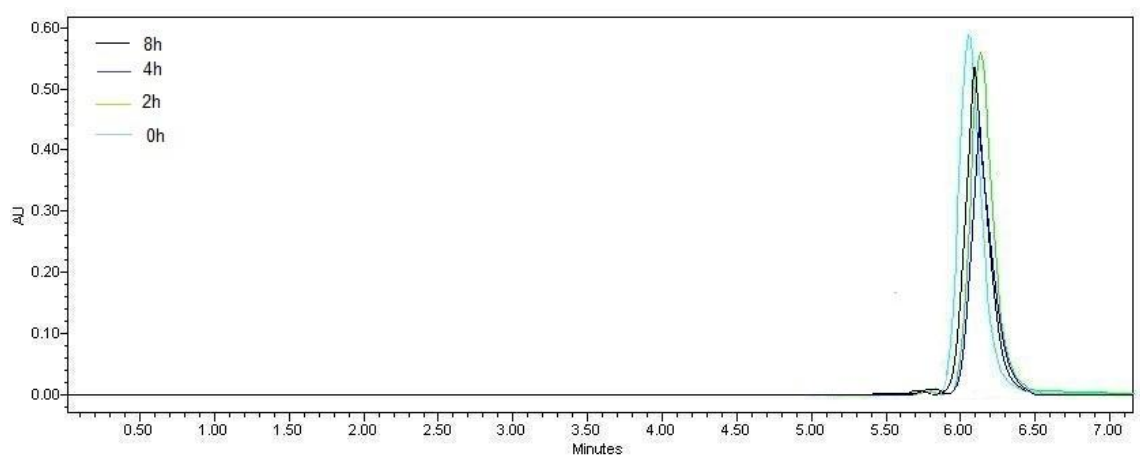
**Figura 30** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em água, a 35°C.



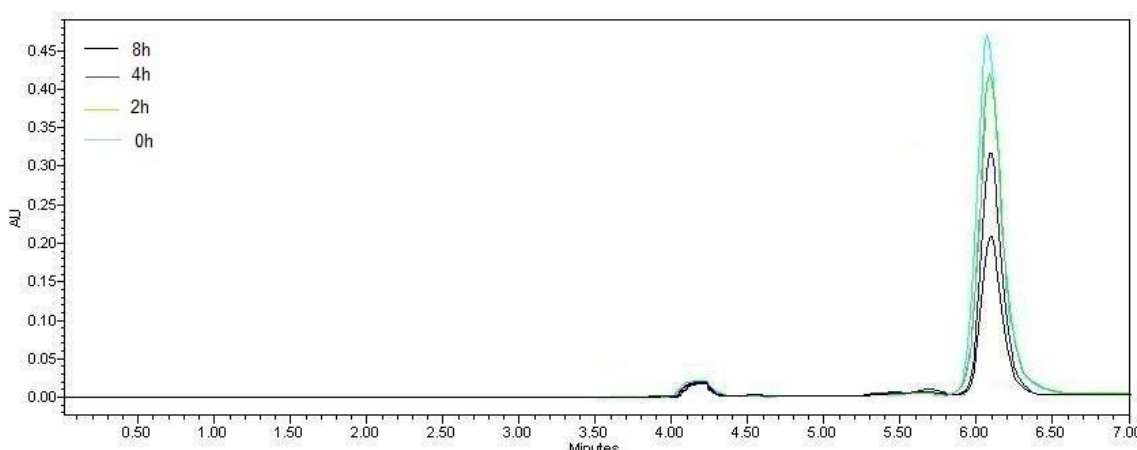
**Figura 31** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em água, a 80°C.



**Figura 32** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40  $\mu\text{g/mL}$ ), em luz ultravioleta.



**Figura 33** - Cromatogramas obtidos por CLAE para solução de ácido cafeico (40 µg/mL), em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% a 80°C.



Foi observado diminuição do pico principal e aparecimento de novos picos na degradação oxidativa (Figura 33).

### 5.3.1.2 Linearidade

Os resultados dos valores das áreas obtidas para a curva analítica de AC estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido cafeico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico.

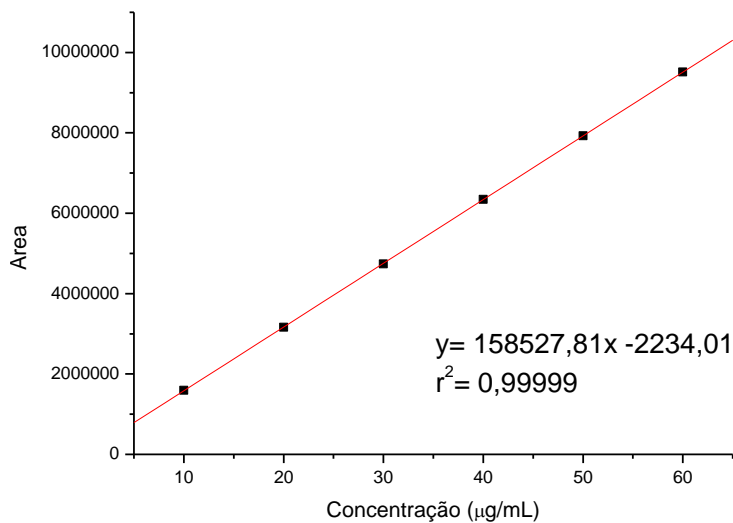
Concentração final µg/mL	1ª curva	2ª curva	3ª curva	Média	DP	DPR (%)
10	1576871,3333	1598455,6667	1606638,6667	1593988,5556	15378,2263	0,9572
20	3179573,6667	3201467,0000	3113528,6667	3164856,4444	45779,1993	1,4703
30	4659477,0000	4831918,0000	4718261,0000	4736552,0000	87663,5336	1,8580
40	6167920,0000	6371922,0000	6485590,6667	6341810,8889	160961,7109	2,4818
50	7766606,6667	7925835,0000	8093293,0000	7928578,2222	163360,4421	2,0185
60	9323913,3333	9558824,0000	9652214,6667	9511650,6667	169158,0146	1,7525

DP: desvio padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo.

A curva analítica de AC (Figura 34) em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 158.527,8137x - 2.234,0148$  com  $r^2 = 0,99999$ . O

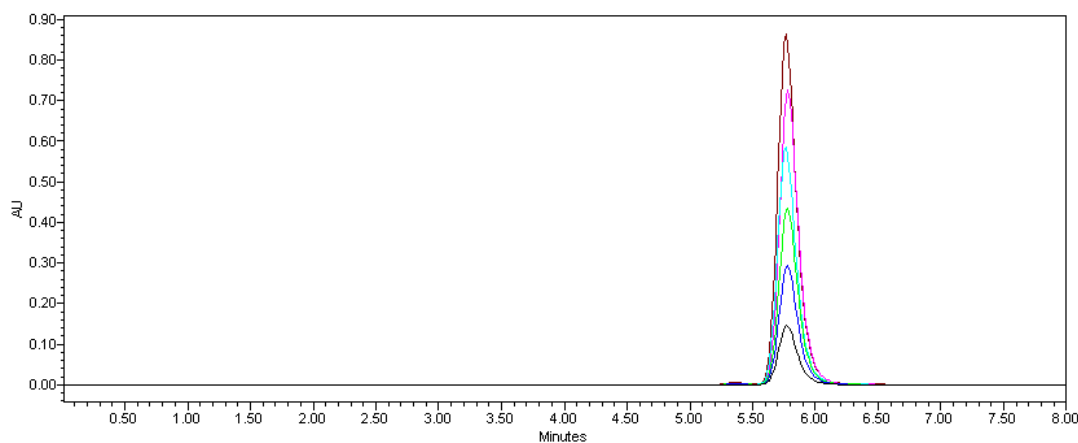
coeficiente de correlação foi satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

**Figura 34** - Curva analítica do AC obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.



A Figura 35 apresenta o cromatograma de AC das 6 concentrações estudadas.

**Figura 35** - Cromatograma do ácido cafeico em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL, obtidas pelo CLAE a 325 nm.



### 5.3.1.3 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade e forneceu desvio padrão relativo de 1,95%. A repetibilidade demonstra a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

Também foi avaliada a precisão entre analistas, obtendo-se desvio padrão relativo de 1,45% para o segundo analista. O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de absorvância encontrados entre os dois analistas, já que o  $F_{\text{cal}} 2,36 < F_{\text{tab}} 4,28$  e o  $P_{\text{valor}} 0,16 > 0,05$  comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Valores das áreas referentes ao pico de ácido cafeico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.

40µg/mL	Área1	Área2	Área3	Área4	Área5	Área6	Área7	Média	DPR%
Analista 1	5871711	5762469	5505668	5672982	5708533	5655685	5717722	5699252	1,9516
Analista 2	5751237	5790979	5771495	5684689	5744990	5545226	5734227	5717549	1,45

DPR: Desvio Padrão Relativo

Tabela 13 - Teste F da precisão interanalista do método de CLAE.

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Média	0,558428571	0,526285714
Variância	8,9619E-05	3,79048E-05
Observações	7	7
gl	6	6
F	2,364321608	
P(F<=f) uni-caudal	0,159443508	
F crítico uni-caudal	4,283865714	

### 5.3.1.4 Limite de detecção

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 14 na equação 5, p.72, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar é 1,44437 µg/mL de AC.

Tabela 14 - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AC por CLAE.

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação Curva Analítica
Curva 1	45251,8000	154299,2914
Curva 2	29908,6444	158614,1419
Curva 3	-81862,4889	162670,0076
Média	-2234,0148	<b>158527,8136</b>
Desvio Padrão	<b>69385,6867</b>	4186,0258

### 5.3.1.5 Limite de quantificação

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 14 na equação 6, p. 72, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de quantificar é 4,38 µg/mL de AC.

A primeira concentração usada na curva analítica deve ser maior do que o valor do limite de detecção e do limite de quantificação, ou seja, deve ser maior que 4,38 µg/mL.

### 5.3.1.6 Exatidão

Foi determinada pelo ensaio de recuperação, utilizando o método de adição de padrão. O teste de recuperação foi realizado adicionando três níveis de concentração 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3) em relação à concentração de trabalho, de solução de AC às amostras. O ensaio foi realizado em triplicata nas concentrações de 32, 40 e 48 µg/mL. A porcentagem de recuperação foi calculada para cada nível de concentração. Desta maneira, foi possível avaliar a exatidão do método em determinar o teor de amostras com concentrações pré-determinadas. As amostras foram preparadas de acordo com a Tabela 7.

As Tabelas 15 e 16 mostram os valores obtidos no teste de recuperação para o AC utilizando CLAE na emulsão e no filme, respectivamente.

Tabela 15 - Valores obtidos no teste de recuperação do AC na emulsão utilizando o método por CLAE.

	<b>AC adicionado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>AC</b> <b>recuperado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>	<b>Recuperação</b> <b>Média (%)</b>	<b>DPR</b>
<b>R1</b>	32	32,16	100,51		
<b>R2</b>	40	39,92	99,80	100,29	0,43
<b>R3</b>	48	48,27	100,57		

DPR: desvio padrão relativo

Tabela 16 - Valores obtidos no teste de recuperação do AC no filme utilizando o método por CLAE.

	<b>AC adicionado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>AC</b> <b>recuperado</b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Recuperação</b> <b>(%)</b>	<b>Recuperação</b> <b>Média (%)</b>	<b>DPR</b>
<b>R1</b>	32	32,27	100,84		
<b>R2</b>	40	40,40	101,01	100,71	0,38
<b>R3</b>	48	48,14	100,28		

DPR: desvio padrão relativo

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o método é exato, uma vez que a recuperação média foi de 100,29 para a emulsão e 100,71% para o filme e não houveram variações maiores que 5%, o que mostra proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais obtidas nos ensaios realizados (BRASIL, 2003).

### 5.3.1.7 Robustez

A robustez foi avaliada, modificando-se a vazão de fase móvel, comprimento de onda, proporção etanol: água na fase móvel, volume de injeção e marca do solvente utilizado. Os valores do teor obtidos após estas modificações não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Isso indica que o método é robusto, já que pequenas alterações no método utilizado não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, como mostra a Tabela 17.

Tabela 17 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AC.

Variável	Faixa investigada	AC (%)	DPR (%)
<b>Comprimento de onda para leitura dos resultados (nm)</b>	323	98,57	0,7375
	325	100,00	
	327	99,02	
<b>Vazão da Fase móvel (mL/min)</b>	0,65	103,45	1,7776
	0,70	100,00	
	0,75	100,82	
<b>Proporção etanol: água na fase móvel</b>	35:65	94,36	2,9481
	40: 60	100,00	
	45: 55	96,40	
<b>Volume de injeção (µL)</b>	8	99,32	0,9638
	10	100,00	
	12	98,11	
<b>Fabricante do etanol</b>	JT Baker <sup>®</sup>	100,00	2,8655
	Tedia <sup>®</sup>	96,02	

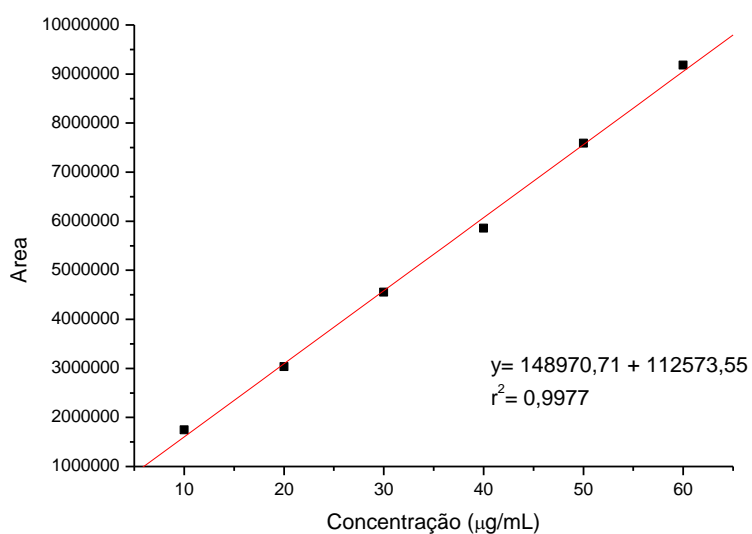
DPR: desvio padrão relativo

### 5.3.1.8 Curvas analíticas com solventes diferentes

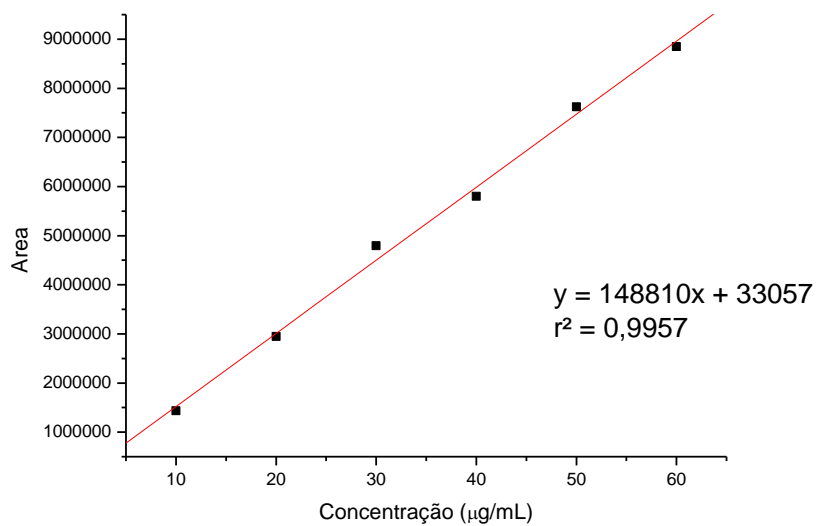
A validação foi efetuada utilizando a mesma solução da fase móvel, etanol: água (40: 60) como solvente para o AC; entretanto, na avaliação da liberação e permeação do AC das formulações, foi utilizado tampão fosfato (pH = 7,4) adicionado de 1% de polissorbato 80. Nos estudos de retenção cutânea, foi utilizado como solvente o metanol. Por isso, duas novas curvas analíticas foram construídas com esses outros solventes utilizados nos estudos.

