**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

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

Alessandra Aparecida Cruz Custodio

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Correa

**Araraquara- SP**

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

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

Alessandra Aparecida Cruz Custodio

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Correa

**Araraquara- SP**

**2019**

Custodio, Alessandra Aparecida Cruz.
**C987e** Estudo de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico incorporado a um sistema emulsionado / Alessandra Aparecida Cruz Custodio. – Araraquara, 2019.
105 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antônio Correa.

1. Ácido gálico. 2. Emulsão. 3. Permeação Cutânea. 4. Antioxidante. 5. Antimicrobiano. I. Correa, Marcos Antônio, orient. II. Título.

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

**CAPES: 33004030078P6**
**Esta ficha não pode ser modificada**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

**Câmpus de Araraquara**

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudo de eficácia e segurança (citotoxicidade) do ácido gálico incorporado a um sistema emulsionado

**AUTORA: ALESSANDRA APARECIDA CRUZ CUSTÓDIO**
**ORIENTADOR: MARCOS ANTONIO CORREA**

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

Prof. Dr. MARCOS ANTONIO CORREA
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Profa. Dra. BRUNA GALDORFINI CHIARI ANDRÉO
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara-UNIARA

Araraquara, 25 de junho de 2019

## *Dedicatória*

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

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

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

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

*"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina"*

*Cora Coralina*

## *Agradecimentos*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## RESUMO

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



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

## ABSTRACT

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



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

**LISTA DE FIGURAS**

**Figura 1 -** Estrutura química dos principais ácidos hidroxibenzoicos..... 17
**Figura 2** - Estrutura do Ácido Gálico ..... 20
**Figura 3** – Esquema representativo da diluição em microplaca para Determinação da Concentração Inibitória Mínima..... 31
**Figura 4** - Esquema dos tratamentos na placa de 96 poços. ..... 34
**Figura 5**- Tubos reacionais que demonstram a interação do radical DPPH$^{\bullet}$ com o ácido gálico em diferentes concentrações. ..... 46
**Figura 6** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante trolox. ..... 47
**Figura 7** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante ácido gálico. ..... 48
**Figura 8** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante ácido ascórbico. ..... 48
**Figura 9** - Tubos reacionais que demonstram a interação do radical ABTS com o ácido gálico em diferentes concentrações. ..... 49
**Figura 10** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante trolox. ..... 50
**Figura 11** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante ácido gálico. ..... 50
**Figura 12** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante ácido ascórbico. ..... 51
**Figura 13** - Placa de 96 poços referente à determinação da atividade inibidora de tirosinase pelo ácido gálico..... 52
**Figura 14** - Perfil de inibição de tirosinase pelo AG. ..... 52
**Figura 15** - Perfil de inibição de tirosinase pelo AA. ..... 53
**Figura 16** - Representação esquemática das etapas da melanogênese. DHI: dihidroxi-5,6-indol; TPR-2: DOPA cromo tautomerase; DHICA: dihidroxi-5,6- indol 2-carboxilato). ..... 54
**Figura 17** – Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente ao *S. aureus.* ..... 55
**Figura 18** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima

no subcultivo de *S. aureus* em placas de ágar ..... 56
**Figura 19** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente ao *S. epidermides*..... 56
**Figura 20** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *S. epidermides* em placas de ágar..... 57
**Figura 21** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente à *E. coli*..... 57
**Figura 22** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *E. coli* em placas de ágar..... 58
**Figura 23** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente à *P. aeruginosa*..... 58
**Figura 24** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *P. aeruginosa* em placas de ágar..... 59
**Figura 25** - Parede celular de Gram-positivas e Gram-negativas..... 60
**Figura 26** - Cultura de células HDFa (1 a 9) e controle de solvente (10 a 12) com MTT. ..... ..... 61
**Figura 27** - Curva dose-resposta para o tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de AG. ..... 62
**Figura 28** - Emulsão com e sem o ácido gálico. ..... 64
**Figura 29**- Cromatograma da injeção da emulsão, emulsão com AG e padrão, na concentração de 40 μg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm, Agilent), vazão 0,5 mL/min, detecção a 270 nm. ..... 66
**Figura 30** - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gálico (40 μg/mL), em HCl 0,001 M, a 80ºC. ..... 67
**Figura 31** - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gálico (40 μg/mL), em NaOH 0,001 M, a 80ºC..... 67
**Figura 32**- Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 μg/mL), em água, a 80ºC. ..... 68
**Figura 33** - Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 μg/mL), em luz ultravioleta. ..... 68
**Figura 34** - Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 μg/mL), em $H_2O_2$ a 80ºC. ..... 68
**Figura 35** - Curva analítica do AG obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel..... 69

**Figura 36 -** Cromatograma do ácido gálico em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL, obtidas pelo CLAE a 270 nm. ..... 70
**Figura 37 -** Gráfico de Resíduos ..... 71
**Figura 38**- Curva analítica para quantificação do AG utilizando tampão fosfato pH 5,5 + etanol como sistema solvente. ..... 76
**Figura 39** – Foto da emulsão (A) e emulsão com AG (B) após o teste de centrifugação. ..... ..... 77
**Figura 40 -** Foto da emulsão (A) e emulsão com AG (B) após os 90 dias do teste de estabilidade. ..... 77
**Figura 41** – Representa os valores de pH da emulsão, submetida a diferentes condições de temperatura 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante 90 dias de análise. ..... 78
**Figura 42 -** Representa os valores de pH da emulsão com AG, submetida a diferentes condições de temperatura 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante 90 dias de análise. .... 79
**Figura 43** – Representa os valores da densidade da emulsão mantida em diferentes temperaturas 5ºC, 25ºC, 45ºC e-5ºC/45ºC, durante os 90 dias de avaliação da estabilidade. ..... 79
**Figura 44 -** Representa os valores da densidade da emulsão com AG mantida em diferentes temperaturas 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante os 90 dias de avaliação da estabilidade. ..... 80
**Figura 45 -** Gráfico das concentrações experimentais (µg/mL) e o desvio padrão de AG na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas..... 81
**Figura 46 -** Porcentagem de liberação do ácido gálico da emulsão contendo 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. ..... 82
**Figura 47 -** Quantidade em µg de ácido gálico liberado da emulsão contendo 1% do ativo por unidade de área (cm2) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h. ..... 83
**Figura 48** – Modelo Matemático de Zero Ordem aplicado para interpretação da cinética de liberação. ..... 84
**Figura 49 -** Modelo Matemático de Primeira Ordem aplicado para interpretação da cinética de liberação. ..... 84
**Figura 50** – Modelo Matemático de Higuchi aplicado para interpretação da cinética de liberação ..... 85
**Figura 51 -** Porcentagem de permeação do ácido gálico da formulação nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h. ..... 86

**Figura 52 -** Porcentagem de ácido gálico retido no estrato córneo e na epiderme/derme na formulação. ..... 87

**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** - Quantidades das substâncias utilizada no teste $ABTS^{\bullet+}$ e as respectivas concentrações de AG. ..... 29
**Tabela 2** - Concentração AG nos poços ..... 32
**Tabela 3** - Composição percentual da emulsão proposta..... 35
**Tabela 4** - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE..... 39
**Tabela 5** - Solubilidade do AG em diferentes solventes a 25 ºC..... 45
**Tabela 6** - Valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do AG frente aos microrganismos estudados. ..... 59
**Tabela 7** - Composição da formulação e função dos componentes..... 63
**Tabela 8**- Condições testadas para validação do método. ..... 65
**Tabela 9** - Valores das áreas referentes ao pico de ácido gálico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico. ..... 69
**Tabela 10** - Análise de Variância (ANOVA) para os valores da Curva Analítica. ..... 71
**Tabela 11** - Valores das áreas referentes ao pico de ácido gálico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método. ..... 72
**Tabela 12** - Teste F da precisão interanalista do método de CLAE. ..... 72
**Tabela 13** - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AG por CLAE..... 73
**Tabela 14** - Valores obtidos no teste de recuperação do AG na emulsão utilizando o método por CLAE. ..... 74
**Tabela 15** - Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AG..... 75
**Tabela 16** - Média das concentrações experimentais (µg/mL) e o desvio padrão de AG na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas.81
**Tabela 17** - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação da emulsão contendo 1% de ácido gálico. ..... 85

**LISTA DE QUADROS**

**Quadro 1 –** Alterações cutâneas causadas pelo envelhecimento intrínseco e extrínseco. ..... 16

**Quadro 2** - Parâmetros a serem considerados na validação analítica..... 23

**Quadro 3** - Termos descritivos no teste de solubilidade. ..... 27

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AA: ácido ascórbico

Abs: Absorbância

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

AG: ácido gálico

ANOVA: *Analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CBM: Concentração Bactericida Mínima

CIM: Concentração Inibitória Mínima

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CV: Coeficiente de variação

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

DMSO: Dimetilsulfóxido

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

DPR: Desvio padrão relativo

EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HDFa: Fibroblastos

$IC_{50}$: Concentração inibitória 50%

INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

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

PBS: Tampão fosfato *(Phosphate Buffer Saline)*

pH: potencial hidrogeniônico

r: Coeficiente de correlação linear

$r^2$: Coeficiente de determinação

RL – Radicais Livres

UV- ultravioleta

v/v: Volume por volume

**SUMÁRIO**

1 INTRODUÇÃO ..... 14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA ..... 15
2.1 Envelhecimento ..... 15
2.2 Ácido Gálico ..... 17
2.3 Atividade Antioxidante ..... 18
2.4 Atividade Despigmentante ..... 20
2.5 Atividade Antimicrobiana ..... 21
2.6 Citotoxicidade ..... 21
2.7 Testes de segurança e eficácia ..... 22
2.8 Métodos Analíticos ..... 22
2.9 Sistemas de veiculação de ativos para a pele ..... 24
2.10 Permeação e retenção cutânea ..... 25
3 OBJETIVOS ..... 26
3.1 Objetivos específicos ..... 26
4 MATERIAL E MÉTODOS ..... 26
4.1 Avaliação da solubilidade do ácido gálico ..... 26
4.2 Determinação do potencial antioxidante ..... 27
4.2.1 Capacidade de captura sobre o $DPPH^{\bullet}$ ..... 28
4.2.2 Capacidade de captura sobre o $ABTS^{\bullet+}$ ..... 28
4.3 Avaliação da atividade inibidora da tirosinase ..... 29
4.4 Determinação da atividade antimicrobiana ..... 30
4.4.1 Preparo do Inóculo ..... 30
4.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima ..... 31
4.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) ..... 32
4.4.4 Leitura com revelador ..... 32
4.5 Avaliação do potencial citotóxico ..... 32
4.6 Desenvolvimento da formulação ..... 34
4.7 Validação do método de quantificação do AG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..... 35
4.7.1 Seletividade ..... 36
4.7.2 Linearidade ..... 37
4.7.3 Precisão ..... 37
4.7.4 Limite de detecção ..... 38

4.7.5 Limite de quantificação ..... 38
4.7.6 Exatidão ..... 39
4.7.7 Robustez ..... 40
4.7.8 Curva analítica com solvente diferente ..... 40
4.8 Avaliação da estabilidade ..... 40
4.8.1 Centrifugação ..... 40
4.8.2 Avaliação macroscópica ..... 41
4.8.3 Determinação do pH ..... 41
4.8.4 Densidade ..... 41
4.8.5 Teor de AG ..... 42
4.9 Avaliação do perfil de liberação, permeação e retenção do AG a partir de uma emulsão ..... 42
4.9.1 Avaliação da liberação do AG a partir de uma emulsão ..... 42
4.9.1.1. Estudo de Estabilidade do AG na solução receptora ..... 42
4.9.1.2. Determinação da Sink Conditions ..... 43
4.9.1.3. Avaliação do perfil de liberação ..... 43
4.9.2 Avaliação da permeação cutânea do AG a partir de uma emulsão ..... 44
4.9.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AG contido na emulsão. ..... 44
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES ..... 45
5.1 Avaliação da solubilidade do ácido gálico ..... 45
5.2 Atividade do potencial antioxidante ..... 46
5.2.1 Capacidade de captura sobre o $DPPH^{\bullet+}$ ..... 46
5.2.2 Capacidade de captura sobre o $ABTS^{\bullet+}$ ..... 48
5.3 Determinação da atividade inibidora de tirosinase ..... 52
5.4 Determinação da atividade antimicrobiana ..... 55
5.5 Citotoxicidade ..... 61
5.6 Preparação das formulações ..... 62
5.7 Validação do método de quantificação do AG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ..... 64
5.7.1 Seletividade ..... 66
5.7.2 Linearidade ..... 69
5.7.3 Precisão ..... 72
5.7.4 Limite de detecção ..... 73