As curvas analíticas estão apresentadas nas Figuras 36 e 37.

**Figura 36** - Curva analítica para quantificação do AC utilizando tampão fosfato pH 7,4 + 1% de polissorbato 80 como sistema solvente.



**Figura 37** - Curva analítica para quantificação do AC utilizando metanol como solvente.



### 5.3.2 Validação do método de quantificação do AC por espectrofotometria na região do ultravioleta

A validação da metodologia de quantificação do AC por espectrofotometria na região do ultravioleta foi realizada para determinar o teor de AC durante os 90 dias do estudo de estabilidade acelerada. Como apenas a emulsão foi submetida ao estudo de estabilidade, a validação foi realizada apenas com esta formulação.

#### 5.3.2.1 Especificidade/ seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Uma solução estoque da amostra da emulsão foi preparada com concentração final de AC igual a 100 µg/ mL em etanol e água (40:60). Para obtenção de três concentrações, baixa, média e alta de AC, esta solução foi diluída e a leitura espectrofotométrica foi determinada, com três réplicas de cada e os valores comparados com as concentrações teóricas AC (3, 5 e 7 µg/ mL), determinando-se o DPR (Tabela 18).

Tabela 18 - Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do AC.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental 1 (µg/mL)	Concentração experimental 2 (µg/mL)	Concentração experimental 3 (µg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
3	2,97	2,94	2,91	0,01	2,92	0,47
5	4,80	4,95	4,80	0,09	4,85	1,77
7	6,81	6,85	6,80	0,03	6,82	0,42

DPR: desvio padrão relativo

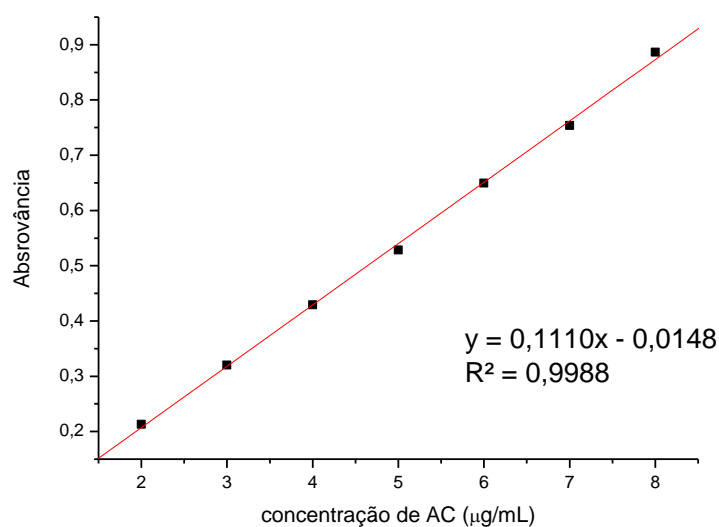
Os valores de DPR foram inferiores a 5%, portanto o método foi considerado seletivo e específico.

### 5.3.2.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003).

A curva analítica de AC (Figura 38) em concentrações de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8  $\mu\text{g/mL}$  foi construída com as médias dos valores das áreas de três curvas analíticas obtidas durante os ensaios de linearidade. A equação da reta, determinada pelo método dos mínimos quadrados, é:  $y = 0,1110x - 0,0148$  com  $r^2 = 0,9988$ . O coeficiente de correlação foi satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

**Figura 38** - Curva analítica do AC obtida pelo método espectrofotométrico, utilizando como solvente a solução de etanol 40%.



### 5.3.2.3 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade, sendo que o desvio padrão relativo entre as medidas do analista 1 foi de 1,1698% e do analista 2 foi de 1,6952% (Tabela 19).

Tabela 19 - Valores absorvâncias do ácido cafeico a 325 nm no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método espectrofotométrico.

40 µg/mL	Abs1	Abs2	Abs3	Abs4	Abs5	Abs6	Abs7	Média	DPR%
Analista 1	0,530	0,518	0,530	0,522	0,526	0,522	0,536	0,526	1,169
Analista 2	0,543	0,553	0,560	0,552	0,565	0,568	0,568	0,558	1,695

DPR: desvio padrão relativo

O teste F demonstrou que não houve diferença significativa entre os valores de absorvância encontrados entre os dois analistas, já que o  $F_{\text{cal}} 2,36 < F_{\text{tab}} 4,28$  e o  $P_{\text{valor}} 0,16 > 0,05$ , comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado, conforme apresentado na Tabela 20.

Tabela 20 - Teste F da precisão interanalista do método espectrofotométrico.

	<i>Analista 1</i>	<i>Analista 2</i>
Média	0,558428571	0,526285714
Variância	8,9619E-05	3,79048E-05
Observações	7	7
gl	6	6
F	2,364321608	
P(F<=f) uni-caudal	0,159443508	
F crítico uni-caudal	4,283865714	

#### 5.3.2.4 Limite de detecção

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 21 na equação 5, p.72, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar é 0,43 µg/mL de AC.

Tabela 21 - Determinação dos limites de detecção e de quantificação do AC pelo método espectrofotométrico.

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação Curva Analítica
Curva 1	0	0,1088
Curva 2	-0,0026	0,1088
Curva 3	-0,0263	0,1130
Média	-0,0096	<b>0,1102</b>
Desvio Padrão	<b>0,0145</b>	0,0024

### 5.3.2.5 Limite de quantificação

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 21 na equação 6, p.72, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de determinar é 1,32 µg/mL de AC.

A primeira concentração usada na curva analítica (2 µg/mL) foi maior que os valores de limite de detecção e do limite de quantificação, comprovando que a quantidade usada foi suficiente para ser detectada e quantificada pelo método.

### 5.3.2.6 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

Para isto, concentrações conhecidas de AC, denominadas concentrações teóricas, foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 325 nm e, por meio da equação obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003), como apresentado na Tabela 22.

Tabela 22 - Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do AC por espectrofotometria.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração Experimental 1 (µg/mL)	Concentração Experimental 2 (µg/mL)	Concentração Experimental 3 (µg/mL)	Exatidão (%)
3	2,9892	2,9892	3,0252	100,04
5	4,8901	4,9712	4,9802	98,94
7	6,8721	6,8360	6,8721	98,00

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o método é preciso, uma vez que não houve variações maiores que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais obtidas nos ensaios realizados (BRASIL, 2003).

### 5.3.2.7 Robustez

A robustez foi avaliada, modificando-se comprimento de onda, proporção etanol: água no preparo das soluções e marca do solvente utilizado. Os valores do teor obtidos após estas modificações não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Isso indica que o método é robusto, já que pequenas alterações no método utilizado não provocaram variações significativas nos resultados obtidos, como mostra a Tabela 23.

Tabela 23 - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por espectrofotometria para análise de AC.

Variável	Faixa investigada	AC (%)	DPR (%)
Comprimento de onda para leitura dos resultados (nm)	323	95,05	2,799
	325	100,00	
	327	95,61	
Proporção etanol: água na fase móvel	35:65	99,07	1,098
	40:60	100,00	
	45:55	97,83	
Fabricante do etanol	Chemis	100,00	2,857
	Tec-Lab	96,04	

DPR: desvio padrão relativo

## 5.4 Caracterização dos sistemas

### 5.4.1 Caracterização do filme

#### 5.4.1.1 Exame macroscópico dos filmes

A análise macroscópica permitiu observar que todos os filmes preparados estavam translúcidos, incolores, flexíveis, com superfície contínua e lisa.

#### 5.4.1.2 Determinação do perfil de absorção de água

A característica de absorver água ou intumescer significa, segundo Ansel (2007), a captura de um líquido por um gel com respectivo aumento de volume, através de solvatação, como função de sua hidrofília, da estrutura de rede formada e do número de grupos ionizáveis presentes na estrutura polimérica. Pode ser descrito ainda como o

processo de dissolução de um polímero em um solvente, a partir da difusão do solvente para dentro do polímero, produzindo intumescência do gel.

Quando um polímero é colocado em um meio aquoso, as interações positivas entre a estrutura química da macromolécula e a água, como por exemplo, ligações de hidrogênio promovem o intumescimento. À medida que as moléculas de água penetram na matriz as cadeias poliméricas tornam-se mais estendidas com consequente expansão e ordenamento da estrutura polimérica (ANSEL, 2007).

Os filmes base obtiveram porcentagem de intumescimento ( $%I$ ) de 18,2% e os filmes contendo AC apresentaram  $%I = 14,5\%$  logo após 30 s do início do experimento, sendo que esse valor se manteve inalterado ao longo dos 5 minutos do teste. Esta capacidade de intumescimento é necessária para confirmar um processo eficaz de polimerização e reticulação.

Os fenômenos de polimerização e reticulação são importantes para a matriz polimérica incorporar o princípio ativo e compor um sistema de liberação eficiente (CAMPOS, 2009; AMARAL et al., 2012).

#### **5.4.1.3 Propriedades Mecânicas**

As principais propriedades mecânicas dos filmes são a resistência à tração e a alongação. A resistência à tração é expressa pela tração máxima desenvolvida pelo filme em um teste de tração. A alongação é a habilidade do filme em se estender. Os filmes obtidos devem ser resistentes à ruptura e a abrasão, fazendo com que o produto embalado não perca sua integridade e proteção por manuseio e transporte. Além disso, ele deve possuir flexibilidade o suficiente para se adaptar a eventuais deformações no produto embalado sem dano mecânico (GONTARD et al., 1994). Assim, os filmes poliméricos devem ser mecanicamente resistentes a quebras ou fissuras durante o processamento, transporte e armazenamento (FELTON, 2007).

As propriedades mecânicas dos materiais poliméricos são de grande importância e interesse científico e tecnológico, devido aos requisitos e/ou exigências que os diversos polímeros existentes devem atender na maior parte de suas aplicações. Valores de propriedades mecânicas tais como resistência à tensão, alongação, entre outros, podem servir como base de desempenho mecânico dos diferentes polímeros, contribuindo para seleção de materiais poliméricos para o projeto de uma peça ou produto (CANEVAROLO, 2004).

Os ensaios de tensão são realizados através da aplicação de uma força ao material sob condições controladas, geralmente deformação a velocidade constante, até a ruptura do material ou até que a tensão ou deformação alcance um valor pré-estabelecido. Durante o experimento, a carga ou tensão suportada pelo material (resposta do material) e a deformação a ele imposta são registrados. Elongação é o incremento do comprimento entre marcas produzido no corpo de prova pelo carregamento sob tração.

Os valores de resistência à perfuração ( $R_p$ ) e o alongamento na perfuração ( $A_p$ ) após a adição do AC (0,25 MPa e 10%, respectivamente) diminuíram em relação ao filme base (0,29 MPa e 24%, respectivamente).

Esses valores indicam que o filme base apresentou maior resistência à perfuração e alongamento em relação ao filme com ácido cafeico possivelmente pela maior formação de ligações cruzadas ou ligações covalentes intra e intermoleculares. Provavelmente o ácido cafeico atuou diminuindo as forças intermoleculares, fator que pode ter dificultado a interação entre as cadeias poliméricas da matriz.

#### **5.4.2 Caracterização da emulsão**

Além de serem mais aceitáveis pelos usuários, as emulsões são de fácil aplicação e espalhamento na pele, de tal forma que, colher informações sobre o comportamento do AC presente nestes sistemas e possivelmente predizer o comportamento que tal inclusão proporciona no produto final é mais do que uma necessidade, é uma exigência.

##### **5.4.2.1 Caracterização reológica**

A reologia consiste no estudo do escoamento ou deformação de um material quando submetido a uma tensão. O método é aplicável na caracterização de sistemas semi-sólidos, pois o comportamento do fluido está relacionado com o tipo, grau de organização do sistema e interações entre seus componentes, podendo-se verificar sinais de instabilidade do sistema expressas em função do tempo, da temperatura e da variação na área de histerese (SCHRAMM, 2006; JIMÉNEZ et al., 2001).

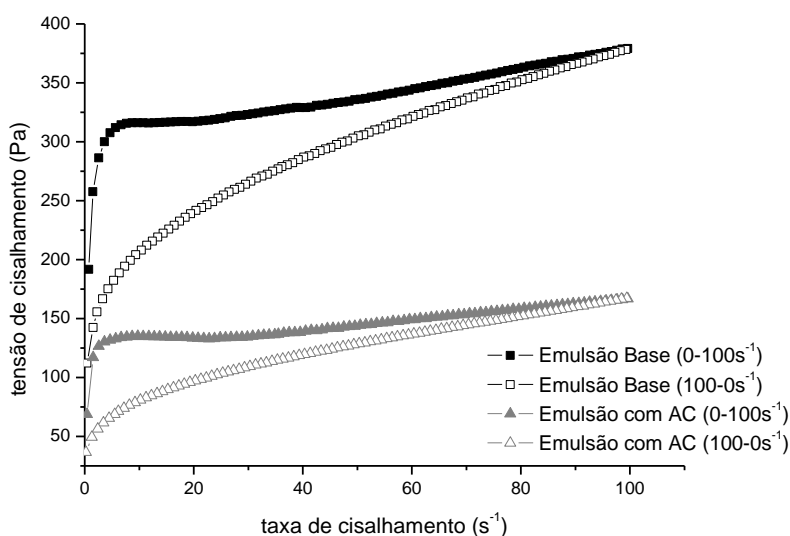
Propriedades reológicas de semi-sólidos são parâmetros físicos importantes em termos técnicos e visuais. A avaliação estrutural e a consistência são essenciais para

determinar, ajustar e prever o comportamento de novas formulações. Também podem ser empregadas para verificar a qualidade durante o processo de produção, além de permitir um estudo do efeito de aditivos na formulação e estabilidade (MAMBRO et al., 2005).

Segundo Lucero et al. (1995), a tensão de cisalhamento, taxa de cisalhamento e tempo são parâmetros que descrevem as propriedades reológicas e são importantes para avaliar as mudanças físicas na formulação. A viscosidade é um parâmetro importante por que seu valor pode ser alterado em função da presença ou não de diferentes materiais, portanto pode ser considerado como um dos parâmetros de referência para avaliar a estabilidade de sistemas semi-sólidos (WILKINSON & MOORE, 1990).

Na Figura 39 estão apresentadas as curvas de fluxo da emulsão base e da emulsão com AC.

**Figura 39** - Curvas de fluxo da emulsão base e da emulsão com AC.



O reograma apresentado na Figura 39 demonstra que as formulações estudadas comportam-se como sistemas não-Newtonianos, pois, ao contrário dos Newtonianos, apresentam uma relação não linear entre tensão de cisalhamento e taxa de cisalhamento (MILAN et al., 2007).

Além disso, todas as formulações também apresentam caráter tixotrópico, pois apresentaram uma área entre as curvas ascendentes e descendentes do reograma, ou seja, após terem sofrido o cisalhamento crescente ( $0-100\text{ s}^{-1}$ ), com a redução gradual

deste cisalhamento até que cessasse, não foi observada uma recuperação total da estrutura.

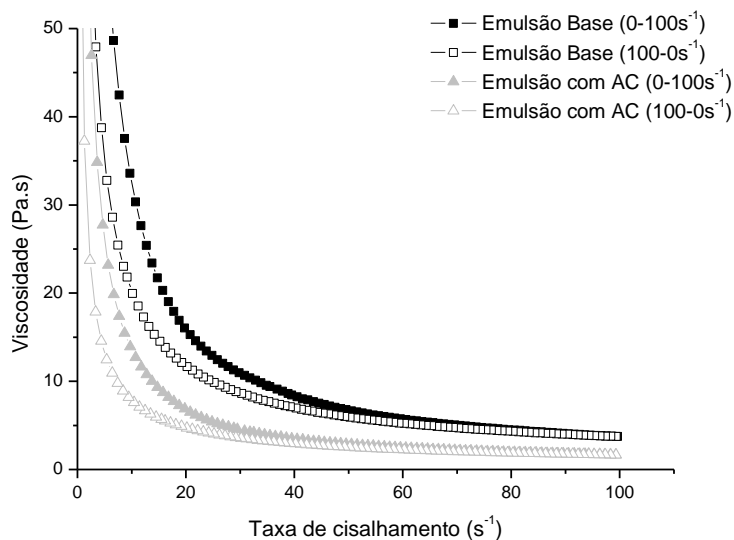
O caráter tixotrópico é fruto da destruição gradual da estrutura construída pelas gotículas da fase dispersa, cuja força de ligação não resiste à ação imposta pelo cisalhamento. O fenômeno é considerado reversível, porque, após a retirada do esforço externo, as ligações quebradas são reconstituídas, reorganizando a estrutura interna (NAVARRO, 1997; COLO et al., 2004).

O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira (“shelf-life”), pois durante o armazenamento apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação. Além dessa vantagem, a obtenção de formulações de uso tópico com caráter tixotrópico é bastante almejada, pois elas se deformam durante a aplicação, ou seja, tornam-se mais fluidas, facilitando o espalhamento e recuperando a viscosidade inicial no momento em que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra.

Por outro lado, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado, para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação devido a uma recuperação muito lenta da sua estrutura, e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar baixa espalhabilidade do produto, não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (MARTIN, 1993).

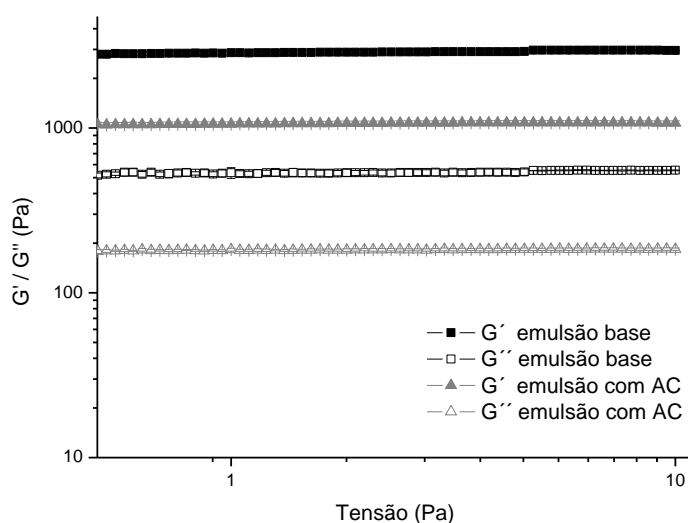
Também foi possível observar que a emulsão base é mais viscosa que a emulsão com AC (Figura 40). A viscosidade aparente mínima (valor de viscosidade na taxa máxima de cisalhamento) da emulsão base foi  $3,8 \pm 0,07$  e da emulsão com AC foi  $1,67 \pm 0,03$ . Isto também é facilmente observado pela tangente do ângulo formado entre o eixo x do reograma apresentado na Figura 39 anteriormente apresentada.

**Figura 40** - Curva da viscosidade *versus* taxa de cisalhamento das emulsões base e com AC.



Em seguida, foram feitas análises das formulações submetidas a frequências constantes, mas com tensão de cisalhamento variável, de 0-10 Pa. Este ensaio, denominado varredura de tensão, é útil na observação da região viscoelástica linear, para a determinação de intervalos de tensão de cisalhamento em que as amostras podem ser submetidas sem nenhum dano às suas estruturas e, também, tensões suficientes para promover o fluxo dos produtos.

**Figura 41** - Varredura de tensão da emulsão base e da emulsão com AC.

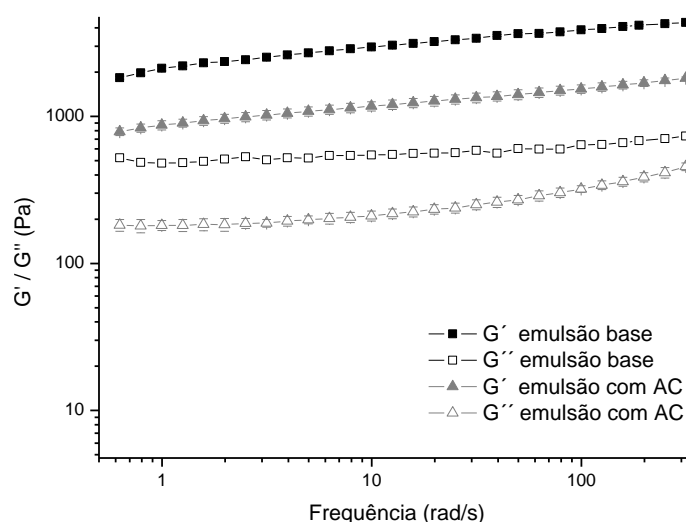


O gráfico obtido na varredura de tensão (Figura 41) mostra que esta formulação pode ser submetida a uma faixa de tensão de 0 a aproximadamente 10 Pa, sem nenhum tipo de alteração estrutural.

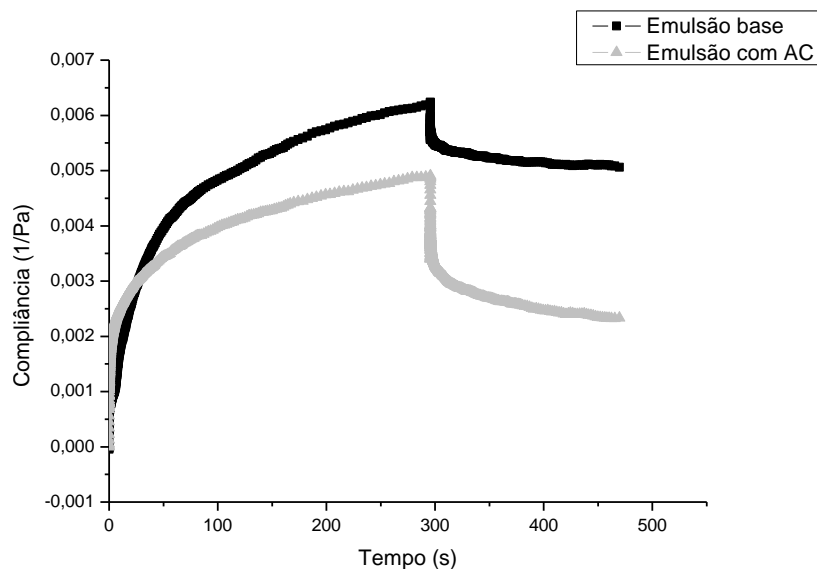
O ensaio de varredura de frequência, apresentado na Figura 42, é útil na caracterização de produtos com características viscoelásticas. Segundo este resultado, as emulsões podem ser caracterizadas como viscoelásticas, apresentando módulo elástico ( $G'$ ) superior ao viscoso ( $G''$ ). Isto é uma característica vantajosa para uma emulsão, demonstrando maior estabilidade deste produto.

Para a emulsão com AC (Figura 42), comportamento semelhante foi observado, mas os valores de  $G'$  e  $G''$  são menores que o da emulsão base demonstrando uma característica menos viscoelástica.

**Figura 42** - Varredura de frequência da emulsão base e da emulsão com AC.



Após o ensaio de varredura de frequência, as formulações foram avaliadas no teste de fluência e relaxação. Este é um ensaio que permite diferenciar, de forma bastante satisfatória, as respostas elásticas das viscosas (SCHRAMM, 2006).

**Figura 43** - Ensaio de fluência e relaxação da emulsão base e da emulsão com AC.

O perfil de resposta observado (Figura 43) demonstra que a emulsão base e a emulsão com AC são realmente formulações viscoelásticas, como já havia sido verificado na varredura de frequência (SCHRAMM, 2006).

O comportamento viscoelástico de um fluido significa que ele apresenta características semelhantes às de um líquido e de um sólido concomitantemente (BARRY & WARBUNTON, 1968). Eles têm sido descritos como uma dispersão de moléculas com segmentos intermitentes, tipo mola em um óleo altamente viscoso (SCHRAMM, 2006).

Na Tabela 24 estão apresentados os valores de compliância obtidos neste ensaio, uma variável que demonstra o quão complacente é uma amostra, ou seja, quanto mais alta for a compliança, mais fácil será de deformar por uma tensão aplicada e menor sua viscosidade (SCHRAMM, 2006).

Tabela 24 - Valor máximo de compliância e recuperação das formulações.

	Emulsão base	Emulsão com AC
<b>Compliância Máxima (1/Pa)</b>	0,0062 ± 0,0008 <sup>a</sup>	0,0048 ± 0,0007 <sup>a</sup>
<b>Recuperação (1/Pa)</b>	0,0012 ± 0,0001 <sup>a</sup>	0,0028 ± 0,0004 <sup>b</sup>

Com isso, é verificado que não existe diferença estatisticamente significativa entre a maior compliância para a emulsão com AC em comparação a emulsão base. Além disso, a emulsão com AC apresentou maior recuperação de sua estrutura após cessar a aplicação da tensão que a emulsão base. Isso é uma característica importante, pois mostra que o produto espalha bem sobre a pele no momento da aplicação, no entanto, consegue retornar ao estado inicial quando a tensão for removida.

#### **5.4.2.2 Avaliação da estabilidade**

O aumento da viscosidade e da consistência de formulações tensoativo não iônico ocorre por um período de 24-48 horas, uma vez que a penetração e intumescimento dos materiais graxos anfifílicos pelo tensoativo aquoso para formar a malha gel cristalina (teoria da malha gel) são retardados (PENA et al., 1993; CORRÊA, 2012). Segundo Rieger (1996) sistemas emulsionados recém preparados não devem ser submetidos a testes de estabilidade, pois necessitam de um tempo mínimo para equilibrar-se plenamente, a fim de evitar mudanças na área interfacial, na distribuição do emulsificante e no enrijecimento dos materiais sólidos durante o desenvolvimento da preparação, necessitando de um período inicial de espera para serem submetidas aos testes de estabilidade.

Assim, considerou-se 24 horas após a manipulação das formulações como o tempo inicial para as análises. O teste acelerado de armazenamento em temperaturas extremas (-5°C e 45°C) considera o efeito que a mesma pode acarretar sobre os sistemas semi-sólidos em um período menor em relação àqueles estocados em temperatura ambiente. Qualquer mudança na formulação irá ocorrer duas vezes mais rapidamente para cada aumento de 10°C na temperatura (KNOLWTON et al., 1996).

O estudo de estabilidade teve como objetivo básico a garantia da qualidade e a verificação da manutenção das características do produto em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais e de estresse a que foi submetido. Além de fornecer informações que indicam o grau de estabilidade relativa de um produto nas várias condições que possa estar sujeito, desde sua fabricação até o término de sua validade. Foi realizado conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA, Isaac et al. (2008) e Farmacopeia Brasileira V ed. (2010).

Foram consideradas características físicas (aspecto, cor, odor, uniformidade, valor de pH, densidade e teor); além desses, também foi necessário considerar a manutenção das características do produto quanto à funcionalidade (atributos mantidos sem alterações) e segurança (não podendo ocorrer alterações que comprometam uso) (KALLIOINEN et al., 1994; GU et al., 2005).

Os testes de estabilidade são necessários para assegurar que a formulação irá manter sua integridade e qualidade. Uma formulação estável é aquela que mantém suas proporções de seus constituintes e mantém a superfície interfásica, mesmo após ser exposta a estresses decorrentes de fatores como temperatura, agitação e aceleração da gravidade. Vários testes permitem avaliar a evolução das propriedades da formulação em relação ao tempo, temperatura e gravidade (IDSON, 1993).

#### **5.4.2.2.1 Teste de centrifugação**

Este teste fornece informações prévias e artificiais sobre a estabilidade de diferentes sistemas semi-sólidos uma vez que nem sempre é possível prever com exatidão seu comportamento. Contudo, esse método pode dar uma boa indicação da estabilidade relativa de várias formulações (AULTON, 2005).

Mesmo após os sistemas terem sido submetidos à rotação máxima, não houve nenhuma indicação de instabilidade. É frequente ocorrer cremação ou coalescência segundo a lei de Stokes, que descreve que a velocidade de sedimentação das partículas é diretamente proporcional ao tamanho destas na fase interna da emulsão e mostra que a cremação é uma função da gravidade e que um aumento da gravidade acelera a separação de fases (IDSON, 1993; ANSEL et al., 2007). Além disso, mudanças de homogeneidade podem ser vistas como instabilidade da emulsão, principalmente se as condições de temperatura e centrifugação forem excessivas (AULTON, 2005). Como as amostras não sofreram nenhuma alteração após o teste de centrifugação (Figura 44), foram submetidas aos demais ensaios.