5.7.5 Limite de quantificação ..... 73
5.7.6 Exatidão ..... 73
5.7.7 Robustez ..... 74
5.7.8 Curva analítica com solvente diferente ..... 75
5.8 Avaliação da estabilidade ..... 76
5.8.1 Teste de centrifugação ..... 76
5.8.2. Avaliação Macroscópica ..... 77
5.8.3. Determinação do pH ..... 78
5.8.4 Determinação da densidade ..... 79
5.8.5 Determinação do teor de AG por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência. ..... 80
5.9 Avaliação do perfil de liberação do AG a partir da formulação, permeação e retenção cutâneas do AG ..... 82
5.9.1 Avaliação da liberação do AG contido na emulsão ..... 82
5.9.2 Avaliação da permeação cutânea do AG contido na emulsão ..... 85
5.9.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AG contido na emulsão ..... 86
6 CONCLUSÃO ..... 89
REFERÊNCIAS ..... 90

# 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

# 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1 Envelhecimento

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

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

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

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

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

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

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

Fonte: FONTES, 2013.

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

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

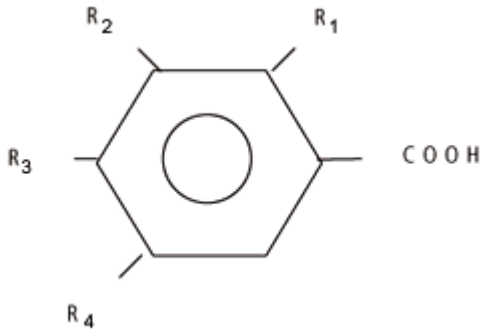
como objetivo facilitar a vida das pessoas, introduzindo cosméticos com propriedades multifuncionais, cujo apelo principal é a facilidade no transporte, praticidade na aplicação e um melhor custo benefício.

## 2.2 Ácido Gálico

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

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

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




Fonte: SOARES, 2002.

Com base na figura 1, os radicais existentes nesta estrutura básica em seus derivados representantes são: Ácido gálico: $R_2$=$R_3$=$R_4$=OH; Ácido salicílico: $R_1$=OH; Ácido Gentísico: $R_1$=$R_4$=OH; Ácido p-hidroxibenzóico: $R_3$=OH; Ácido Protocatequínico: $R_2$=$R_3$=OH; Ácido Vanílico: $R_2$=OCH3 e $R_3$=OH; Ácido Siríngico: $R_2$=$R_4$=OCH3 e $R_3$=OH(SOARES, 2002).

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

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

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

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

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

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

## 2.3 Atividade Antioxidante

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

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

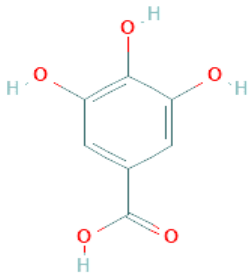
Os antioxidantes fenólicos atuam na etapa de iniciação e na propagação do processo oxidativo, funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metal. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel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

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

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

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

**Figura 2** - Estrutura do Ácido Gálico



Fonte: PUBCHEM, 2018.

## 2.4 Atividade Despigmentante

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

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

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

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

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

## 2.5 Atividade Antimicrobiana

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

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

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

## 2.6 Citotoxicidade

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

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

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

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

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

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

## 2.7 Testes de segurança e eficácia

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

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

## 2.8 Métodos Analíticos

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

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

Segundo a RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017, para uma metodologia ser considerada validada e reconhecida pela ANVISA, deve-se avaliar os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez.

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

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

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

Fonte: RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017.

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

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

## 2.9 Sistemas de veiculação de ativos para a pele

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

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

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

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

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

## 2.10 Permeação e retenção cutânea

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

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

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

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

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

# 3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a avaliação da eficácia e segurança do ácido gálico incorporado a um sistema emulsionado.

## 3.1 Objetivos específicos

- Avaliar a solubilidade do ácido gálico em diferentes solventes;
- Avaliar o potencial citotóxico, a atividade antioxidante, antimicrobiana e despigmentante do ácido gálico;
- Desenvolver e avaliar a estabilidade do sistema emulsionado com e sem a presença do ácido gálico;
- Validar a metodologia analítica para a quantificação de ácido gálico por CLAE.
- Avaliar o perfil de liberação do ácido gálico a partir das formulações;
- Avaliar a permeação e a retenção cutâneas;

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 Avaliação da solubilidade do ácido gálico

O teste de solubilidade é fundamental para a determinação dos solventes utilizados nos testes quantitativos, podendo direcionar a escolha para solventes considerados verdes, ou seja, que não trazem prejuízos para o meio ambiente (BRASIL, 2010).

Para a realização do teste separou-se tubos de ensaio, neles foram adicionados 10 mg de ácido gálico e com auxílio de micropipetas adicionou-se volumes crescentes dos solventes selecionados. A agitação dos tubos foi realizada através do Agitador Phoenix modelo AT: 56. Os solventes utilizados foram: água purificada, etanol, metanol, dimetilsulfóxido, solução de etanol: água 40:60 pH 3 ajustado com ácido acético glacial. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico.

O ensaio de solubilidade foi realizado a 25ºC 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 no Quadro 3.

**Quadro 3** - Termos descritivos no teste de solubilidade.

| Termo descritivo | Solvente |
|---|---|
| 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: Farmacopéia Brasileira (2010).

### 4.2 Determinação do potencial antioxidante

A determinação do potencial antioxidante do ácido gálico foi realizada através de duas metodologias: da capacidade de captura sobre o $DPPH^{\bullet}$ e capacidade de captura sobre o $ABTS^{\bullet+}$.

Foi utilizado como padrão dois compostos reconhecidos por sua ação antioxidante, o trolox (análogo da vitamina E) e o ácido ascórbico (HALLIWELL, 2012).

Os experimentos foram realizados em triplicata, e as porcentagens de inibição foram calculadas usando a fórmula:

$$\%\ \text{inibição do radical} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{máx}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{máx}}}\right) \text{x } 100 \qquad \text{Equação 1}$$

Em que: $Abs_{máx.}$ é a absorbância na ausência de amostra (controle) e a $Abs_{amostra}$ é a absorbância na presença de amostra.

Desta forma, considerando que se obtêm a porcentagem de inibição via equação apresentada, os resultados nesse trabalho foram apresentados conforme a relação da % inibição do radical pela concentração da substância analisada.

### 4.2.1 Capacidade de captura sobre o DPPH$^{\bullet}$

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

Em 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,004%) adicionou-se um mililitro da solução aquosa de AG, preparada em diferentes concentrações (de 0 a 4,57 μg/mL). A leitura foi realizada no comprimento de onda 515 nm, após 30 minutos e durante esse tempo as soluções foram mantidas ao abrigo da luz.

O controle utilizado para a realização do teste foram soluções com 1 mL de água e 2,5 mL da solução metanólica de DPPH a 0,004%. Como absorbância máxima, foi utilizada a média das absorbâncias destas amostras, servindo para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (Equação 1) (MOLYNEUX, 2004).

Como padrões antioxidantes, foi utilizado o ácido ascórbico e o trolox, os testes foram feitos em triplicata em diferentes concentrações.

### 4.2.2 Capacidade de captura sobre o ABTS$^{\bullet+}$

A avaliação da atividade antioxidante do AG pelo método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS$^{\bullet+}$) foi realizada seguindo método proposto por Almeida *et al*. (2013).

Preparou-se uma solução estoque de 7 mM de ABTS (192 mg diluídos em 50mL de água) e outra solução estoque de 140 mM de persulfato de potássio (378,4 mg em 10 mL de água), misturou-se 5mL da solução estoque de ABTS com 88μL da solução estoque de persulfato de potássio, para formação do radical ABTS. A mesma foi mantida em frasco âmbar na temperatura ambiente por 16h. Após este tempo, foi retirado uma alíquota e diluiu-se a mistura em etanol, obtendo absorbância final de aproximadamente 0,7±0,05 (SPAGNOL, 2014).

Separou-se 11 tubos de ensaio e foram adicionados 3mL dessa solução, volumes crescentes de AG na concentração de 300 µg/mL e volumes decrescentes de água. Para cada concentração o teste foi realizado em triplicata. Os volumes e concentrações adicionadas estão representadas na Tabela 1. Repetiu-se o experimento substituindo o AG pelo trolox e ácido ascórbico (AA).

**Tabela 1** - Quantidades das substâncias utilizada no teste $ABTS^{\bullet+}$ e as respectivas concentrações de AG.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Volume solução estoque de AG (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 AG (µg/mL) | 0 | 0,49 | 0,69 | 0,99 | 1,18 | 1,48 | 1,68 | 1,98 | 2,17 | 2,47 | 2,97 |

O comprimento de onda utilizado para leitura é de 734nm, feito em todos os tubos de ensaio. A partir desses valores calcula-se a porcentagem de inibição do radical.

### 4.3 Avaliação da atividade inibidora da tirosinase

Segundo Khazaeli e colaboradores (2009), o princípio do método utilizado para avaliação da atividade inibidora de tirosinase do AG se baseia na inibição dessa enzima, o que significa uma diminuição na produção de dopaquinona, já que a enzima tirosinase catalisa a transformação de L-dopa em dopaquinona. Para o estudo foram utilizadas placas de 96 poços, adicionou-se 80 µL da solução de ácido gálico em diferentes concentrações (0 a 5,33 $mg.mL^{-1}$), 45 µL de solução de L-dopa (4,5 mM) e 25 µL de solução de tirosinase (80 $unidades.mL^{-1}$). Em todas as soluções foi utilizado tampão fosfato pH 6,8 como solvente. A leitura das placas foram feitas após 10 minutos, no comprimento de onda de 490 nm. Como padrão foi utilizado diferentes concentrações de ácido ascórbico (0 a 0,53 $mg.mL^{-1}$) e os testes foram repetidos para comparação dos resultados.

Para obter os resultados do teste utiliza-se a Equação (2), onde os mesmos serão apresentados em porcentagem de inibição da atividade da tirosinase:

$$\%inibição = \left(1 - \frac{Abs\ amostra}{Abs\ controle}\right) x\ 100 \qquad \text{Equação 2}$$

Em que: % Inibição = porcentagem de inibição da atividade da tirosinase; *Abs* $_{amostra}$ = absorbância na presença de amostra em 490 nm; *Abs* $_{controle}$ = absorbância quando a concentração de AG é nula, em 490 nm.

A partir dos resultados obtidos pela Equação 2, construiu-se uma curva analítica, obtendo o $IC_{50}$ (quantidade de substância necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase) da cada ativo analisado.

### 4.4 Determinação da atividade antimicrobiana

#### 4.4.1 Preparo do Inóculo

Para a preparação do inóculo utilizou-se meio de cultura ágar TSA (manutenção dos microorganismos) e TSB (execução dos testes). Os meios foram preparados conforme indicação dos fabricantes em seus respectivos rótulos, foram dissolvidos em água sob aquecimento e esterilizados em autoclave (condições: 121ºC, 1 atm) durante 15 minutos.