**Figura 44** - Formulações base (esquerda) e com AC (direita) após o teste de centrifugação.



#### 5.4.2.2.2 Avaliação Macroscópica

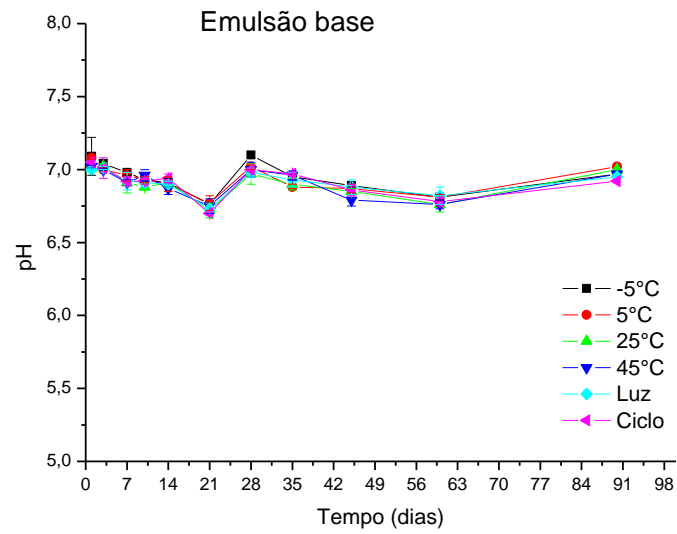
Todas as formulações foram avaliadas macroscopicamente durante todo o período de estudo de estabilidade. Foram consideradas propriedades organolépticas como aspecto, cor, odor, separação de fases e/ou coalescência. As formulações sem AC mantiveram-se inalteradas nas diferentes temperaturas a que foram submetidas durante 90 dias nas temperaturas de -5°C, 5°C, 25°C, 45°C, -5°C/45°C e exposição à luz solar.

Entretanto, as formulações adicionadas de AC sofreram alteração de cor ao longo do tempo somente quando expostas a 45°C e -5°C/45°C.

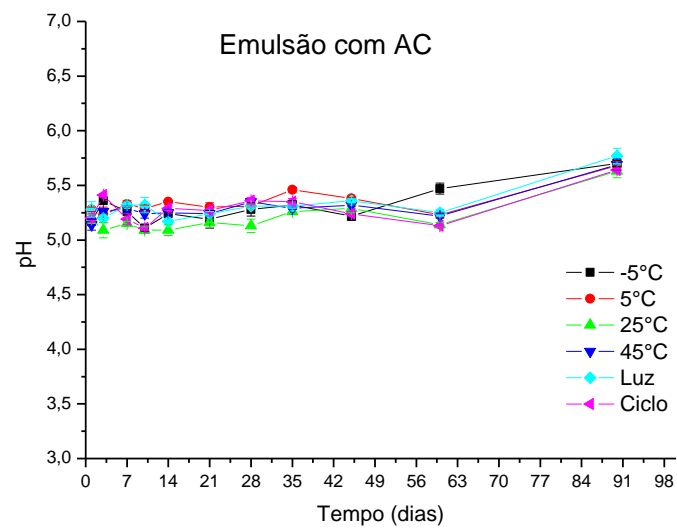
#### 5.4.2.2.3 Determinação do pH

Quanto ao valor de pH das formulações, foi possível observar pequenas variações entre os valores determinados nos dias de análise como demonstrado nas Figuras 45 e 46. Não foi observada variação significativa do pH nas formulações base ( $6,93 \pm 0,09$ ) e nas formulações com AC ( $5,28 \pm 0,15$ ) ao longo do tempo (90 dias) nas condições estudadas (-5°C, 5°C, 25°C, 45°C, -5°C/45°C e exposição à luz solar). Os valores de pH das formulações com AC foram menores em comparação com as formulações base devido ao seu caráter ácido.

**Figura 45** - Valores de pH da emulsão base submetida a condições de estresse durante 90 dias de análise.



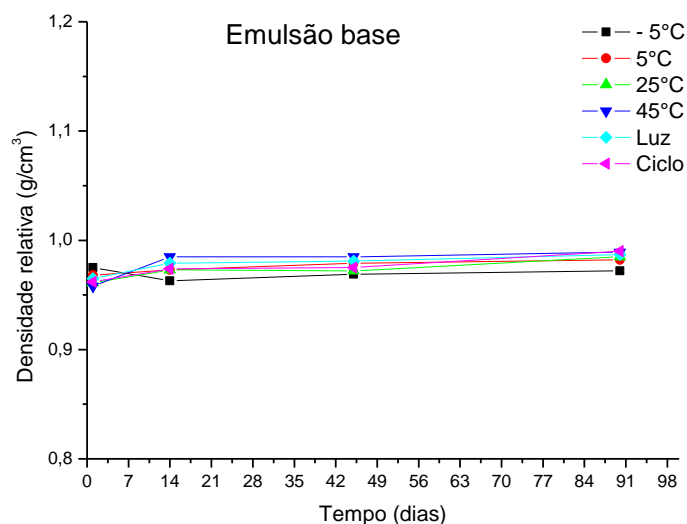
**Figura 46** - Valores de pH da emulsão com AC submetida a condições de estresse durante 90 dias de análise.



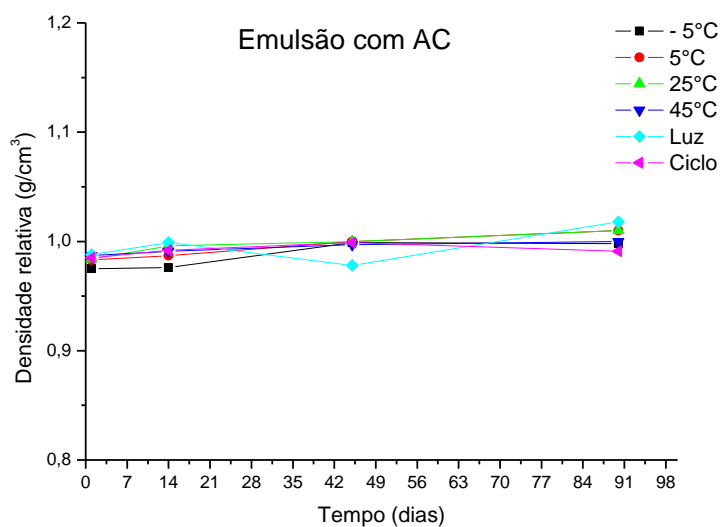
#### 5.4.2.2.4 Determinação da densidade

Os resultados dos valores de densidade (Figuras 47 e 48) demonstraram que não houve variação significativa ( $0,98 \pm 0,02$ ) ao longo do tempo (90 dias) nas condições estudadas ( $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $45^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}/45^{\circ}\text{C}$  e exposição à luz solar).

**Figura 47** - Densidade da emulsão base mantida em diferentes condições durante os 90 dias de avaliação da estabilidade.



**Figura 48** - Densidade da emulsão com AC mantida em diferentes condições durante os 90 dias de avaliação da estabilidade.



#### 5.4.2.2.5 Determinação do teor de AC por espectrofotometria na região do ultravioleta.

A estabilidade química, ou seja, a estabilidade do ativo presente na emulsão também foi avaliada e os resultados estão mostrados na Figura 49 e Tabela 25. Este tipo de avaliação é importante para um conhecimento preciso da estabilidade do ativo presente na formulação, garantindo a eficácia e segurança do produto. Isto é ainda mais importante, no caso de ativos antioxidantes, que podem perder sua eficiência sem nenhum tipo de alteração perceptível no produto (VICENTINI et al., 2008).

Para análise do teor de ativo, foram pesados 0,0125g da emulsão contendo 1% de AC, o que corresponde a 125  $\mu\text{g}$  de AC que foram diluídos em 25 mL de solução de etanol: água (40:60), portanto a concentração teórica de AC nesta solução foi de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As concentrações experimentais obtidas ao longo do tempo nas diversas condições de estresse estão apresentadas na Figura 49 e Tabela 25.

**Figura 49** - Gráfico das concentrações experimentais ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e o desvio padrão de AC na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas.

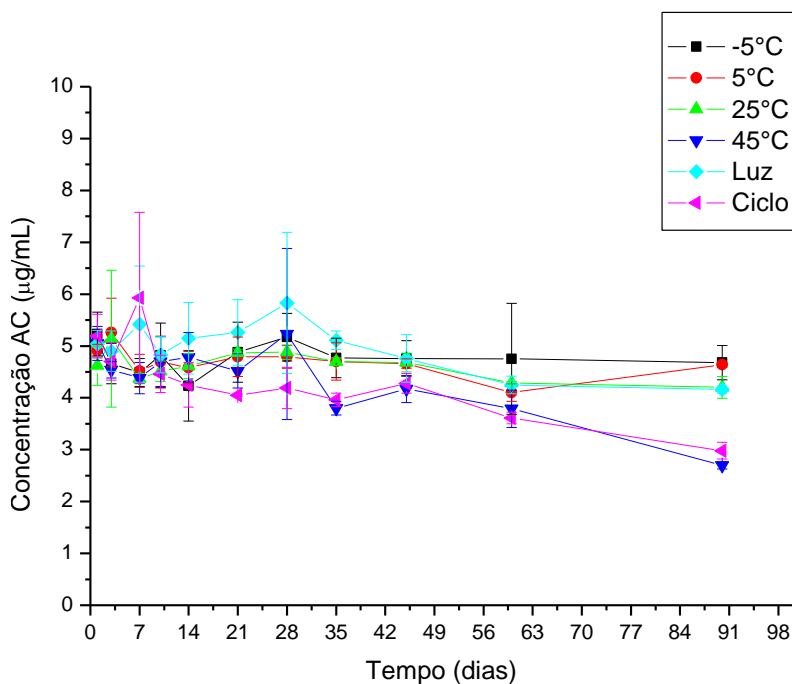


Tabela 25 - Média das concentrações experimentais ( $\mu\text{g/mL}$ ) e o desvio padrão de AC na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas.

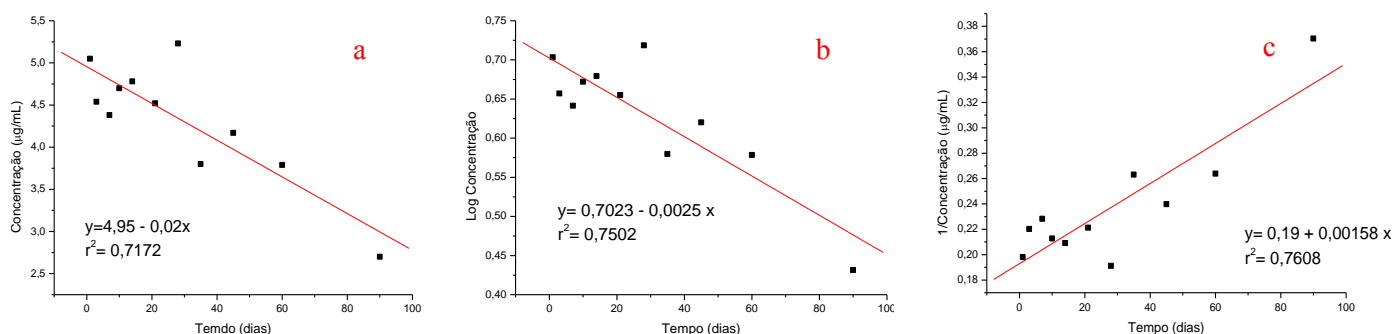
	-5°C	5°C	25°C	45°C	luz	5°C/45°C
Dia 1	5,24 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>	4,91 $\pm$ 0,12 <sup>a</sup>	4,62 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	5,05 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	5,04 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	5,19 $\pm$ 0,42 <sup>a</sup>
Dia 3	4,66 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	5,26 $\pm$ 0,66 <sup>a</sup>	5,14 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	4,54 $\pm$ 0,16 <sup>a</sup>	4,91 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	4,70 $\pm$ 0,36 <sup>a,b</sup>
Dia 7	4,49 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	4,53 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	4,37 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	4,39 $\pm$ 0,13 <sup>a,b</sup>	5,42 $\pm$ 1,12 <sup>a</sup>	5,93 $\pm$ 1,56 <sup>a,b</sup>
Dia 10	4,82 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	4,69 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	4,51 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	4,70 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	4,84 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	4,46 $\pm$ 0,36 <sup>a,b</sup>
Dia 14	4,23 $\pm$ 0,68 <sup>a</sup>	4,58 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	4,62 $\pm$ 0,24 <sup>a</sup>	4,78 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	5,16 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>	4,25 $\pm$ 0,43 <sup>a,b</sup>
Dia 21	4,88 $\pm$ 0,58 <sup>a</sup>	4,79 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	4,88 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	4,53 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	5,27 $\pm$ 0,63 <sup>a</sup>	4,06 $\pm$ 0,02 <sup>a,b</sup>
Dia 28	5,17 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	4,79 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	4,88 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	5,24 $\pm$ 1,66 <sup>a</sup>	5,83 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	4,19 $\pm$ 0,41 <sup>a,b</sup>
Dia 35	4,78 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	4,71 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>	4,71 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	3,80 $\pm$ 0,13 <sup>a</sup>	5,11 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	3,97 $\pm$ 0,14 <sup>a,b</sup>
Dia 45	4,76 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	4,67 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	4,69 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	4,18 $\pm$ 0,26 <sup>a,b</sup>	4,77 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>	4,28 $\pm$ 0,20 <sup>a,b</sup>
Dia 60	4,76 $\pm$ 1,07 <sup>a</sup>	4,10 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	4,30 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	3,80 $\pm$ 0,36 <sup>a,b</sup>	4,25 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	3,62 $\pm$ 0,11 <sup>a,b</sup>
Dia 90	4,68 $\pm$ 0,34 <sup>a</sup>	4,65 $\pm$ 0,05 <sup>a</sup>	4,21 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	2,70 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	4,17 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	2,98 $\pm$ 0,17 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Avaliando a análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), realizada entre os dias de análise (Tabela 25), para cada condição de estresse a que as amostras foram submetidas, pode ser percebido que a redução no teor de ativo foi significativa a partir do 90º dia de estudo da estabilidade da emulsão nas condições de 45°C e -5°C/45°C. Nas demais condições de estresse estudadas (-5°C, 5°C, 25°C e luz) não houve variação significativa na concentração de AC.

Com os valores obtidos de teor de AC para as diferentes condições, foram traçados gráficos apresentados na Figura 50 de concentração *versus* tempo (ordem zero), log da concentração *versus* tempo (ordem 1) e inverso de concentração *versus* tempo (ordem 2) (PRISTA, 2008).