As cepas utilizadas foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermides* ATCC 12228, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Após o repique com alça de platina das culturas para o caldo TSB, durante o seu desenvolvimento foram mantidas por 24 horas, em estufa microbiológica à temperatura de 35ºC ± 2ºC. Padronizou-se o inóculo a 580 nm em espectrofotômetro, obtendo-se transmitância de 25% ± 2% (aproximadamente 1,0 x $10^8$ UFC/mL). Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:100 em TSB, obtendo-se uma suspensão de 1,0 x $10^6$ UFC/mL, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006).

### 4.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima

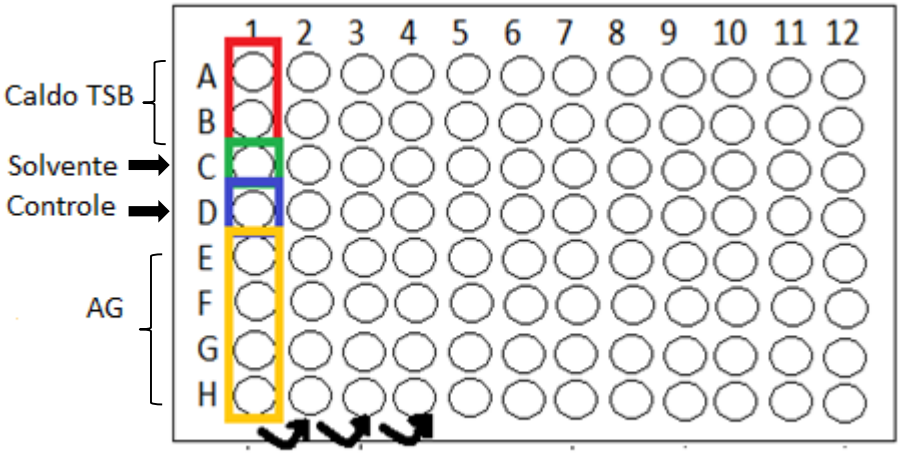
Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizada a técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) para bactérias aeróbicas.

Todos os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 µL de água estéril. Em seguida, nos poços A1 e B1 foram adicionados 100 µL de caldo TSB, no poço C1 adicionou-se 100 µL da solução de 3 mL de etanol + 2 mL de água estéril (solução solvente), no poço D1 foi adicionado 100 µL da solução controle (antimicrobianos: foram utilizados a cefazolina (100 µg/mL) para *S. aureus* e *S. epidermides* e aztreonam (100 µg/mL) para *E. coli* e *P. aeruginosa*) e nos poços de E1 até H1 foram adicionados 100 µL da amostra do AG.

Depois das respectivas adições foram feitas diluições sucessivas de 3000 a 1,46 µg/mL como apresentado na Tabela 2, e adicionou-se 100 µL do inóculo em todos os poços, com exceção da linha A (Figura 3).

Ao término do processo, as microplacas foram incubadas em estufa a 35ºC ± 2ºC por 24 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

**Figura 3** – Esquema representativo da diluição em microplaca para Determinação da Concentração Inibitória Mínima.




**A1 e B1** → 100 µL de caldo TSB.
**C1** → 100 µL da solução de 3 mL de etanol + 2 mL de água estéril .
**D1** → 100 µL da solução controle .
**E1 até H1** → 100 µL de ácido gálico.

**Tabela 2 -** Concentração AG nos poços

| N° POÇO | CONCENTRAÇÃO DE AG (μg/mL) |
|---|---|
| 1 | 3000 ,00 |
| 2 | 1500,00 |
| 3 | 750,00 |
| 4 | 375,00 |
| 5 | 187,50 |
| 6 | 93,75 |
| 7 | 46,87 |
| 8 | 23,44 |
| 9 | 11,71 |
| 10 | 5,85 |
| 11 | 2,92 |
| 12 | 1,46 |

### 4.4.3 Determinação da concentração bactericida mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) indica a menor concentração que não apresentou crescimento após o subcultivo. A mistura de cada poço da microplaca foi replicada em placa de TSA, logo depois incubadas a 35ºC por 24 horas. Após o término do tempo de incubação, as placas foram analisadas para o crescimento ou não das bactérias.

### 4.4.4 Leitura com revelador

Foi utilizado o revelador resazurina (100 μg/mL) para a leitura das placas, adicionando 30 μL em cada orifício das microplacas. A ausência ou presença de crescimento é indicada pela coloração apresentada. Depois de 2 horas se não existe crescimento a coloração é azul, se existe é rosa (PALOMINO *et al*., 2002).

## 4.5 Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação da citotoxicidade foi realizada através do método de MTT (*3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*), um ensaio colorimétrico no qual se avalia a viabilidade celular através da quantidade de cristais insolúveis de

coloração violeta, formados por meio da reação de redução do MTT em células vivas (MOSMANN, 1983).

Para a realização do teste foram utilizados fibroblastos (HDFa), células localizadas na derme, cultivadas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com adição de soro fetal bovino a 10% e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL).

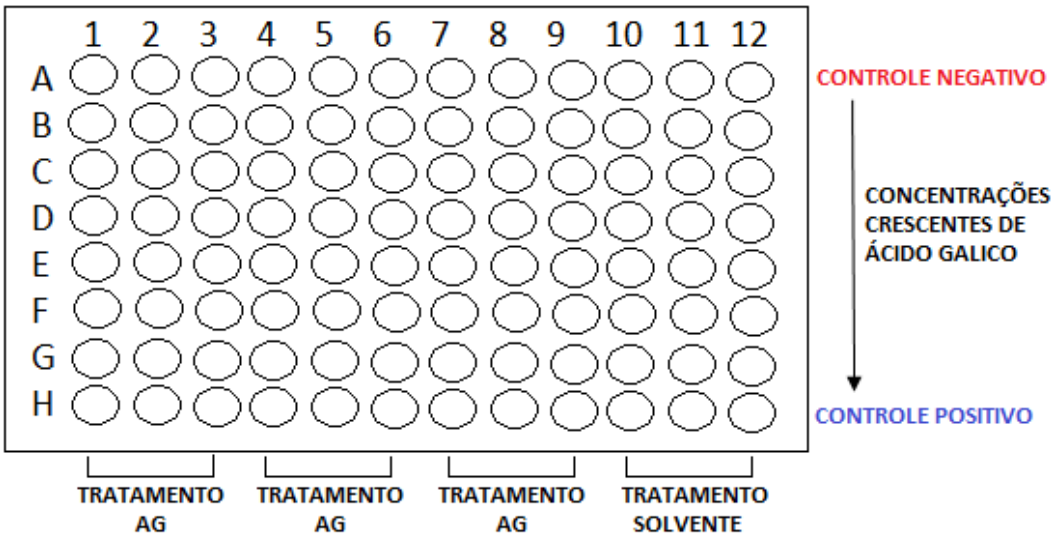
As culturas de HDFa foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de $CO_2$ por aproximadamente dois meses, o tempo necessário para obter os resultados do estudo.

A primeira etapa do ensaio de citotoxicidade é o plaqueamento das células em uma determinada concentração já pré-definida pela literatura. A concentração da suspensão de células que foi adicionada em cada poço foi de 1 x $10^6$ células/mL. As células com confluência de 90 a 100% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1300 rpm por 3 minutos, ressuspendidas em meio completo para contagem das células.

Após a contagem das células na câmara de Neubauer, adiciona-se mais meio, dependendo da concentração obtida, adicionando em cada poço 100 μL da suspensão de células a 1 x $10^6$ células/mL em placas de 96 poços. Depois do plaqueamento, as placas foram incubadas por 24 horas para a adesão efetiva das células aos poços e posteriormente foi realizado o tratamento.

Na segunda etapa, que é etapa de tratamento existe o controle positivo que é feito com 1 mL de DMSO a 10% nas células, que é controle de morte celular, e o controle negativo preparado com DMEM e soro fetal bovino, que deve ser o controle para células vivas. Para analisar a atividade citotóxica do AG, diferentes concentrações (solubilizado em DMEM com 5% de etanol), foram adicionadas nos poços, da menor para a maior. Após a realização dos tratamentos, as placas foram novamente incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de $CO_2$.

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




Na terceira etapa, após o período de 24 horas com o tratamento, foi feita a análise. Para isso o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) por 2 vezes (BRUGGISSER *et al.*, 2002) e 100 µL de MTT (1 mg/mL PBS) foram adicionados em cada poço, a placa foi incubada por 3 horas em estufa 5% de $CO_2$ a 36ºC. Decorrido esse tempo, retirou-se o MTT da placa e adicionou-se 100 µL de álcool isopropílico em cada poço para desfazer os cristais de formazana.

A leitura espectrofotométrica da placa foi realizada no comprimento de onda de 595 nm, em leitor de placas.

Para o cálculo da porcentagem de células mortas, foi utilizado os valores de absorbância dos poços com o 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 e calculado o $IC_{50}$. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes e em triplicata.

### 4.6 Desenvolvimento da formulação

O ácido gálico utilizado no estudo foi adquirido da empresa Sigma Aldrich® (Switzerland), em pó.

Após a escolha das características ideais da emulsão e dos componentes a serem utilizados, definiu-se uma concentração para cada constituinte da formulação, descritos na Tabela 3.

Os componentes foram devidamente pesados em balança semi-analítica, de acordo com as concentrações definidas. A emulsão foi preparada por mistura direta, padronizada, de fase oleosa previamente pesada em recipiente apropriado e devidamente aquecida até 60°C-70°C, seguida pela adição da fase aquosa a 70-80°C com agitação manual até completa homogeneização (CORRÊA, 2012). O ácido gálico foi adicionado diretamente na fase aquosa.

**Tabela 3** - Composição percentual da emulsão proposta

| INCI name | Composição percentual (% p/p) |
|---|---|
| Cetearyl Alcohol | 8,0% |
| Sodium Cetearyl Sulfate | 1,5% |
| Glyceryl Stearate | 1% |
| Ethylhexyl Stearate | 3,0% |
| Glycerin | 3,0% |
| Phenoxyethanol | 0,5% |
| Disodium EDTA | 0,02% |
| GallicAcid | 1,0% |
| Water | q.s.p. 100% |

## 4.7 Validação do método de quantificação do AG por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação do AG nos testes de liberação, permeação e retenção cutânea *in vitro*, foi necessário adequar uma metodologia eficiente utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizado o equipamento Waters®, Waters e2695 Separations Module, injeção automática, com detector PDA 2998 e detector FLR 2475. A fase móvel foi composta por etanol e água purificada (60: 40) v/v com pH 3 ajustado com ácido fórmico, coluna Eclipse Plus C18 (Agilent, 4,6 x 150 mm, 5 μm,), vazão 0,5 mL/min, injeção de 10 μL, detecção a 270 nm, solução de padrão e amostra 40 μg/mL diluídas na fase móvel.

Foram pesados analiticamente 0,01g de AG e transferidos para balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com etanol e água purificada (60: 40), obtendo-se solução com concentração de 100 μg/mL (solução estoque). Alíquotas de 500 a 6000 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 seletividade, linearidade, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

### 4.7.1 Seletividade

A análise da seletividade do método analítico deve demonstrar a capacidade em identificar ou quantificar o analito de interesse, quando na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

A solução da emulsão foi preparada a partir de 1g da emulsão sem o AG; a solução padrão ou seja somente com o ácido gálico foi preparada a partir de 0,01g de AG; e a solução da emulsão contendo o AG pesou-se 1g, garantindo a mesma concentração final. Essa alíquota foi diluída em etanol e água purificada (60: 40), obtendo-se uma solução com concentração final de AG igual a 100 μg/mL. Para obtenção dos picos, foi transferida uma concentração padrão de 4000 μL das soluções para balão de 10 mL, completando-se o volume com solução de etanol e água purificada (60: 40), com concentração final de 40 μg/mL. Após a filtração em membrana de celulose de 0,45 μm, as alíquotas foram injetadas no cromatógrafo e procedeu-se com a comparação entre elas.