**Figura 50** - Perfil cinético de degradação de emulsão de ácido cafeico através dos gráficos de ordem zero (a), ordem 1 (b) e ordem 2 (c).



A escolha do modelo mais adequado foi realizada através do coeficiente de determinação ( $r^2$ ), para a situação em que a correlação linear entre tempo e concentração “linearizada” foi melhor. Os valores de  $r^2$  foram 0,7172; 0,7502 e 0,7608 para os modelos de ordem zero, 1 e 2, respectivamente. Assim, a cinética de reação que melhor define a degradação do AC é a de segunda ordem.

A velocidade específica de reação ( $k$ ) para reações de segunda ordem é calculada através da equação 12 e obteve-se o valor de  $k = 0,00191$  para a condição de armazenagem a 45°C:

$$\frac{1}{C} = \frac{1}{C_0} + k \cdot t \quad \text{Equação 12}$$

Em que C: concentração final (2,70 µg/mL);  $C_0$ : Concentração Inicial (5,05 µg/mL); t: tempo de armazenagem.

Em seguida calculou-se a energia de ativação ( $\Delta H_a$ ) da reação através da Equação 13 obtendo-se o valor  $\Delta H_a = 20265,74 \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{grau}^{-1}$ .

$$\Delta H_a = 2,303 \cdot R \cdot \frac{T_1 \cdot T_2}{T_1 - T_2} \cdot \log \frac{k_1}{k_2} \quad \text{Equação 13}$$

Em que R: constante dos gases perfeitos = 1,987; T: temperatura em Kelvin; k: velocidade específica de reação.

A velocidade da reação depende do fator de frequência (A), que é a frequência de choque entre as moléculas de reagente (PRISTA, 2008).

O cálculo do  $\log A$  foi realizado através da Equação 14 e foi encontrado que  $\log A = 11,21$ :

$$\log k_{45^{\circ}\text{C}} = \log A - \frac{\Delta H_a}{2,303.R} \cdot \frac{1}{T}$$

Equação 14

Em que R: constante dos gases perfeitos= 1,987; T: temperatura em Kelvin; k: velocidade específica de reação;  $\Delta H_a$ : energia de ativação.

Em seguida calculou-se o valor de  $k_{25^{\circ}\text{C}}=0,000128 \text{ dia}^{-1}$  através da Equação 15.

$$\log k_{25^{\circ}\text{C}} = \log A - \frac{\Delta H_a}{2,303.R} \cdot \frac{1}{T}$$

Equação 15

Obtida a velocidade específica de decomposição para a temperatura de armazenagem, foi possível calcular o prazo de validade, período no qual o decréscimo do teor de ativo não ultrapassa 10%, com auxílio da Equação 16 (PRISTA, 2008).

$$tm = \frac{2,303}{k_{20^{\circ}\text{C}}} \cdot \log \frac{y_0}{y}$$

Equação 16

Em que tm: prazo de validade; k: velocidade específica de reação;  $y_0=100\%$  e  $y=90\%$ .

Foi encontrado algebricamente o prazo de validade de 823 dias, o que corresponde a aproximadamente 2 anos e 3 meses.

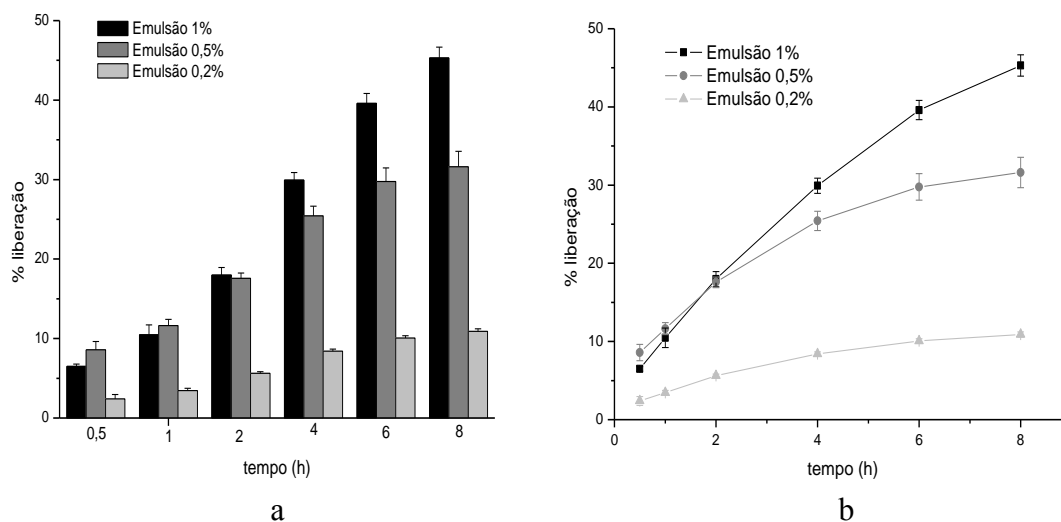
## 5.5 Avaliação do perfil de liberação do AC a partir das formulações e a permeação e retenção cutâneas do AC

Os ensaios de liberação foram realizados com a emulsão e o filme contendo o AC nas concentrações de 1, 0,5 e 0,2%, respectivamente, com o intuito de avaliar se a concentração e/ou a formulação influencia no perfil de liberação do ativo. Os ensaios de permeação e retenção cutâneas foram realizados com a emulsão e o filme contendo o AC na concentração de 1%.

### 5.5.1 Avaliação da liberação do AC contido nas formulações

Para avaliar a liberação de AC contido na emulsão e no filme, a fase receptora foi coletada das células de Franz e, posteriormente, submetida à análise de quantificação do ativo por CLAE. A partir dos resultados obtidos, a concentração de AC na solução receptora foi calculada. Os gráficos *a* e *b* da Figura 51 foram construídos a partir dos valores obtidos nos ensaios com as emulsões.

**Figura 51** - Porcentagem de liberação do ácido cafeico das emulsões contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. a: gráfico de barras, b: linha de tendência.



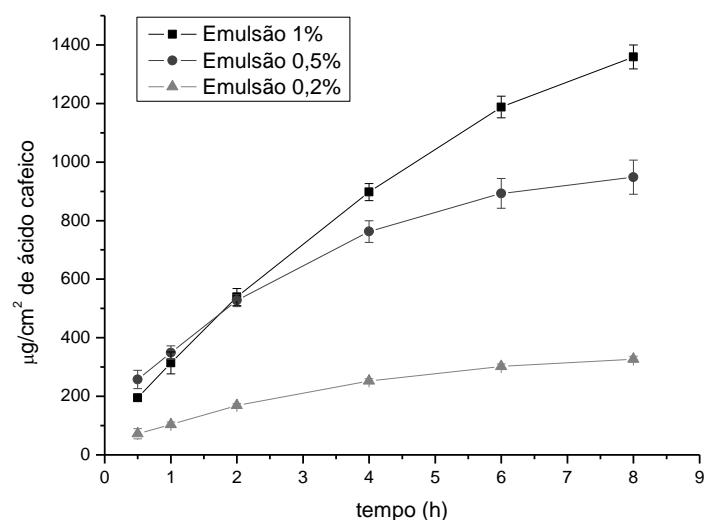
Os resultados sugerem que houve um aumento progressivo da porcentagem de liberação do AC no decorrer do tempo.

A comparação das porcentagens de liberação do AC após 30 minutos de experimento revela que a porcentagem liberada na emulsão contendo 0,5% de ativo foi maior do que nas demais contendo 0,2 e 1% de AC. Contudo em 2 horas de ensaio, foi possível observar que a porcentagem de liberação da emulsão contendo 1% de AC foi igual estatisticamente à liberada pela emulsão contendo 0,5%, e diferente em relação ao contendo 0,2%.

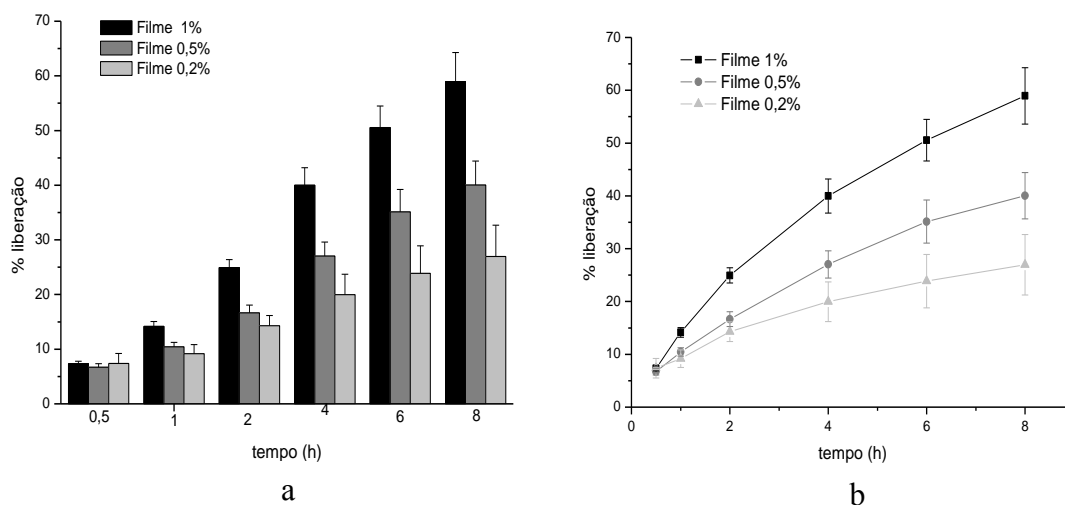
A partir deste momento, a emulsão contendo 1% de ativo apresentou uma maior liberação de AC do que as demais formulações até o término do experimento. As emulsões contendo 0,5% e 0,2% de AC demonstraram uma pequena variação a partir de 4 horas de avaliação.

A partir destes resultados, também foi possível verificar a quantidade de ativo liberado da formulação por unidade de área de difusão (Figura 52). A área de difusão da célula de Franz do equipamento utilizado é de  $1,77 \text{ cm}^2$ .

**Figura 52** - Quantidade em  $\mu\text{g}$  de ácido cafeico liberado da emulsão contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.



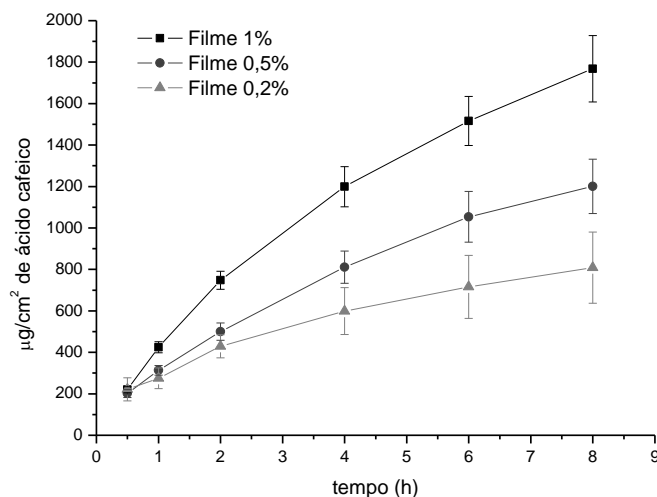
**Figura 53** - Porcentagem de liberação do ácido cafeico dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. a: gráfico de barras, b: linha de tendência.



No que diz respeito aos filmes, os dados obtidos da Figura 53 revelam que também ocorreu um aumento progressivo da porcentagem de liberação do AC com o passar do tempo de ensaio. Após 30 minutos de ensaio, as porcentagens de liberação dos três filmes são, estatisticamente, iguais. Após 1 hora de experimento, foi possível observar um perfil de liberação diferente, onde o filme contendo 1% de ativo demonstra uma maior porcentagem de liberação em relação aos filmes contendo 0,5 e 0,2% de AC. Este resultado segue o mesmo perfil nas demais horas de avaliação.

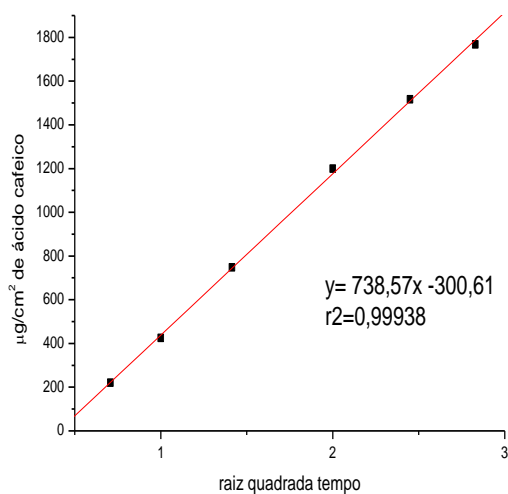
A partir destes resultados, também foi possível verificar a quantidade de ativo liberado da formulação por unidade de área de difusão (Figura 54). A área de difusão da célula de Franz do equipamento utilizado é de  $1,77 \text{ cm}^2$ .

**Figura 54** - Quantidade em  $\mu\text{g}$  de ácido cafeico liberado dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% do ativo por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.

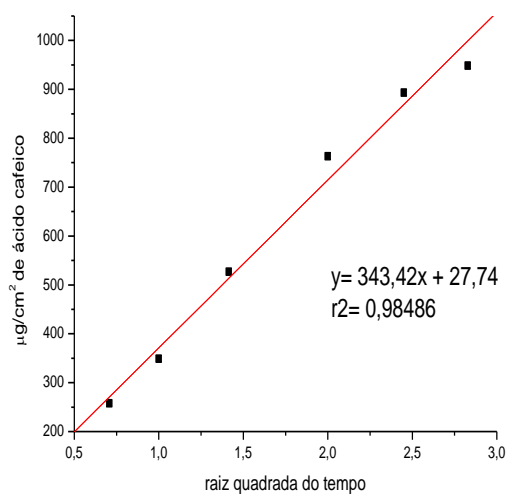


Além disso, foi avaliado o perfil cinético de liberação do ativo das formulações. Para isto, foram aplicados três modelos matemáticos para interpretação da cinética de liberação: zero ordem; primeira ordem e modelo de Higuchi. Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados da liberação de acordo com o tempo e porcentagem de AC liberado. O modelo de zero ordem representa a relação entre a quantidade de ativo liberado *versus* o tempo; o modelo de Higuchi representa a quantidade de ativo liberado *versus* a raiz quadrada do tempo, e o modelo de primeira ordem, o log da concentração de ativo liberado *versus* o tempo. Para a escolha do modelo mais adequado foi utilizado o coeficiente de correlação ( $r^2$ ), que se aproxima da perfeita linearidade. Os resultados da linearização dos perfis de liberação estão apresentados nas Figuras 55 a 60 e nas Tabelas 26 e 27.

**Figura 55** - Modelo Higuchi para a emulsão 1% AC .



**Figura 56** - Modelo Higuchi para a emulsão 0,5% AC.



**Figura 57** - Modelo Higuchi para a emulsão 0,2% AC.

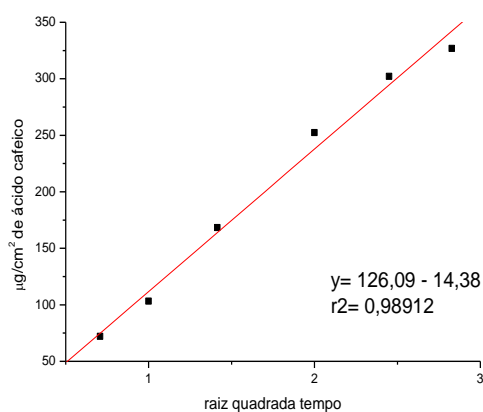
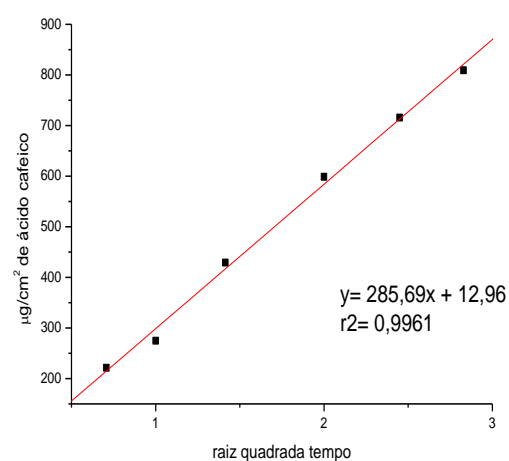
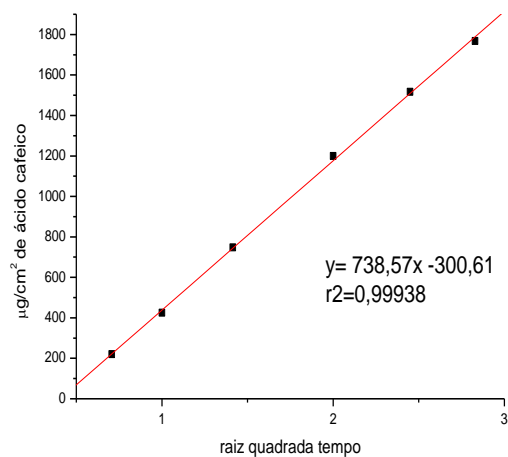


Tabela 26 - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação das emulsões contendo 0,2, 0,5 e 1% de ácido cafeico.

	0,2%	0,5%	1%
Zero ordem	0,93931	0,92924	0,97817
Primeira ordem	0,84367	0,92924	0,87170
Modelo de Higuchi	<b>0,98912</b>	<b>0,98486</b>	<b>0,99938</b>

De acordo com as Tabelas 26 e 27, as formulações contendo o AC em diferentes concentrações seguem o modelo de liberação de Higuchi, que descreve a liberação de ativos por um processo de difusão (MONTEIRO et al., 2007).

**Figura 58** - Modelo Higuchi para o filme 1% AC. **Figura 59** - Modelo Higuchi para o filme 0,5% AC.



**Figura 60** - Modelo Higuchi para o filme 0,2% AC.

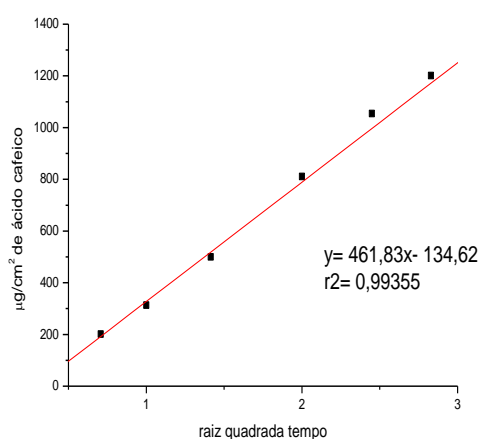


Tabela 27 - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos filmes contendo 0,2, 0,5 e 1% de AC

	0,2%	0,5%	1%
Zero ordem	0,97713	0,96215	0,96891
Primeira ordem	0,87175	0,88411	0,82772
Modelo de Higuchi	<b>0,99355</b>	<b>0,99612</b>	<b>0,99938</b>

Com base nos dados obtidos pelo ensaio, pode-se afirmar que as formulações usadas são capazes de liberar o AC nelas contidos, permitindo que haja o contato do mesmo com a pele e, assim, ocorra a disponibilidade para a penetração na superfície cutânea. A capacidade de penetração e permeação do ativo irá depender da capacidade em atravessar a camada córnea da pele e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula (MENDONÇA et al., 2009).

### 5.5.2 Avaliação da permeação cutânea do AC contido nas formulações

Para escolha da concentração mais adequada de AC para realização dos estudos de permeação e retenção cutâneas, avaliou-se a concentração da solução receptora no tempo máximo de liberação (8 h) e comparou-se com os dados de atividade antioxidante e citotoxicidade obtidos em experimentos prévios.

No estudo de liberação, 300 mg da emulsão ou filme foram aplicados na célula de Franz. Assim, nas formulações contendo 1% de AC, a quantidade total de ativo aplicado foi 3 mg ou 3000 µg.

No experimento com a emulsão a 1%, a concentração de AC liberado na solução receptora no tempo de 8h foi de 45,30%, então, calcula-se que a concentração liberada em 7 mL de solução receptora foi 1359 µg, o que corresponde a 194 µg/mL. Já na liberação do filme a 1%, após 8 h de experimento foi obtido 58,94% de liberação e concentração de 252,6 µg/mL.

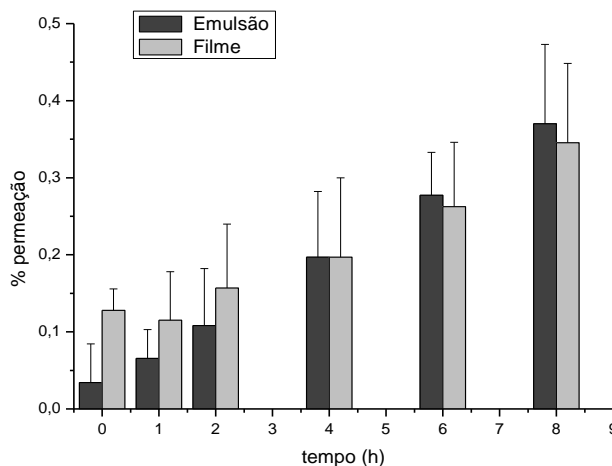
De acordo com os estudos de citotoxicidade realizados em células HepG2, a concentração de 781,8 µg/mL foi a que causou 50% de morte celular. Já nos estudos realizados com células HaCat, mesmo a concentração máxima de AC utilizada (1140 µg/mL) não foi capaz de matar 50% das células.

A avaliação da atividade antioxidante também foi considerada e mostrou que a concentração de 1,96 µg/mL foi capaz de inibir 50% de radical ABTS e 2,39 µg/mL foi capaz de inibir 50% de radical DPPH.

Esses resultados comprovam que a concentração de 1% de AC nos sistemas é adequada para a realização dos estudos subsequentes já que apresentou valor de liberação em 8 h bem abaixo da concentração tóxica às células e com elevada atividade antioxidante.

Da mesma forma como foi realizado no ensaio de liberação de AC, a fase receptora foi coletada das células de Franz e, posteriormente, submetida à análise de quantificação do ativo por CLAE. Com os dados obtidos na análise de permeação das formulações contendo 1% de AC, construiu-se o gráfico da Figura 61.

**Figura 61** - Porcentagem de permeação do ácido cafeico das formulações nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.



Observou-se que ocorreu um aumento da porcentagem da permeação do AC em ambas as formulações ao longo do tempo, o que é desejado para um produto que possui propriedade antioxidante. Entretanto, a porcentagem de liberação foi abaixo de 0,4% o que é bom para um produto cosmético, em que não é desejado sistêmica.

O perfil de permeação entre as formulações foi distinto durante a avaliação. Após 2 horas de ensaio, a porcentagem de permeação do filme foi maior do que a emulsão, principalmente nos primeiros 30 minutos. Todavia, depois de 4 horas de experimento, a porcentagem de permeação da emulsão foi semelhante ao filme. No final da avaliação, foi possível notar que a porcentagem de permeação da emulsão foi maior em relação ao filme, porém essa variação foi pequena. Essa característica está relacionada com os estudos de liberação, já que o filme permeou mais, porque liberou mais AC do que a emulsão.

### 5.5.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AC contido nas formulações.

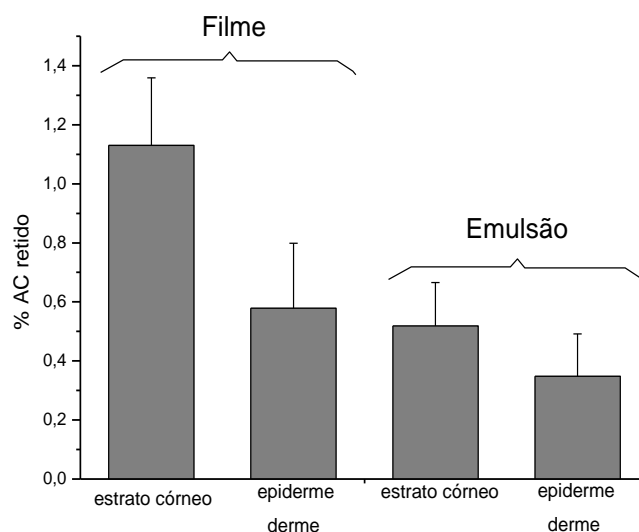
Neste ensaio, a quantidade de AC retido no estrato córneo, epiderme e derme foi passível de detecção e quantificação pelo método analítico validado utilizando CLAE e o gráfico da Figura 62 foi construído através dos resultados obtidos. Observou-se que em ambas as formulações a porcentagem de retenção no estrato córneo foi maior em relação à epiderme/derme.

Neste estudo, 300 mg da emulsão/filme foram aplicados na célula de Franz. Assim, nas formulações contendo 1% de AC, a quantidade total de ativo aplicado foi 3 mg ou 3000 µg.

A porcentagem de AC retido na epiderme e derme a partir da formulação em filme foi de 0,58%. Então, considerando 3000 µg como 100%, a quantidade retida em 0,58% foi de 17,4 µg que foram diluídos em 4 mL de metanol, obtendo-se a concentração de AC na solução igual a 4,35 µg/mL. Já a porcentagem de AC retido na epiderme e derme a partir da emulsão foi de 0,35% e realizando o mesmo raciocínio, obtém-se a concentração 2,63 µg/mL.

Substituindo esses valores de concentração nas equações da reta apresentadas nas Figuras 8 e 11, da avaliação da porcentagem de inibição dos radicais DPPH e ABTS, respectivamente, foi obtido que a concentração de AC retida a partir do filme provoca mais de 90% de inibição dos radicais. No entanto, como a concentração de AC retida a partir da emulsão foi menor, atingiu 55% de inibição do radical DPPH e 67% de inibição do radical ABTS, justificando a utilização da concentração de 1% de AC nas formulações, em detrimento da utilização das concentrações de 0,5 e 0,2%.

**Figura 62** - Porcentagem de ácido cafeico retido no estrato córneo e na epiderme/derme nas formulações.



Este resultado é satisfatório, pois, de forma geral, pode-se dizer que não houve permeação do ativo, o que caracteriza um cosmético. Além disso, o ativo foi capaz de permanecer retido na epiderme/derme, local onde deve ter ação.

Também, foi observada uma elevada liberação do ativo da formulação, o que colabora para a eficiência do produto, já que o ativo ficará em contato com a pele.

Com base nos resultados expostos até aqui, a concentração de AC ideal para atender as características desejadas para o cosmético foi definida. Esta determinação foi feita com base principalmente nos resultados de atividade antioxidante, buscando a eficácia da formulação e nos resultados de citotoxicidade, e, finalmente, nos perfis de permeação e retenção cutâneas, considerando ao mesmo tempo a eficácia e segurança do produto.

## 5.6 Avaliação “*in vitro*” do fator de proteção solar das emulsões

As metodologias de avaliação do FPS segundo espectrofotometria clássica proposta por Mansur e por espectrofotometria por reflectância através do equipamento Optometrics permitiram determinar os valores de FPS que estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Valores médios e desvio padrão das medidas de FPS das formulações (AC= ácido cafeico; FQ= filtro químico), obtidos por duas diferentes metodologias, espectrofotometria clássica e de reflectância.

Formulações	Mansur		Optometrics	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
<b>Emulsão base</b>	0,44 <sup>a</sup>	0,22	1,34 <sup>a</sup>	0,05
<b>Emulsão com FQ</b>	11,36 <sup>b</sup>	0,71	11,63 <sup>b</sup>	0,86
<b>Emulsão com AC</b>	2,00 <sup>c</sup>	0,25	2,59 <sup>c</sup>	0,23
<b>Emulsão com AC+FQ</b>	12,38 <sup>d</sup>	0,09	14,81 <sup>d</sup>	1,18

a,b,c,d: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Através da análise estatística ANOVA foi possível avaliar que houve diferença significativa entre o FPS das formulações, o que indica que a emulsão contendo AC apresentou valores baixos, porém significativos de FPS em relação à emulsão base e além disso, o AC apresentou efeito sinérgico em associação com o filtro químico quando se compara o FPS demonstrado pelas formulações. Assim, conclui-se que, através das metodologias estudadas, o AC possibilitou um aumento do FPS das formulações propostas e sugere-se que pode ser usado como um aditivo para incremento do FPS.

## 6 CONCLUSÃO

O AC apresentou elevada atividade antioxidante, podendo atuar na prevenção de danos causados por radicais livres à pele como, por exemplo, os radicais livres gerados pela radiação ultravioleta emitida pelo sol. Pode ser usado como um aditivo para incremento do FPS de formulações e sua atividade despigmentante poderia até ser considerada quando for aplicado em elevadas concentrações.

Pelos estudos de citotoxicidade *in vitro* realizados verificou-se que o AC é seguro nas concentrações utilizadas.

Também foi observada maior liberação do ativo da formulação em filme quando comparada com a emulsão, sendo que houve um aumento progressivo da porcentagem de liberação do AC no decorrer do tempo em ambas as formulações. As formulações contendo o AC em diferentes concentrações seguem o modelo de liberação de Higuchi, que descreve a liberação de ativos por um processo de difusão. Com base nos dados obtidos pelo ensaio, pode-se concluir que as formulações usadas são capazes de liberar o AC nelas contidos, permitindo que haja o contato do mesmo com a pele e, assim, ocorra a disponibilidade para a penetração na superfície cutânea.

Os resultados da liberação comprovaram que a concentração de 1% de AC nos sistemas é adequada, já que apresentou valor de liberação em 8 h bem abaixo da concentração tóxica às células e com elevada atividade antioxidante.