Quando os produtos de degradação e as impurezas não estão presentes, a seletividade pode ser avaliada submetendo o analito a condições de estresse, forçando a obtenção de produtos de degradação, podendo ser identificados na análise.

Esta análise foi realizada submetendo-se o padrão de AG 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 poderiam interferir na análise.

### 4.7.2 Linearidade

A linearidade de um método é medida pela capacidade da metodologia em demonstrar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2017).

Para avaliação da linearidade, devem ser apresentados os seguintes dados: representação gráfica das respostas em função da concentração do analito; gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado de sua avaliação estatística; equação da reta de regressão de y em x, estimada pelo método dos mínimos quadrados; avaliação da associação linear entre as variáveis por meio do coeficientes de correlação (r) e de determinação ($r^2$); e a avaliação da significância do coeficiente angular (BRASIL, 2017).

Para o ensaio da linearidade foram preparadas seis soluções padrão do AG em diferentes concentrações, em triplicata, verificando a relação linear entre os resultados: 10 μg/mL; 20 μg/mL; 30 μg/mL; 40 μg/mL; 50 μg/mL60 μg/mL.

### 4.7.3 Precisão

A precisão deve avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas da amostragem múltipla de uma mesma amostra conforme descrito no método analítico a ser validado (BRASIL, 2017).

Pode ser expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a Equação 3:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \qquad \text{Equação 3}$$

Em que: DP = é o desvio padrão e CMD = a concentração média determinada.

Não se admite valores de DPR superiores a 5% (BRASIL, 2017).

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade, onde sete réplicas da solução de AG 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. E também pela precisão intermediária, na qual diferentes analistas realizam a análise no mesmo dia, e o desvio padrão relativo é calculado entre os diferentes analistas. Foi realizado testes estatísticos (Teste F) afim de garantir a precisão do método proposto.

### 4.7.4 Limite de detecção

O limite de detecção deve ser demonstrado pela menor quantidade que uma substância pode ser detectada em uma amostra, porém, não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinação do limite de detecção (LD), a equação 4 foi utilizada (BRASIL, 2017):

$$LD = \frac{DPa \times 3{,}3}{IC} \qquad \text{Equação 4}$$

Em que: DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analíticas; IC= inclinação da curva analítica.

O limite de detecção (LD) do AG foi determinado a partir das três curvas analíticas, utilizando-se os dados de desvio padrão do intercepto e inclinação média da curva analítica, conforme a Equação 4 anteriormente apresentada.

### 4.7.5 Limite de quantificação

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Para determinação do limite de quantificação (LQ), a fórmula utilizada é mostrada na equação 5 (BRASIL, 2017).

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \qquad \text{Equação 5}$$

Em que: DPa= desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica; IC= inclinação da curva analítica.

O limite de quantificação foi obtido com base nos mesmos dados descritos, segundo a Equação 5, anteriormente apresentada.

### 4.7.6 Exatidão

A concordância entre os resultados individuais do método em relação a um valor aceito como verdadeiro, expressa a exatidão do método (BRASIL, 2017).

A exatidão deve ser verificada a partir de no mínimo nove determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, 80 (R1), 100 (R2) e 120% (R3), com três réplicas cada, nas concentrações de 32, 40 e 48 µg/mL. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente (Equação 6).

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ Teórica} \times 100 \qquad \text{Equação 6}$$

Dessa forma, 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 4.

**Tabela 4** - Preparo das soluções para o teste de recuperação do método CLAE

| | Volume placebo(mL) | Volume padrão(mL) | Concentração final teórica (µg/mL)* |
|---|---|---|---|
| A | 4,0 | - | 0 |
| R1 | 4,0 | 3,2 | 32 |
| R2 | 4,0 | 4,0 | 40 |
| R3 | 4,0 | 4,8 | 48 |
| P | - | 4,0 | 40 |

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

### 4.7.7 Robustez

A robustez indica a capacidade do método em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (BRASIL, 2017).

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: 268 nm, 270 nm e 272 nm.
- Vazão da fase móvel: 0,45 mL/min, 0,50 mL/min e 0,55 mL/min.
- Proporção da fase móvel: água e etanol 35: 65, 40: 60 e 45: 55.
- Volume de injeção: 8 µL, 10 µL e 12 µL.
- Temperatura: 23ºC,25ºC e 27ºC.

### 4.7.8 Curva analítica com solvente diferente

A validação foi efetuada utilizando a fase móvel (água e etanol, 60:40 pH 3 acidificado com ácido fórmico) como solvente para o AG, entretanto, na avaliação da liberação do AG da formulação e da permeação cutânea, foi utilizado como solvente tampão fosfato (pH = 5,5) e etanol na proporção de 1:1. Após a validação do método analítico, foi construída uma curva analítica para esse solvente, sendo utilizada posteriormente na análise dos resultados dos testes de liberação e permeação.

## 4.8 Avaliação da estabilidade

Após o preparo da emulsão, separou-se alíquotas que foram submetidos a analise durante 90 dias e a diferentes temperaturas: 5°C, 25ºC, 45°C e ciclos de congelamento/descongelamento (-5ºC/45°C). O estudo de estabilidade foi conduzido conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos de Produtos Cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

### 4.8.1 Centrifugação

A centrifugação das emulsões após 24 horas da manipulação da mesma, tem como principal objetivo avaliar a estabilidade das formulações com e sem o ácido

gálico, 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).

Para o teste de centrifugação, foram pesados em um tubo de ensaio, 5g de amostra, em balança semi analítica, as quais foram submetidas a rotações crescentes de 980, 1800 e 3.000 rpm e o tempo para cada velocidade foi de 15 min (BRASIL, 2004; ISAAC *et al*., 2008).

### 4.8.2 Avaliação macroscópica

Para a avaliação macroscópica levou-se em consideração características organolépticas, tais como aspecto, cor e odor. A não ocorrência de separação de fase, precipitação, turvação, devem ser indicativos de estabilidade. Como padrão, compara-se as avaliações do dia 1 (24 h após a manipulação da fórmula).

### 4.8.3 Determinação do pH

As amostras foram diluídas em solução a 10% e procedeu-se com a leitura do pH. As leituras foram realizadas em triplicata, durante 90 dias (estabilidade acelerada), nas amostras submetidas às temperaturas 5ºC, 25ºC, 45°C e ciclo (-5/45ºC) (BRASIL, 2004).

### 4.8.4 Densidade

Para determinação da densidade relativa das formulações tomou-se como base a Farmacopeia Brasileira (2010) e foi utilizado um picnômetro para leitura. O valor da densidade relativa foi obtido após a realização do cálculo mostrado na Equação 7.

$$D_r = \frac{M_c - M_v}{M_a - M_v} \qquad \text{Equação 7}$$

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.

### 4.8.5 Teor de AG

A concentração de AG nas emulsões ao longo do tempo foi avaliada através do método validado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Para isso 0,1 g da emulsão foi diluída em 10 mL de solução de etanol: água (60: 40), obtendo-se a concentração teórica de AG igual a 100 μg/mL, dessa solução tomou-se uma alíquota de 4mL obtendo uma concentração teórica final de 40 μg/mL. Após a filtração em membrana de celulose de 0,45 μm, as alíquotas foram injetadas no cromatógrafo e procedeu-se com a comparação entre elas.

## 4.9 Avaliação do perfil de liberação, permeação e retenção do AG a partir de uma emulsão

O experimento foi realizado utilizando uma emulsão contendo 1% de ácido gálico. Os dados obtidos foram avaliados em comparação com os resultados da atividade antioxidante, despigmentante, microbiológica e citotóxica do AG, com o objetivo de demonstrar se a concentração escolhida é eficiente e segura.

### 4.9.1 Avaliação da liberação do AG a partir de uma emulsão

A avaliação da liberação do AG a partir da emulsão foi efetuada de acordo com metodologia descrita por OECD (2004), Silva *et al*. (2006) e Spagnol (2014). O experimento foi realizado usando uma emulsão contendo 1% do ácido gálico.

#### 4.9.1.1. Estudo de Estabilidade do AG na solução receptora

Para a escolha da solução receptora utilizada no ensaio, foi necessário um estudo de degradação com dois tampões fosfato, pH 7,4 e pH 5,5, que mimetizam o pH da pele, afim de investigar se o ácido gálico sofreria interferência em seu pico de absorção, adicionando 50% de etanol para a completa solubilização do mesmo. O estudo foi realizado utilizando uma concentração de 40 μg/mL do ácido gálico durante 8 horas, e a cada 2 horas, a amostra era analisada pela CLAE, obtendo os picos e valores de área.

A avaliação da liberação foi feita a partir de células de Franz modificadas com área de difusão de 1,77 $cm^2$. O compartimento receptor da célula de Franz foi completado com 7,0 mL da solução receptora composta por tampão fosfato 0,1 M (pH

5,5): etanol, na proporção de 1:1, e amostras de 300 mg da emulsão contendo 1% de ácido gálico foram dispostas sobre a membrana.

#### 4.9.1.2. Determinação da Sink Conditions

Para garantir as *sink conditions* a solubilidade do ativo foi testada na solução receptora, para isso considerou-se a maior concentração a ser utilizada (1%) e uma quantidade 10x maior do que a aplicada, solubilizando em 7mL de solução receptora.

Considerando-se a concentração de incorporação de 1% do ácido gálico na emulsão, serão aplicados na célula de Franz 300mg da formulação, contendo 3 mg de AG. Portanto no mínimo 30mg de AG devem ser solubilizados em 7mL, o que corresponde a uma solubilidade mínima de 4,28 mg/mL.

Foi feita uma solução supersaturada de AG em solução receptora e a partir dela, sucessivas diluições até encontrar a concentração que poderia ser identificada pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. A concentração de AG nesta solução foi de 52,12 mg/mL, ou seja, essa é a quantidade máxima de AG que pode ser solubilizada na solução receptora.

Esses resultados garantem as *sink condition* já que a solubilidade do AG na solução receptora (52,14 mg/mL) composta por tampão fosfato pH 5,5 e etanol é cerca de 12 vezes superior do que a solubilidade mínima necessária para garantir a condição sink (4,28 mg/mL).

#### 4.9.1.3. Avaliação do perfil de liberação

A solução receptora composta por tampão fosfato 0,1 M (pH 5,5): etanol, na proporção de 1:1, foi constantemente agitada a 300 rpm através da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a 37 ± 5º C por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas. A avaliação da quantidade de AG 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 cada amostra injetada uma vez. A quantificação foi realizada por CLAE.

### 4.9.2 Avaliação da permeação cutânea do AG a partir de uma emulsão

Para avaliar a permeação do AG contido na emulsão, a mesma metodologia descrita no ensaio de liberação foi utilizada neste caso, porém, foi utilizada pele dissecada da orelha de porco, adquiridas do Abatedouro Olhos d'água (Ipuã - SP). As mesmas foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele equivalente à epiderme.

### 4.9.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AG contido na emulsão.

A metodologia foi executada de acordo Silva et al. (2006) e Spagnol (2014). Para avaliação da retenção no estrato córneo, foi utilizada a técnica de *tape stripping*, onde se remove o estrato córneo da pele da orelha de porco, através de 10 pedaços de fita adesiva (3M) que foram colados e removidas da área de difusão da pele.

Foram testados diferentes solventes para extração do ativo nas fitas adesivas, metanol, etanol, acetonitrila e por último a mesma proporção da fase móvel utilizada no método validado por CLAE, etanol: agua (60:40) pH 3 acidificado com ácido fórmico.