A porcentagem de permeação foi abaixo de 0,4% o que é bom para um produto cosmético, em que não é desejada atividade sistêmica. Observou-se que ocorreu um aumento da porcentagem da permeação do AC em ambas as formulações ao longo do tempo e que o AC proveniente da formulação em filme permeou mais do que o da emulsão, o que condiz com os estudos de liberação já que o filme também liberou mais AC do que a emulsão.

Em ambas as formulações, a porcentagem de retenção no estrato córneo foi maior em relação à epiderme/derme e a porcentagem de AC retido na pele a partir da formulação em filme foi maior que da emulsão.

Os métodos analíticos desenvolvidos foram validados assegurando todos os parâmetros de linearidade, especificidade, precisão, exatidão e robustez estabelecidos.

A emulsão foi submetida a diversas condições de estresse e manteve-se estável ao longo dos 90 dias do estudo de estabilidade acelerada.

Esta pesquisa também buscou empregar metodologias alternativas à experimentação animal no estudo da eficácia e segurança de um cosmético, concluindo que elas podem substituir, ou ao menos reduzir a utilização de modelos animais. No entanto, para que o produto desenvolvido possa ser comercializado, algumas fases ainda devem ser cumpridas como, por exemplo, a avaliação clínica e sensorial.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIHPEC. II Caderno de Tendências, Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. Disponível em: <[http://www.abihpec.org.br/novo-wp/wp-content/uploads/2014/08/caderno\\_tendencias1.pdf](http://www.abihpec.org.br/novo-wp/wp-content/uploads/2014/08/caderno_tendencias1.pdf)> Acesso em: out., 2014.

ALLEVATO M. A. Sistemas terapêuticos transdérmicos. **Act. Terap. Dermatol.**, v.30, n.3, p.154-165, 2007.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORREA, M.A.; MAN CHIN, C.; ISAAC, V.L.B. Validation of an alternative analytical method for the quantification of antioxidant activity in plant extracts. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 32, p. 90-95, 2013.

Alternatives to animal testing. Testing – a regulatory requirement. 2003. Disponível em: <<http://www.colipa.com/alternatives.html#n>> Acesso em: out., 2014.

ALVES, E.; BRUSKI, S.; PIAZZA, F. C. P. Equipamentos para análise de pele facial: medições objetivas e subjetivas. **Caçador**, v.2, n.2, p. 62-78, 2013.

AMARAL, R.H. **Estudo da incorporação e liberação de um extrato de algas vermelhas em membranas de hidrogel**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr, L. V. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 443-449.

AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAKER, F.W.; BRUNER, L.H. In-house strategies for the safety evaluation of cosmetic products: the contribution of alternative methods in animal alternatives, welfare and ethics. **Elsevier**, p.567-573, 1997.

BARRY, B.W.; WARBURTON, B. Some rheological aspects of cosmetics. **J. Soc. Cosmetic Chem.**, v.19, p.725-744, 1968.

BASIC, I.; ORSOLIC, N.; TADIC, Z.; MACEDO FERREIRE ALCICI, N.; BRBOT-SARANOVIC, A.; BENDELJA, K.; KRSNIK, B.; RABATIC, S. Antimetastatic effects of

propolis, caffeic acid phenethyl ester and caffeic acid on mammary carcinoma of CBA mouse. 17th International Cancer Congress. Rio de Janeiro. Brazil 24-28 August 1998.

BATISTUZZO, A.O.B.; ETO, Y.; ITAYA, M. **Formulário Médico Farmacêutico**. 2.ed. São Paulo: Tecnopress, 2002.

BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova**, v.29, n.6, p.1340-1344, 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio/ago. 1999.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992. 151p.

BRAND-WILLAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Guia para avaliação da segurança de produtos cosméticos, 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.htm>>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia\\_series.htm](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm).

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 332/05, de 1 de dezembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 211, de 14 de julho de 2005. Estabelece a Definição e a Classificação de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, conforme Anexo I e II desta Resolução e dá outras definições. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 18 jul. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n.17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 21 ago 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC Nº 29 de 1º de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre “Lista de Substâncias de Ação Conservante permitidas para Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes” e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1º jun. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2012 Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia\\_cosmeticos\\_final\\_2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/guia_cosmeticos_final_2.pdf)

BRASIL. Projeto de lei nº 777, de 24 de janeiro de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, ano 124, n. 16, 24 janeiro 2014. Seção II, p.IV.

BRENNAN, M.; BHATTI, H.; NERUSU, K. C.; BHAGAVATHULA, N.; KANG, S.; FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.78, p.43–48, 2003.

BRENNER, M.; HEARING, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.84, p.539-549, 2008.

BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, p. 445-448, 2002.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d’água. **Quím. Nova**, v.30, n.2, p.312-317, 2007.

BURNS, J.; GARDNER, P. T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G. G.; LEAN, M. E.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.5797-5808, 2001.

BÜYÜKOKUROGLU, M. E.; GÜLÇİN, I.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖGLU, Ö. I. In vitro antioxidant properties of dantrolene sodium. **Pharmacol. Res.**, v.44, n.6, p.491–495, 2001.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v.58, p.79-110, 1989.

CADWALLAGER, D. E. Stability testing. **Cosmet. Toiletries**, Oak Park, v.104, n.11, p.87-102, 1989.

CAMPOS, F. S. Desenvolvimento de hidrogéis de dextrano contendo praziquantel. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Programa de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, 2009.

CANEVAROLO Jr., S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004.

CESCHEL, G.C.; MAFFEI, P.; SFORZINI, A.; LOMBARDI, B.S.; YASIN, A.; RONCHI, C. In vitro permeation through porcine buccal mucosa of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) from a topical mucoadhesive gel containing propolis. **Fitoterapia**, v.73, p.S44–S52, 2002.

CHEN, J. H.; HO, C. T. Antioxidant activities of acid caffeic and its related hydroxycinnamic acid compounds. **J. Agric. Food Chemistry**, v.45, n.7, p.2374-2378, 1997.

CHIAO, C.; CAROTHERS, A. M.; GRUNBERGER, D.; SOLOMON, G.; PRESTON, G. A.; BARRETT, J. C. Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. **Cancer Res.**, v.55, p. 3576–3583, 1995.

CHIARI, B. G.; SEVERI, J. A.; PAULI-CREDENDIO, P. A.; SYLOS, C. M.; VILEGAS, W.; CORREA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **JPPS**, v. 4, p. 331-336, 2012.

CHIARI, B. G.; MARTINI, P. C.; MORAES, J. D. D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M. A.; CICARELLI, R. M. B.; ISAAC, V. L. B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **Int. J. Res. Cosm. Sci.**, v.2, n.2, 8-14, 2012a.

CHIARI, B. G.; MAGNANI, C.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A.; ISAAC, V. L. B. Estudo da segurança de cosmético: presente e futuro. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.33, n.3, p.323-330, 2012b.

CHIEN, Y. W. **Novel Drug Delivery Systems**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, p. 300-375, 2001.

CLÉMENT, P.; LAUGEL, C.; MARTY, J.-P. Influence of three synthetic membranes on the release of caffeine from concentrated W/O emulsions. **J. Control Release**, v. 66, n. 2-3, p. 243-254, 2000.

CLIFFORD, M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, p. 1033-1043, 2000.

COLO, S. M.; HERH, P. K. W.; ROYE, N.; LARSSON, M. Rheology and the texture of pharmaceutical and cosmetic semisolids. **American Laboratory**, n. November, p.26-30, 2004.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, NASCIMENTO, J. R. N.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v.15, n.3, p. 231-237, 2013.

CORRÊA, M. A. **Incorporação de naproxeno em sistema microemulsionado: liberação in vitro e avaliação biológica**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1997. 146p.

CORRÊA, M. A.; DAVOLOS, J. F.; DAVOLOS, M. R. Protetores Solares. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

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

COUTEAU, C.; CULLEL, N.P.; CONNAN, A. E.; COIFFARD, L. J. Stripping method to quantify absorption of two sunscreen in human. **Int. J. Pharm.**, v.222, n.1, p.153-157, 2001.

CURY, B.S.; CASTRO, A.D.; KLEIN, S.I.; EVANGELISTA, R.C. Modeling a system of phosphated cross-linked high amylose for controlled drug release. Part 2: physical parameters, cross-linking degrees and drug delivery relationships. **Int. J. Pharm.**, v.371, p.8-15, 2009.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v.73, p.645-652, 1996.

- DEG. Rapithix A-60. Informe técnico cosmeceútico, 2012.
- DING, W.; HUDSON, L. G.; SUN, X.; FENG, C. LIU, K.J. As (III) inhibits ultraviolet radiation-induced cyclobutane pyrimidine dimer repair via generation of nitric oxide in human keratinocytes. **Free Radic. Biol. Med.**, v.45, p.1065-1072, 2008.
- DOSSIÊ DE ANTIOXIDANTES. Os Antioxidantes. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/83.pdf>>. Acesso em 10 abril 2014.
- DRILL, V. A.; LAZAR, P. **Cutaneous Toxicity**. New York: Academic Press, 1997.
- DUH, P. D.; TU, Y. Y.; YEN, G. C. Antioxidant activity of water extract of harng jyr (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). **Lebens. Wiss. Technol.**, v.32, p.269–277, 1999.
- ERMER, J. Validation in Pharmaceutical Analysis. Part I: an integrated approach. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 24, p.755-767, 2001.
- FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.
- FARTASCH, M. Epidermal barrier in disorders of the skin. **Microsc. Res. Tech.**, v.38, n. 4, p.361-372, 1997.
- FELTON, L.A. Characterization of coating systems. **AAPS PharmSciTech**, v.8, n.4, p.258-266, 2007.
- FILIPPE, A.; GOMES, N. Alternativo à experimentação animal. Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa. 2006. Disponível em: <<http://www.fmv.utl.Pt/democ/sft/sem9798/g005/g005.htm>>. Acesso em 10 outubro 2014.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidative stress and aging: catalase is a longevity determinant enzyme. **Nature**, v.408, p.239, 2000.
- FISHER, G.J.; WANG, Z.Q.; DATTA, S.C.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. **N. Engl. J. Med.**, v.337, p. 1419–1428, 1997.
- FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato de própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. [Tese de doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo]. Ribeirão Preto, 2007.

FUKUMOTO, L. R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.3597–3604, 2000.

GENNARO, A. R. **Remington the science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

GONTARD, N.; DUCHEZ, C.; CUQ, J. L.; GUILBERT, S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v.29, n.1, p.39-50, 1994.

GOLDBERG, A.M. Alternatives in toxicology: in vitro Toxicology is developing rapidly because of advances in cell, tissue and organ culture techniques. **Cosmet. Toilet.**, v.104, n.11, p.53-59, 1989.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biol. Med.**, v.13, p.435-448, 1992.

GREENWALD, P. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. **J. Nutr.**, v.134 (12 Suppl), p.3507S-3512S, 2004.

GU, Y. A. S.; REGNIER, L.; McCLEMENTS, J. Influence of environmental stresses on stability of oil-in-water emulsions containing droplets stabilized by  $\beta$ -lactoglobulin- $\ell$ -carregeenan. **J. Coll. Interf. Sci.**, v.286, p.551-558, 2005.

GÜLÇİN, I.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E.; OKTAY, M.; KÜFREVIÖĞLU, Ö. I. On the in vitro antioxidant properties of melatonin. **J. Pineal Res.**, v.33, p.167–171, 2002.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v.217, n.2-3, p.213–220, 2006.

GUY, P.A.; RENOUF, M.; BARRON, D.; CAVIN, C.; DIONISI, F.; KOCHHAR, S.; REZZI, S.; WILLIAMSON, G.; STEILING, H. Quantitative analysis of plasma caffeic and ferulic acid equivalents by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr.**, v. 877, p.3965–3974, 2009.

HADSHIEW, M. I.; ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A. Skin aging and photoaging: the role of DNA damage and repair. **Am. J. Contact Dermat.**, v.11, n.1, p.19-25, 2000.

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

HANSON, K. M.; LI, B.; SIMON, J. D. A spectroscopic study of the epidermal ultraviolet chromophore trans-urocanic acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v.119, p.2715-2721, 1997.

HANSON, K. M.; SIMON, J. D. Epidermal trans-urocanic acid and the UVA-induced photoaging of the skin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.10576-10578, 1998.

HUANG, M. T.; FERRARO, T. Phenolic-compounds in food and cancer prevention. **ACS Symposium Series**, v.507, p.8–34, 1992.

HYNES, M. J.; O'COINCEANAINN, W. The kinetics and mechanisms of reactions of iron(III) with caffeic acid, chlorogenic acid, sinapic acid, ferulic acid and naringin. **J. Inorg. Biochem.**, v.98, p.1457–1464, 2004.

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

IDSON, B. Stability testing of emulsions. **Drug Cosmet. Ind.**, New York, v.152, n.2, p.38-43, 72, 1993.

ISAAC, V. L. B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G.; SALGADO, H. R. N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p.530-534, 2001.

JUNGINGER, H. I. **Multiphase emulsions**. In: RIEGER, M. M.; RHEIN, L. D. (Ed.). *Surfactants in cosmetics*. New York: Marcel Dekker, 1997. cap.7, p.155-182.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KALLIOINEN, S.; HELENIUS, K.; YLIRUUSI, J. Influence of storage time and temperature on the stability of some emulsion creams. **Pharmazie**, v. 49, p. 500-505, 1994.

- KETSAWATSAKUL, U. Modulation by bicarbonate of the protective effects of phenolic antioxidants on peroxyxynitrite-mediated cell cytotoxicity. **Science Asia**, v.33, p.273-282, 2007.
- KHAN, T.; PARK, J. K.; KWON, J. H. Functional biopolymers produced by biochemical technology considering applications in food engineering. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 24, n. 5, p. 816-826, 2007.
- KHAZAELI, P.; GOLDOOZIAN, R.; SHARIFIFAR, F. An evaluation of extracts of five traditional medicinal plants from Iran on the inhibition of mushroom tyrosinase activity and scavenging of free radicals. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.31, p.375-381, 2009.
- KNOWLTON, J.; PEARCE, S. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Oxon: Cotswold Publishing, 1996.
- KORU, O.; AVCU, F.; TANYUKSEL, M.; URAL, A. U.; ARAZ, R. E.; ŞENER, K. Cytotoxic effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the human multiple myeloma cell line. **Turk. J. Med. Sci.**, v.39, n.6, p.863-870, 2009.
- KUMAR, R.; PHILIP, A. Modified Transdermal Technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. **Trop. J. Pharm. Res.**, v.6, n. 1, p.633-644, 2007.
- LARANJINHA, J.; VIERIRA, O.; ALMEIDA, L.; MADEIRA, V. Inhibition of metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochem. Pharmacol.**, v.51, p.395-402, 1996.
- LEE, Y. T.; DON, M. J.; HUNG, P. S.; SHEN, Y. C.; LO, Y. S.; CHANG, K. W.; CHEN, C. F.; HO, L. K. Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. **Cancer Letters**, v.223, p.19–25, 2005.
- LIMMATVAPIRAT, S.; LIMMATVAPIRAT, C.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; NUNTANID, J.; LUANGTANA-ANAN, M. Enhanced enteric properties and stability of shellac films through composite salts formation. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.67, p.690-698, 2007.
- LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn. Rev.** v.4, n.8, p. 118–126, 2010.

LUCERO, M. J.; GARCÍA, J.; VIGO, J.; LEÓN, M. J. A rheological study of semisolid preparations of Eudragit. **Int. J. Pharm.**, v. 116, p.31-37, 1995.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

MAMBRO, V. M.; FONSECA, M. J. V. Assays of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Int. J. Pharm.**, v.37, p.287-295, 2005.

MANSUR, J. S.; BREDER, M. N. R.; MANSUR, M. C. d'A. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Dermatol.**, v.3, n.61, p.121-124, 1986.

MARONA, H. R. N.; LUCCHESI, M. B. B. Refining the intestinal motility test in mice to reduce animal stress. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, n.1 , p.79-82, 2003.

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

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

MARTI-MESTRES, G.; MESTRES, J. P.; BRES, J.; MARTIN, S.; RAMOS, J.; VIANA, L. The “in vitro” percutaneous penetration of three antioxidant compounds. **Int. J. Pharm.**, v.331, n.1, p.139–144, 2007.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 153-476.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol. Applied Pharm.**, v.195, p.298-308, 2004.

MCCULLOUGH, J. L.; KELLY, K.M. Prevention and treatment of skin aging. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.1067, p.323–331, 2006.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA**, Campinas: v.36, n.1, p.1-11, 2002.

MENDONÇA, C. C.; SILVA, I. C. L.; RODRIGUES, K. A.; CAMPOS, M. A. L.; MEDEIROS, M. C. M.; CASTELI, V. C.; FERRARI, M.; MUSIS, C. R.; MACHADO, S. R. P. Emulsões O/A contendo cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n.1, p.26-37, 2009.

MENON, G. K.; DRYER, L.; KALAFSKY, R. Approaches to the development of cosmetic products to counter the effects of skin aging. In: DAYAN, N. (Ed.), **Skin aging handbook: An integrated approach to biochemistry and product development**. Norwich, New York: William Andrew, 2009, p. 265-290.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother. Res.**, v.15, p.127–130, 2001.

MEYER, A. S.; DONOVAN, J. L.; PEARSON, D. A.; WATERHOUSE, A. L.; FRANKEL, E. N. Fruit hydroxycinnamic acids inhibit low density lipoprotein oxidation *in vitro*. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.1783–1787, 1998.

MICHALUART, P.; MASFERRER, J. L.; CAROTHERS, A. M.; SUBBARAMAIAH, K.; ZWEIFEL, B. S.; KOBOLDT, C. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. **J. Cancer Res.**, v.59, p. 2347–2352, 1999.

MILAN, A. L. K.; MILÃO, D.; SOUTO, A. A.; CORTE, T. W. F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 4, p.649-657, 2007.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarín J. Sci. Technol.**, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MONTEIRO, L. M.; SOUZA, A. E.; GIANOTTO, E. A. S.; NERY, M. M. F.; DUARTE, J. C.; FREITAS, O.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M. M. Comprimidos matriciais preparados com hidroxipropilmetilcelulose e pectina contendo quercetina para liberação cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179-184, 2007.

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

MOSTEFA, N. M.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v.28, n.3, p. 211-218, 2006.

MURRAY, J. C.; BURCH, J. A.; STREILEIN, R. D.; IANNACCHIONE, M. A.; HALL, R. P.; PINNELL, S. R. A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.59, p.418-425, 2008.

MUSCHERT, S.; SIEPMANN, F.; LECLERCQ, B.; CARLIN, B.; SIEPMANN, J. Prediction of drug release from ethylcellulose coated pellets. **J. Control Release**, v.135, p.71-79, 2009.

NAVARRO, R. F. Fundamentos de reologia de polímeros. Caxias do Sul: EDUCS, 1997.

NAZER, A. I.; KOBILINSKY, A.; THOLOZAN, J. L.; DUBOIS-BRISSENET, F. Combinations of food antimicrobials at low levels to inhibit the growth of *Salmonella* sv. *Typhimurium*: a synergistic effect? **Food Microbiol.**, v.22, p.391-398, 2005.

NIELSEN, K. P.; ZHAO, L.; STAMNES, J. J.; STAMNES, K.; MOAN, J. The importance of depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological process. **J Photochem. Photobiol.**, v.82, p.194-198, 2006.

OECD. ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. guidance document for the conduct of skin absorption studies, n.28, Paris, 2004.

O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 14th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck & Co., 2006.

PACHIONE, R. Cosméticos: a diversificação do consumo amplia as vendas do setor. **Química e Derivados**, n. 448, p. 14-22, 2006.

PAIVA-MARTINS, F.; GORDON, M. H. Effects of pH and ferric ions on the antioxidant activity of olive polyphenols in oil-in-water emulsions. **J. Am. Oil Chem. Soc.** v.79, n.6, p.571-6, 2002.

PENA, L. E.; LEE, B. L.; STEARNS, J. F. Consistency development and destabilization of a model cream. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v.44, p.337-345, 1993.

PHILIPS, N.; SMITH, J.; KELLER, T.; GONZALEZ, S. Predominant effects of *Polypodium leucotomos* on membrane integrity, lipid peroxidation, and expression of elastin and matrixmetalloproteinase-1 in ultraviolet radiation exposed fibroblasts, and keratinocytes. **J. Dermatol. Sci.**, v.32, n.1, p.1–9, 2003.

PINNELL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J. Am. Acad. Derm.**, v.48, n.1, p.1-19, 2003.

PIROT, F.; BERARDESCA, E.; KALIA, Y. N.; SINGH, M.; MAIBACH, H. I.; GUY, R. H. Stratum corneum thickness and apparent water diffusivity: facile and non-invasive quantitation in vivo. **Pharm. Res.**, v.15, n.3, p.492–494, 1998.

PLUEMSAMRAN, T.; ONKOKSOONG, T.; PANICH, U. Caffeic acid and ferulic acid inhibit UVA-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant defense system in keratinocyte HaCaT cells. **Photochem. Photobiol.**, v.88, n.4, p.961–968, 2012.

POLTE, T.; TYRRELL, R. M. Involvement of lipid peroxidation and organic peroxides in UVA-induced matrix metalloproteinase- 1 expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v.36, n.12, p. 1566–1574, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2008.

PROTA, G. Recent advances in the chemistry of melanogenesis in mammals. **J. Inv. Derm.**, v.75, p.122-127, 1980.

PYGMALION, M. J.; RUIZ L.; POPOVIC, E.; GIZARD, J.; PORTES, P.; MARAT, X.; LUCET-LEVANNIER, K.; MULLER, B.; GALEY, J. B. Skin cell protection against UVA by Sideroxyl, a new antioxidant complementary to sunscreens. **Free Rad. Biol. Med.**, v.49, n.11, p.1629–1637, 2010.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade para macroemulsões. **Cosmet. Toil.** (Ed. Em português), São Paulo, v.8, p.47-53, 1996.

ROGIERS, V.; PAUWELS, M. **Safety assessment of cosmetics in Europe**, Basel: Karger, 2008.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6.ed. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association, 2009.

RUSSEL, W. M. S.; BURCH, R. C. **The principles of humane experimental technique**. London: Methuen, 1959.

RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, S21–S29, 2002.

SABATOVICH, O.; KEDE, M. P. V. Introdução à dermatologia estética. In: KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. (Ed.). **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu, 2004. p. 1-2.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; DE PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on ‘in vitro’ skin permeation and ‘in vivo’ photo protective effect of flavonoids. **Int. J. Pharm.**, v.175, n.1, p.85-94, 1998.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTEGGENTE, A.; DE PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BONINA, F. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. **J. Sci. Food Agric.**, v.79, n.3, p.476-480, 1999.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; UCCELLA, N.; Barbuzzi, T.; Paolino, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **Int. J. Pharm.**, v.199, n.1, p. 39-47, 2000.

SALDANHA, L. L.; VILEGAS, W. A.; DOKKEDAL, L. Characterization of flavonoids and phenolic acids in *Myrcia bella* Cambess using FIA-ESI- IT-MSn and HPLC PAD-ESI- IT-MS combined with NMR. **Molecules**, v. 18, p. 8402–8416, 2013.

SANCHEZ-MORENO, C.; JIMENEZ-ESCRIG, A.; SAURA-CALIXTO, F. Study of low-density lipoprotein oxidizability indexes to measure the antioxidant activity of dietary polyphenols. **Nutr. Res.**, v.20, n.7, p.941–53, 2000.

SANCTIS, D. S. Emulsões aspectos técnicos e práticos para o desenvolvimento de formulações. **Rev. Racine**, p.51, 2000.

SANFELICE, A. M; TRUITI, M. C. T. Produtos em filme – Inovação na tecnologia de cosméticos. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 32, n. 1, p. 61-66, 2010.

SCHAFFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v.30, n.11, p.1191-212, 2001.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria**: fundamentos teóricos e práticos. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmet. Toiletries**, v.8, n.5, p.37-46, 1996.

SINGH, J.; GROSS, M.; SAGE, B.; DAVIS, H. T.; MAIBACH, H. I. Effect of saline iontophoresis on skin barrier function and cutaneous irritation in four ethnic groups. **Food Chem. Toxicol.**, v.38, n.8, p.717-26, 2000.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, n. 4, p. 515-531, 2008.

SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIEDELLOU, F.; MARTI-MESTRES, G. **Pharmaceutical emulsions and suspensions**. New York: Marcel Dekker, 2000. p. 259-269

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

STANIFORTH, V.; CHIU, L. T.; YANG, N. S. Caffeic acid suppresses UVB radiation-induced expression of interleukin-10 and activation of mitogen-activated protein kinases in mouse. **Carcinogenesis**, v.27, n.9, p.1803-1811, 2006.

TAGAMI, H. Functional Characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 300, p. s1-s6, 2008.

TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Anal. Chem.**, v. 23, p.535-552, 2004.

TERAO, J.; KARASAWA, H.; ARAI, H.; NAGAO, A.; SUZUKI, T.; TAKAWA, K. Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.57, 1204-1205, 1993.

THOMSON, M. L. Relative efficiency of pigment and horny layer thickness in protecting the skin of Europeans and Africans against solar ultraviolet radiation. **J. Physiol.**, v.127, p.236-246, 1995.

TRAN, T. N.; SCHULMAN, J.; FISHER, D. E. UV and pigmentation: molecular mechanisms and social controversies. **Pigm. Cell Melanoma R.**, v. 21, n. 5, p. 509-516, 2008.

TYRRELL, R.M. Modulation of gene expression by the oxidative stress generated in human skin cells by UVA radiation and the restoration of redox homeostasis. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.11, p.135–147, 2012.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.39, n.1, p.44-84, 2007.

VENDITTI, E.; BRUGE, F.; ASTOLFI, P.; KOICHEVAR, I.; DAMIANI, E. Nitroxides and a nitroxide-based UV filter have the potential to photo protect UVA-irradiated human skin fibroblasts against oxidative damage. **J. Dermatol. Sci.**, v.63, p.55–61, 2011.

VICENTINI, F. T. M. C.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR., W. A.; GEORGETTI, S. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; FONSECA, M. J. V. Quercetin in lyotropic liquid crystalline formulations: physical, chemical and functional stability. **AAPS PharmSciTech.**, v.9, n.2, p.591-596, 2008.

VINSON, J. A.; TEUFEL, K.; WU, N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. **Atherosclerosis**, v.156, p.67–72, 2001.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie: für Studium und Beruf.** Stuttgart: Deutscher Apotheker, 2000. p.161.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chem.**, v.87, p.307–311, 2004.

WANG, S. J.; ZHANG, Z. Q.; ZHAO, Y. H.; RUAN, J. X.; LI, J. L. Simultaneous quantification of chlorogenic acid and caffeic acid in rat plasma after an intravenous administration of mailuoning injection using liquid chromatography/mass spectrometry, **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v.20, p. 2303–2308, 2006.

WANG, S. Q.; BALAGULA, Y.; OSTERWALDER, U. Photoprotection: a Review of the Current and Future Technologies. **Dermatol.Ther.**, v.23, p. 31-47, 2010.

WATSON, D.G. Pharmaceutical Analysis. London: Churchill Livingstone, 1999.

WEN, A. M.; DELAQUIS, P.; STANICH, K.; TOIVONEN, P. Antilisterial activity of selected phenolic acids. **Food Microbiol.**, v.20, p.305–311, 2003.

WERTZ, K.; SEIFERT, N.; HUNZIKER, P. B.; RISS, G.; WYSS, A.; LANKIN, C.; GORALCZYK, R. Beta-carotene inhibits UVA-induced matrix metalloprotease 1 and 10 expression in keratinocytes by a singlet oxygen-dependent mechanism. **Free Rad. Biol. Med.**, v.37, p.654–670, 2004.

WEYANT, M. J.; CAROTHERS, A. M.; BERTAGNOLLI, M. E.; BERTAGNOLLI, M. M. Colon cancer chemo preventive drugs modulate integrin- mediated signaling pathways. **Clin. Cancer Res.**, v.6, p.949–956, 2000.

WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WORLDWIDE CHEMICAL INFORMATION, TRADING & ADVERTISING. Disponível em: <<http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/caffeic%20acid.htm>>. Acesso em: 17 outubro 2014.

WULF, H. C.; SANDBY-MOLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADECKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, p.185-191, 2004.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Skin aging: Postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. **Clinics in Geriatric Medicine**, v.17, n.4, p.617-630, 2001.

YAAR, M.; GILCHREST, B. A. Photo ageing: Mechanism, prevention and therapy. **Br. J. Dermatol.**, v.157, p.874–877, 2007.

YAMADA, Y.; YASUI, H.; SAKURAI, H. Suppressive effect of caffeic acid and its derivatives on the generation of UVA-induced reactive oxygen species in the skin of hairless mice and pharmacokinetic analysis on organ distribution of caffeic acid in ddY mice. **Photochem. Photobiol.**, v.82, p.1668–1676, 2006.

YANG, Y.; LI, Y.; WANG, K.; WANG, Y.; YIN, W. P38/NF-kB/Snail pathway is involved in caffeic acid-induced inhibition of cancer stem cells-like properties and migratory capacity in malignant human keratinocyte. **PLoS ONE**, v.8, n.3, e58915, doi:10.1371, 2013.

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