As fitas adesivas foram mergulhadas em 4 mL de solução da fase móvel utilizado para validação por CLAE etanol: agua (60:40) pH 3 acidificado com ácido fórmico, 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, separa-se a região que a emulsão estava em contato, recortando a mesma. As peles separadas foram imersas em 4 mL de solução da fase móvel, etanol: agua (60:40) pH 3 acidificado com ácido fórmico, 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.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

## 5.1 Avaliação da solubilidade do ácido gálico

Para a apresentação dos resultados obtidos no teste de solubilidade, utilizou-se 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. No intuito de consumir o mínimo de amostra e solventes, adequou-se as quantidades para 10 mg de soluto. Os resultados obtidos na avaliação da solubilidade do AG em diferentes solventes encontram-se na Tabela 5.

**Tabela 5** - Solubilidade do AG em diferentes solventes a 25 ºC

| **Solventes** | **Termo descritivo** |
|---|---|
| Etanol | Facilmente solúvel |
| Água | Ligeiramente solúvel |
| Metanol | Facilmente Solúvel |
| Dimetilsulfóxido | Solúvel |
| Etanol: Água (40:60) pH 3,0 | Solúvel |

Os resultados obtidos vão de encontro com a solubilidade do ácido gálico descrita na Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1929), apresentando solubilidade em água e etanol, porém mais solúvel em etanol.

Os solventes escolhidos fazem parte da química verde, cujo objetivo principal é reduzir ou eliminar a utilização de solventes tóxicos, protegendo o meio ambiente. A química verde incentiva uma produção limpa e sem poluentes industriais, por esse motivo para o desenvolvimento do estudo, foi realizado testes com diferentes solventes, afim de determinar qual seria melhor para o desenvolvimento do estudo (FERREIRA *et al.*, 2014).

Para compor a fase móvel utilizada na CLAE, foram escolhidos a proporção de Etanol: Água, por serem solventes que geram menos resíduos e também pelo valor agregado, garantindo a solubilidade do ácido gálico e com um melhor custo benefício.

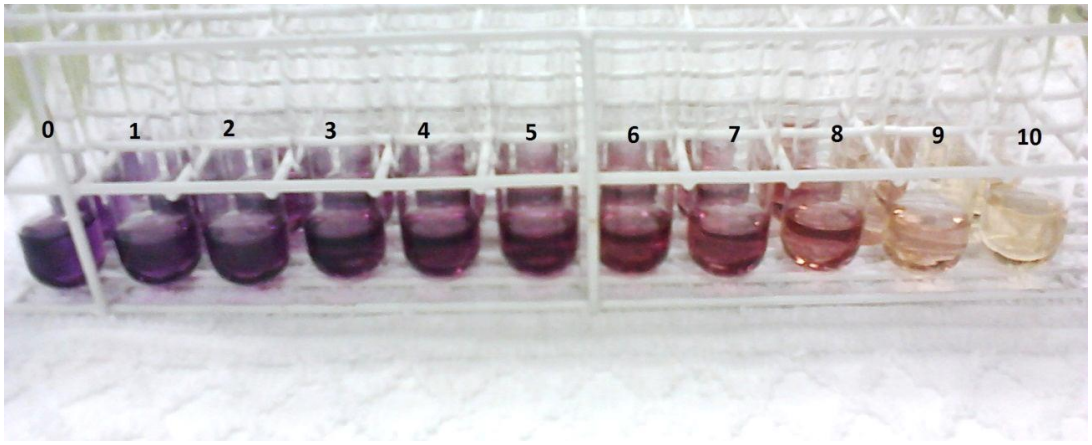
## 5.2 Atividade do potencial antioxidante

### 5.2.1 Capacidade de captura sobre o $DPPH^{\bullet+}$

A avaliação da atividade antioxidante neste método, se baseia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, uma vez que depois da estabilização do radical ocorre uma mudança de coloração de cor violeta a amarelo-claro (Figura 5) e, consequentemente, um decréscimo da absorvância a 515 nm (MENSOR *et al*., 2001).

A Figura 5 demonstra a reação da interação do radical $DPPH^{\bullet}$ com o ácido gálico em diferentes concentrações.

**Figura 5**- Tubos reacionais que demonstram a interação do radical $DPPH^{\bullet}$ com o ácido gálico em diferentes concentrações.




Neste teste ocorreu alteração da coloração, de violeta para amarelo-claro conforme o aumento da concentração do AG, demonstrando sua atividade antioxidante, pois, uma vez que o radical foi sequestrado ocorre a mudança de coloração. A partir desses resultados, obteve-se um gráfico da porcentagem de inibição do radical em função da concentração do antioxidante.

Através das equações da reta apresentadas nas Figuras de 6 a 8, foi possível inferir que o ácido gálico e os demais analitos, atingiram o $IC_{50}$ para o $DPPH^{\bullet}$, obtendo

os seguintes valores: $IC_{50}$ do AG foi 0,854µg/mL, do AA foi 2,69µg/mL e do TROLOX 4,1µg/mL ou seja, uma menor quantidade de AG é necessária para inibir 50% do radical DPPH o que demonstra uma maior atividade.

Em comparação com outros ativos cosméticos já estudados, como o ácido ascórbico por exemplo, ele demonstra uma maior atividade antioxidante e além disso uma grande vantagem, pois o ácido gálico não é considerado um composto fotossensível, ou seja, ele apresenta estabilidade quando incorporado em formulações cosméticas.

**Figura 6** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante trolox.

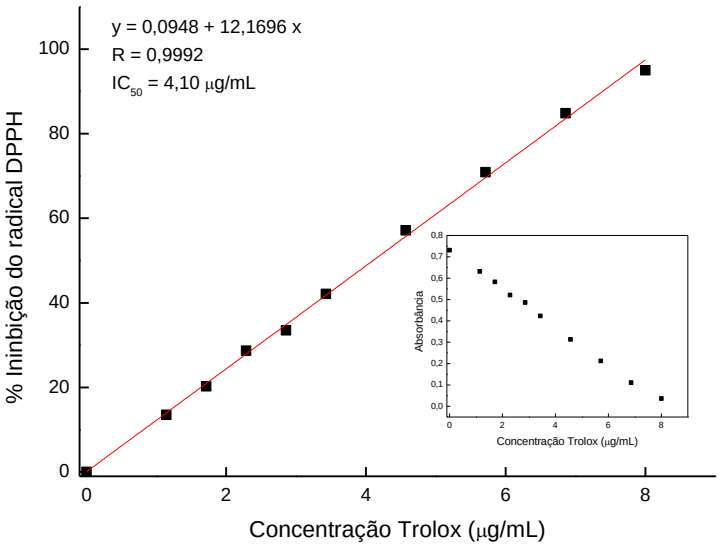


**Figura 7** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante ácido gálico.

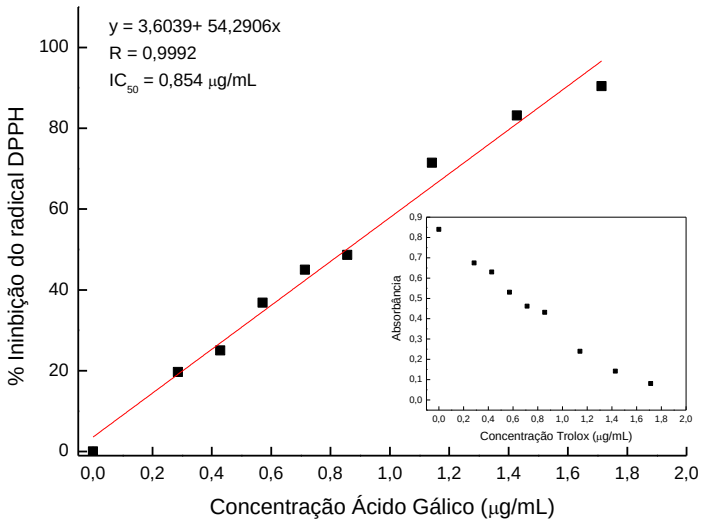
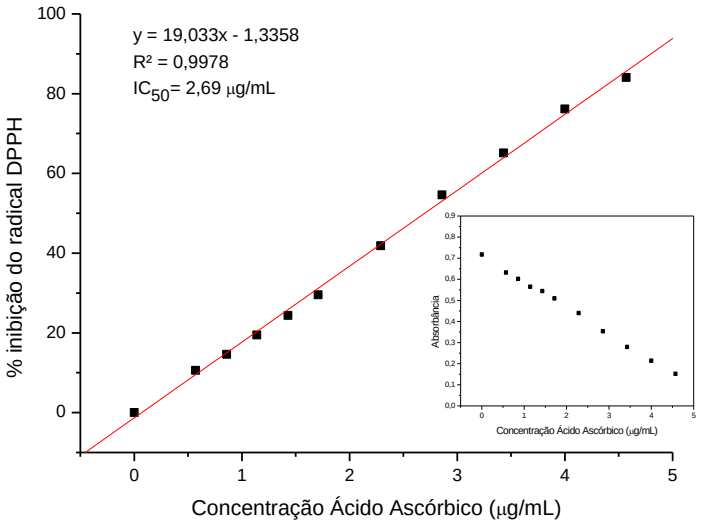



**Figura 8** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH em função da concentração do antioxidante ácido ascórbico.



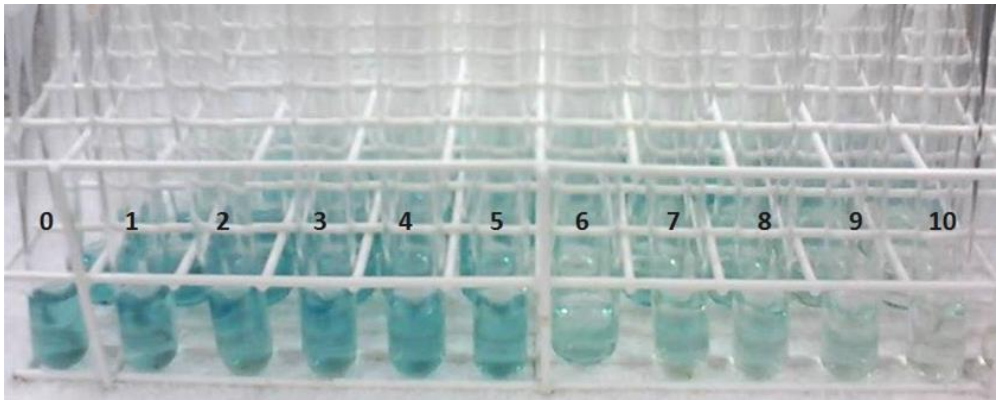

### 5.2.2 Capacidade de captura sobre o $ABTS^{\bullet+}$

Para avaliação da atividade antioxidante no método de inibição do radical ABTS, avalia-se a mudança de coloração, onde o verde escuro indica ausência de antioxidante e na presença do mesmo a coloração será verde claro. Pode-se notar

conforme apresentado na Figura 9, que com o aumento da concentração do antioxidante o verde se torna ainda mais claro.

A Figura 9 demonstra a reação da interação do radical $ABTS^{\bullet+}$ com o ácido gálico em diferentes concentrações, e as figuras de 10 a 12 os gráficos da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do AG, AA e TROLOX, para o cálculo do $IC^{50}$.

**Figura 9** - Tubos reacionais que demonstram a interação do radical ABTS com o ácido gálico em diferentes concentrações.




Com os resultados obtidos, foi possível construir um gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante, onde o $IC_{50}$ do AG foi igual a 0,674µg/mL, do AA foi 2,28µg/mL, e do TROLOX 3,17µg/mL confirmando assim o resultado demonstrado pela inibição do radical DPPH em que o AG apresenta uma maior atividade antioxidante quando comparado ao AA e TROLOX.

Além disso, outros trabalhos apresentaram resultados de $IC_{50}$ próximo aos encontrados na avaliação dos padrões, tais como para o AA $IC_{50}$ 2,57 µg/mL e para o TROLOX 3,69 µg/mL, corroborando com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante através dos radicais DPPH e ABTS (VIEIRA *et al*., 2011; RABÊLO *et al*., 2014).

**Figura 10** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante trolox.

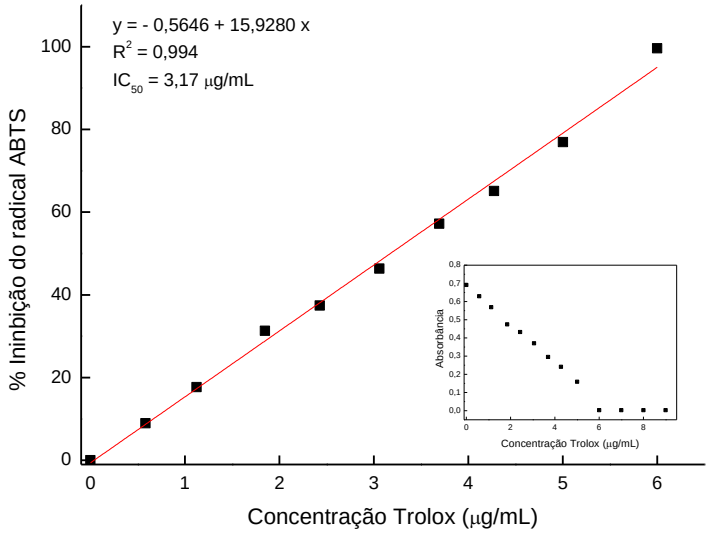



**Figura 11** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante ácido gálico.

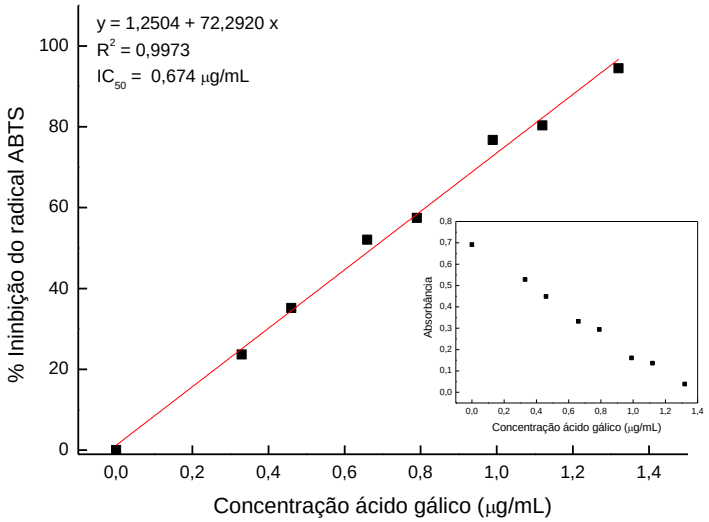
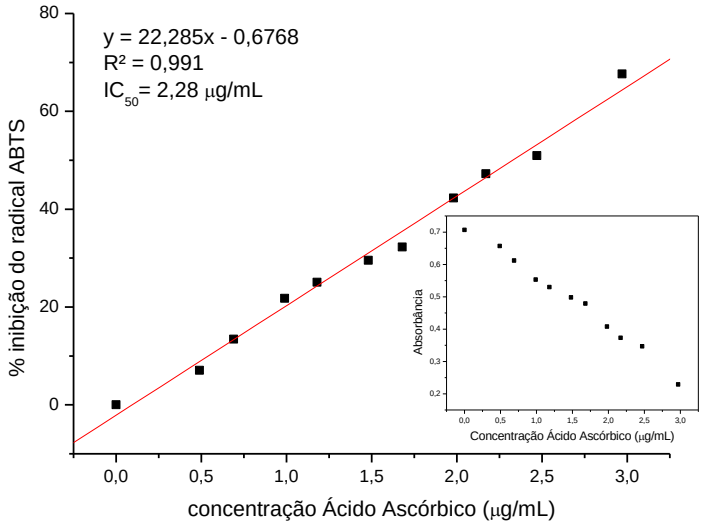


**Figura 12** - Gráfico da porcentagem de inibição do radical ABTS em função da concentração do antioxidante ácido ascórbico.




O excesso de radicais livres, pode gerar um desequilíbrio no organismo, conhecido como estresse oxidativo, podendo oxidar estruturas biológicas. Algumas reações tais como a glicação proteica, envolve a perda das funções biológicas de proteínas, como o colágeno e proteoglicanas, que resultam em alterações da estrutura da membrana e aumento da flacidez da pele. Com isso ocorre o desenvolvimento de rugas, manchas, perda de elasticidade e da firmeza cutânea, dentre outras alterações que podem ser amenizadas com o uso de um potente agente antioxidante (HIRATA *et al*., 2004; FRIES *et al*., 2010).

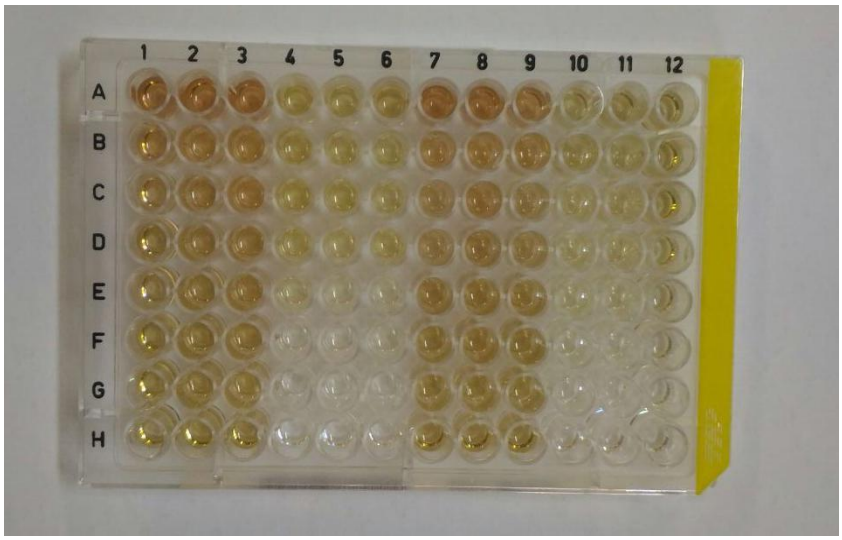
O ácido ascórbico é referência como antioxidante, quando comparamos o valor de $IC_{50}$ dele de 2,28 µg/mL com o $IC_{50}$ do ácido gálico de 0,674µg/mL, podemos concluir que a atividade antioxidante do ácido gálico é superior ao do ácido ascórbico. Além disso o ácido ascórbico é fotossensível, dessa forma o ácido gálico possui diversas vantagens nesse comparativo.

Através dos ensaios realizados, pode-se comprovar a atividade antioxidante do ácido gálico, por esse motivo ele é um ativo em potencial para ser utilizado em produtos antienvelhecimento.

### 5.3 Determinação da atividade inibidora de tirosinase

A Figura 13 mostra uma placa de 96 poços variando sua coloração de castanho a laranja claro conforme a concentração de AG aumentou e em duplicata. As colunas de 1 a 6 corresponde a um teste feito em triplicata, onde aumentou-se a concentração do ácido gálico e as de 7 a 12 outro teste em triplicata, preparadas de forma independente.

**Figura 13** - Placa de 96 poços referente à determinação da atividade inibidora de tirosinase pelo ácido gálico.




As figuras 14 e 15 apresentam o perfil de inibição de tirosinase causada pelo AG e AA, respectivamente.

**Figura 14** - Perfil de inibição de tirosinase pelo AG.

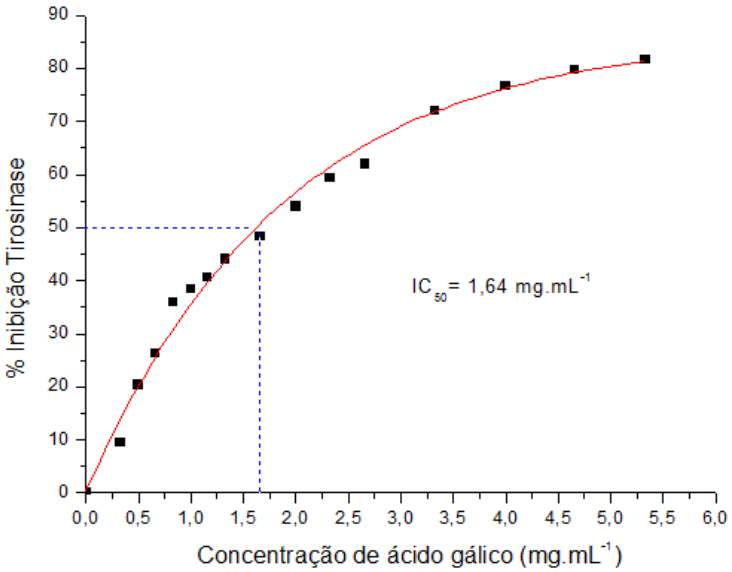
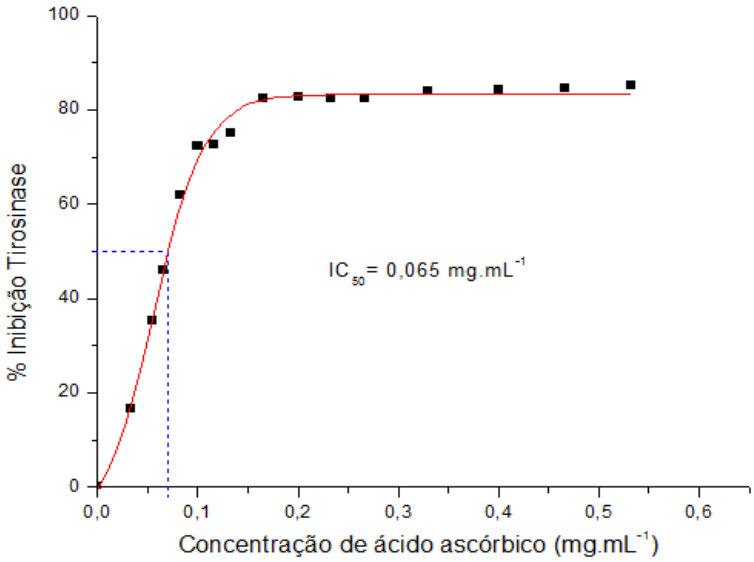


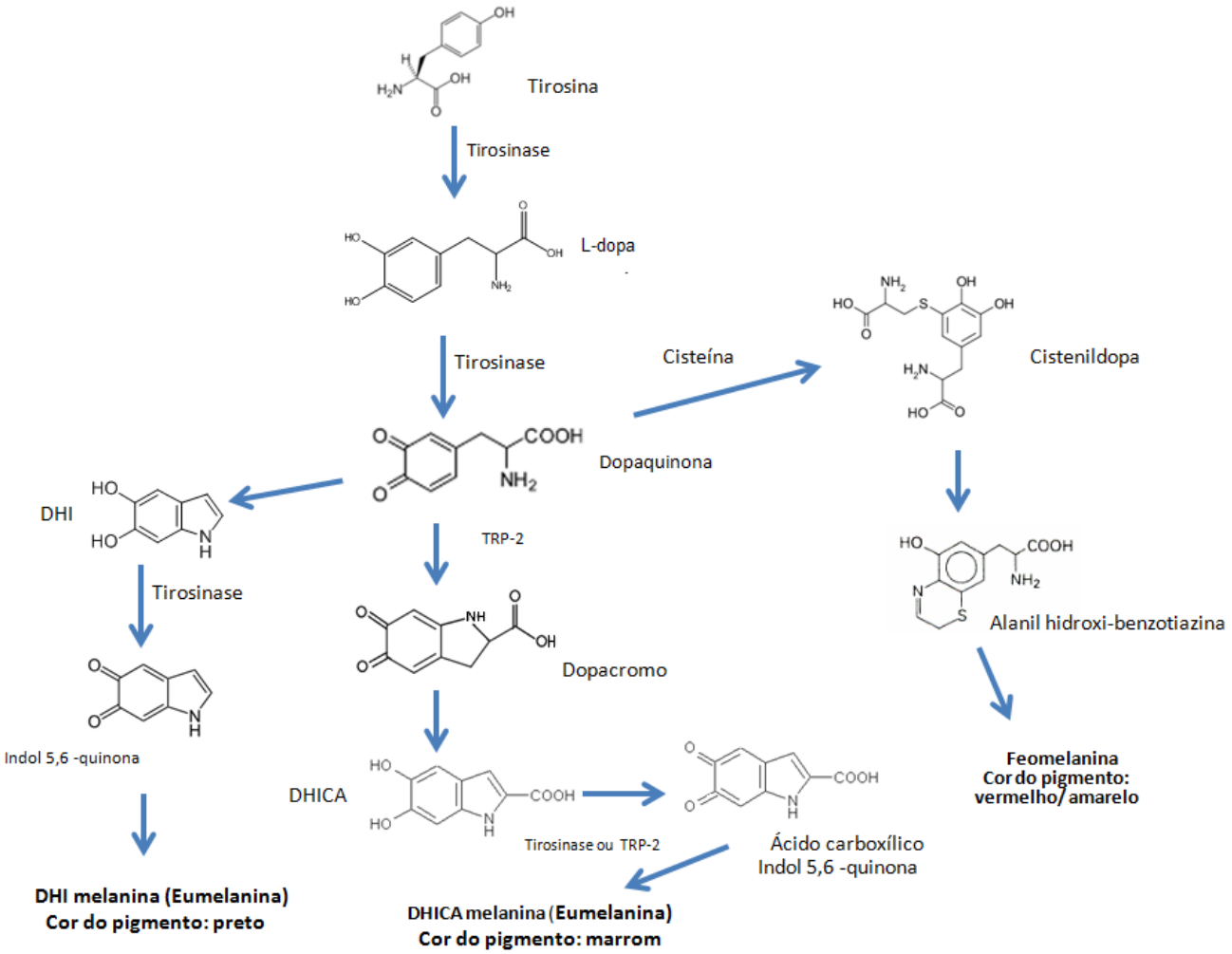
**Figura 15 -** Perfil de inibição de tirosinase pelo AA.




A tirosinase é uma enzima chave na síntese de melanina e intervém em vários intermediários das fases de formação do pigmento, contudo, sua forte ativação gera um acúmulo excessivo de melanina, podendo levar à distúrbios de hiperpigmentação (REF?).

Uma das reações no processo de biossíntese de melanina catalisada pela tirosinase conforme apresentado na figura 16 é a oxidação da L-Dopa a Dopaquinona, portanto, como o AG apresentou potencial antioxidante, também foi avaliado seu potencial de inibir a atividade da tirosinase.

**Figura 16** - Representação esquemática das etapas da melanogênese. DHI: dihidroxi-5,6-indol; TPR-2: DOPA cromo tautomerase; DHICA: dihidroxi-5,6- indol 2-carboxilato).




Fonte: SPAGNOL, 2014.

Com base nos resultados obtidos o ácido gálico apresentou $IC_{50}$ de 1,64 $mg.mL^{1}$, portanto, ele pode ser utilizado como ativo despigmentante atuando na etapa da oxidação de L-Dopa em Dopaquinona. Quando comparado ao padrão de ácido ascórbico que apresentou um $IC_{50}$ de 0,065 $mg.mL^{-1}$, ele demonstra uma menor atividade, mas isso não impede sua utilização como ativo despigmentante em produtos cosméticos com ação multifuncional.

### 5.4 Determinação da atividade antimicrobiana

O revelador utilizado foi a resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido), pois é considerado um corante óxido-redutor que em sua forma oxidada, apresenta-se como um composto de cor azul. Ao adentrar em células viáveis é reduzido e convertido em resorufina, um composto cor de rosa, a mudança de coloração é evidente e possui alta sensibilidade a microorganismos pouco redutores, o que viabiliza o seu uso com uma maior gama de microrganismos.

Para identificação das respectivas concentrações de inibição de crescimento bacteriano, poços com coloração azul representa ausência de crescimento e de coloração rosa, presença de crescimento bacteriano.

Para *Staphylococcus aureus* houve crescimento microbiano a partir do sexto poço, indicando que a CIM do AG frente a este microrganismo é 187,50 μg/mL (Figura 17), o mesmo valor foi constatado para a CBM (Figura 18), já que após o subcultivo, essa foi a menor concentração que não apresentou crescimento.

**Figura 17** – Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente ao *S. aureus.*

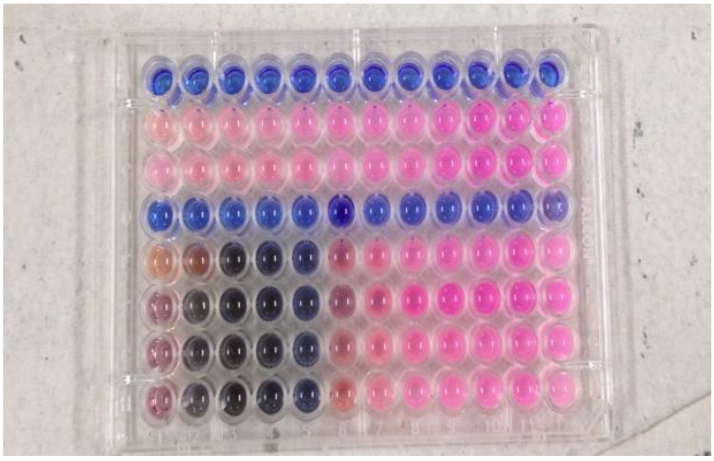
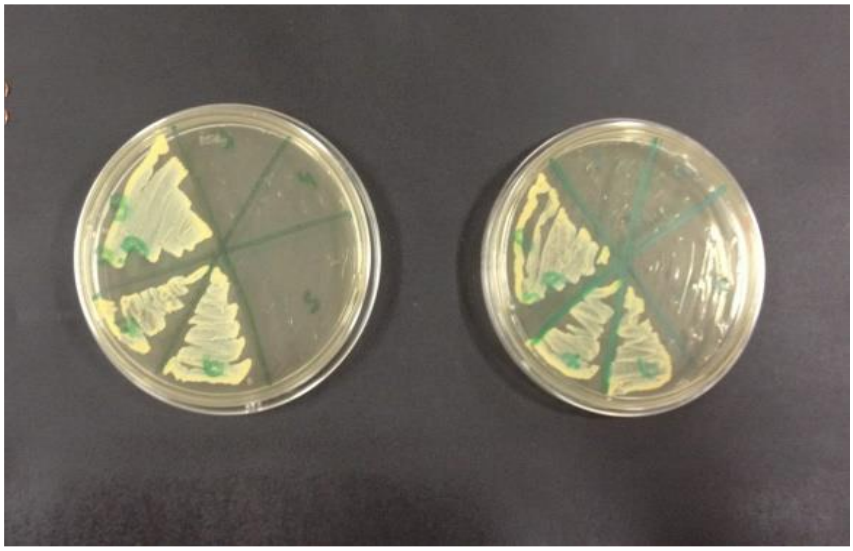


**Figura 18 -** Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *S. aureus* em placas de ágar



Já para *Staphylococcus epidermides* houve crescimento microbiano a partir do oitavo poço, indicando que a CIM do AG frente a esse microrganismo é de 46,87 µg/mL (Figura 19) e a menor concentração que não apresentou crescimento foi 93,75 µg/mL (sexto poço), indicando o valor da CBM (Figura 20).

**Figura 19** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente ao *S. epidermides*

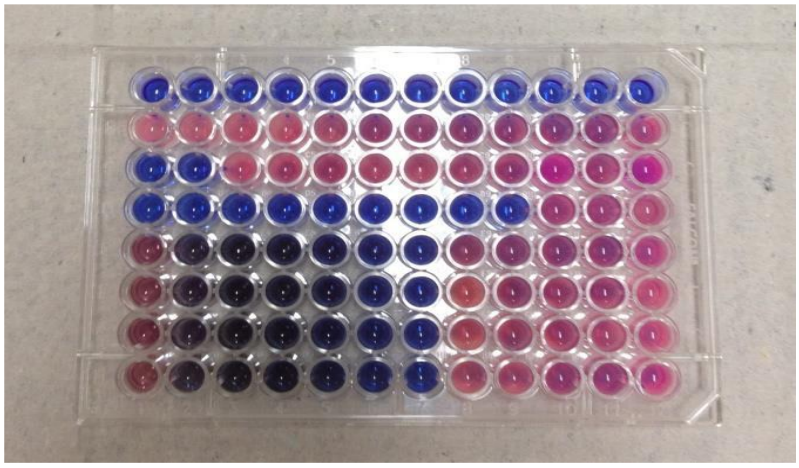


**Figura 20** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *S. epidermides* em placas de ágar

Para *Escherichia coli* houve crescimento microbiano a partir do terceiro poço, indicando que a CIM do AG frente a esse microrganismo é de 1500 µg/mL (Figura 21). Já a menor concentração que não apresentou crescimento após o subcultivo foi a do primeiro poço, isso significa que a CBM é igual a 3000,0 µg/mL (Figura 22).

**Figura 21** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente à *E. coli*

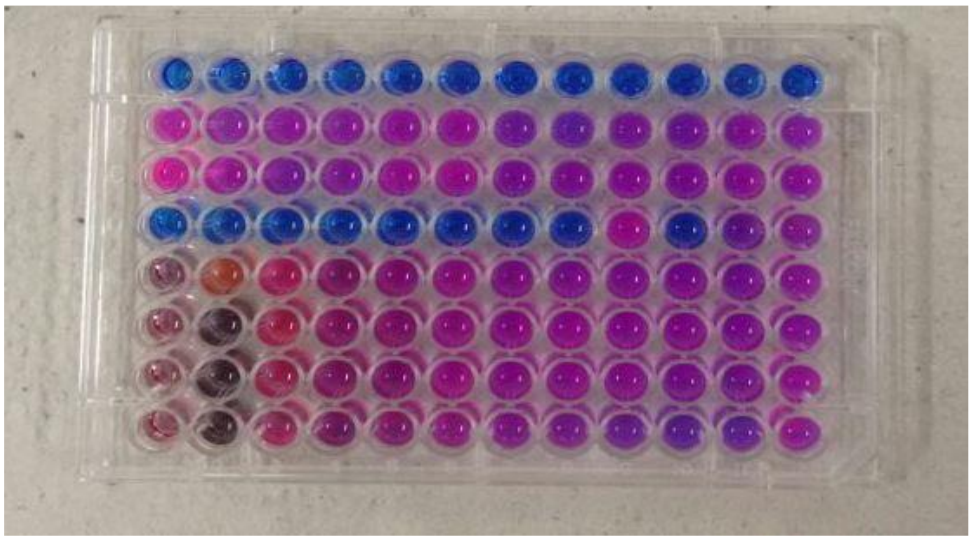
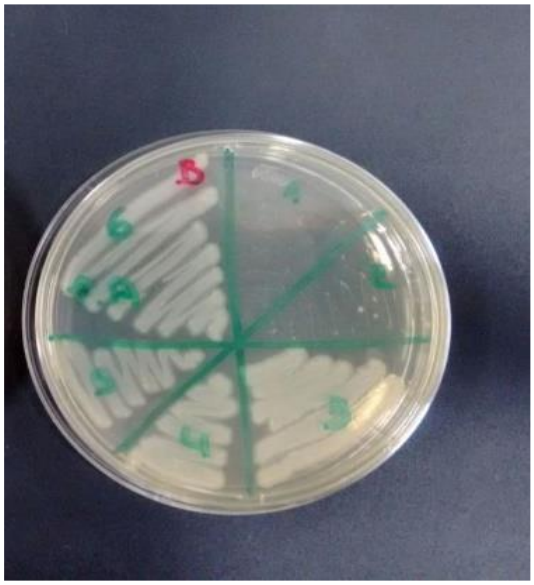


**Figura 22** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *E. coli* em placas de ágar

Para *Pseudomonas aeruginosa*, o crescimento microbiano apresentou-se inibido até o terceiro poço indicando que a CIM do AG frente a esse microrganismo é de 750 µg/ mL (Figura 23). Já a menor concentração que não apresentou crescimento após o subcultivo foi a do segundo poço, isso significa que a CBM é igual a 1500 µg/mL. (Figura 24).

**Figura 23** - Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Inibitória Mínima do AG frente à *P. aeruginosa*

**Figura 24 -** Visualização do Resultado do Ensaio da Concentração Bactericida Mínima no subcultivo de *P. aeruginosa* em placas de ágar



Conforme os resultados apresentados na Tabela 6, pode-se observar uma maior sensibilidade das bactérias Gram positivas em contanto com o ácido gálico. O microrganismo *S. aureus* apresentou CIM = CBM igual a 187,5µg/mL e o *S. epidermides* resultou em CIM igual a 46,87µg/mL e CBM igual a 93,75 µg/mL.

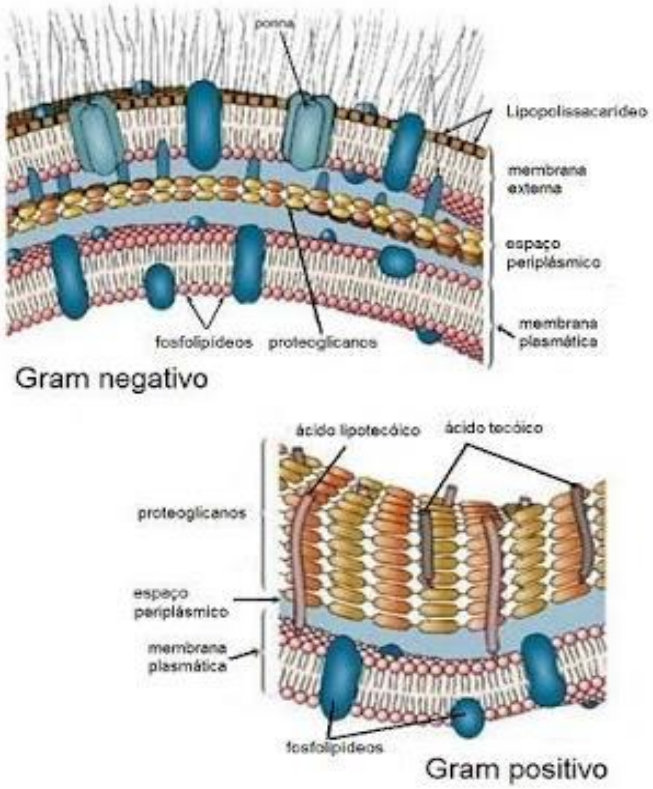
**Tabela 6 -** Valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do AG frente aos microrganismos estudados.

| **Bactéria** | **CIM** | **CBM** |
|---|---|---|
| *S. aureus* | 187,5µg/mL | 187,5µg/Ml |
| *S. epidermides* | 46,87µg/mL | 93,75µg/mL |
| *E. coli* | 1500µg/mL | 3000µg/mL |
| *P. aeruginosa* | 750µg/mL | 1500µg/mL |

Por outro lado, as bactérias Gram negativas apresentaram uma maior resistência, devido à composição da parede celular mais complexa. A *E. coli* resultou em CIM igual a 1500µg/mL e CBM igual 3000µg/mL e, por fim, a *P. aeruginosa* apresentou CIM igual a 750µg/mL e CBM igual a 1500µg/mL.

Essa diferença de resultados entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas se dá pela composição da parede celular de cada uma delas. A parede celular das bactérias gram-positivas possui uma estrutura espessa e rígida devido as suas inúmeras camadas de peptideoglicana. Já as gram-negativas são mais resistentes, pois além de possuírem poucas camadas de peptideoglicana possuem também, uma membrana externa, constituída por lipopolissacarídeos, lipoproteínas e fosfolipídios, atuando como defesa contra hospedeiros e como uma barreira para certos antibióticos (TORTORA, 2012).

**Figura 25 -** Parede celular de Gram-positivas e Gram-negativas




Fonte: CARDOSO, 2018.

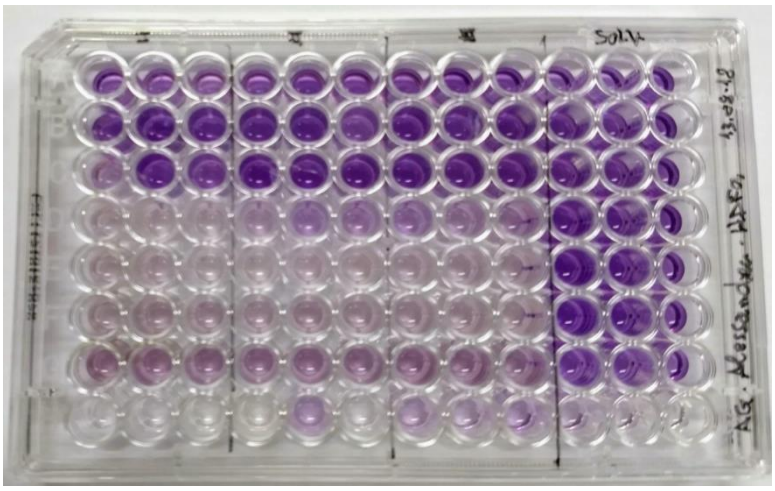
Desta maneira, as diferentes composições das paredes celulares das bactérias são capazes de justificar as diferentes concentrações inibitórias e bactericidas do AG encontradas frente às culturas testadas.

### 5.5 Citotoxicidade

O ensaio com MTT baseia-se na medida da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a qual quando ativa, é capaz de metabolizar o reagente MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) em um composto colorido denominado formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água). Dessa forma, a redução do MTT a formazan, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (ARAÚJO *et al*., 2008).

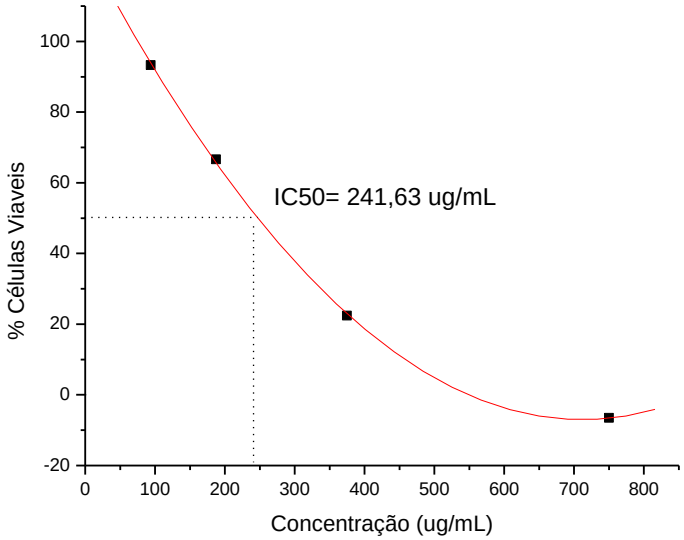
A Figura 26 mostra a placa de 96 poços após a adição do MTT, depois da formação dos cristais de formazana, onde os poços com as menores concentrações de ácido gálico possui coloração arroxeada e com o aumento de sua concentração os poços se tornam quase incolor. Os experimentos foram realizados em triplicata em três dias diferentes, portanto cada dia continha uma triplicata, preparada de forma independente, em uma mesma placa.

**Figura 26** - Cultura de células HDFa (1 a 9) e controle de solvente (10 a 12) com MTT.



Na Figura 27, estão apresentados os resultados obtidos. Uma curva dose *versus* resposta foi construída, gerada por regressão linear, para determinar a $IC_{50}$ do AG, ou seja, a concentração do produto necessária para causar a letalidade de 50% das células.

**Figura 27** - Curva dose-resposta para o tratamento das células HDFa com diferentes concentrações de AG.




Os fibroblastos foram escolhidos por atuar na derme, especificamente no tecido conjuntivo, onde são capazes de sintetizar e renovar a matriz extracelular. São células fundamentais no processo de rejuvenescimento e em processos de cicatrização (SILVA, 2016).

Os resultados são promissores, uma vez que a concentração de AG que inibiu o crescimento de 50% das células HDFa ($IC_{50}$=241,63 µg/mL) é aproximadamente 300 a 360 vezes maior que a concentração necessária para inibir 50% de radicais DPPH ($IC_{50}$ DPPH= 0,854 µg/mL) e ABTS ($IC_{50}$ ABTS= 0,674 µg/mL) respectivamente.

### 5.6 Preparação das formulações

As formulações foram preparadas conforme a composição da tabela 7 e mantidas a temperatura ambiente durante a execução dos testes.

**Tabela 7** - Composição da formulação e função dos componentes

| Matéria Prima | INCI name | Função | Composição Percentual |
|---|---|---|---|
| Álcool cetoestearílico | Cetearyl Alcohol | Agente de consistência | 8,0 |
| Cetearyl Sulfato de Sódio | SodiumCetearyl Sulfate | Tensoativo Aniônico | 1,5 |
| Estearato de octila | Ethylhexyl Stearate | Emoliente | 3,0 |
| Monoestearato de glicerila | Glyceryl Stearate | Agente de consistência | 1,0 |
| Glicerina | Glycerin | Umectante e solubilizante | 3,0 |
| EDTA dissódico | Dissodium EDTA | Sequestrante | 0,02 |
| Fenoxietanol | Phenoxyethanol | Conservante antimicrobiano | 0,5 |
| Ácido gálico | GallicAcid | - | 1,0 |
| Água q.s.p. | Aqua | | q.s.p.100,0 |

A fase oleosa é constituída por: Álcool Cetoestearílico, que tem como principal função conferir viscosidade a emulsão, possui também funções co-tensoativas, auxiliando na estabilidade da formulação; Cetearyl Sulfato de Sódio é um tensoativo aniônico, sua função é estabilizar o sistema; Estearato de Octila é um éster emoliente, confere a formulação uma excelente espalhabilidade e lubricidade; Monoestearato de Glicerila é um agente de consistência e possui também funções co-tensoativas (CORRÊA, 2012).

Já a fase aquosa é constituída por: Glicerina trata-se de um importante umectante; EDTA dissódico é sequestrante ou quelante de metais, atua como um antioxidante na formulação, além disso na concentração de 0,1% é um importante agente antimicrobiano frente a bactérias gram-negativas do tipo *Pseudomonas Aeruginosa*; Fenoxietanol um conservante de amplo espectro, compatível com a maioria das matérias primas; Ácido gálico o ativo a ser estudado e Água destilada veículo (CORRÊA, 2012).

Para o preparo da formulação a fase oleosa e a aquosa foram aquecidas até 70ºC separadamente e depois verteu-se a fase aquosa sob fase oleosa, agitando continuamente até a formação da emulsão. Na Figura 28 encontra-se a emulsão (A) e a emulsão com ácido gálico (B) após os 90 dias de estabilidade.

**Figura 28** - Emulsão com e sem o ácido gálico.

A emulsão se manteve estável sem alteração de coloração ao longo do tempo.

## 5.7 Validação do método de quantificação do AG por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A validação de um método analítico tem como principal objetivo torná-lo seguro e confiável para seu emprego, de forma a quantificar o ativo em questão em um sistema emulsionado com segurança, obtendo resultados confiáveis (BRITO *et al*., 2003).

O processo de desenvolvimento de um nova metodologia é demorado e requer paciência, dedicação, atenção e destreza da manipulação diária do analito, bem como de todos os materiais a serem utilizados. 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 e diminuição da geração de resíduos (BRITO *et al*., 2003; VALENTINI *et al*., 2007).

O principal objetivo de se chegar a uma condição ideal é de garantir a quantificação confiável do ativo, a simetria, altura e largura do pico, a diminuição de resíduos e a conservação da coluna.

Na tabela 8 encontra-se todas as condições testadas durante o desenvolvimento do método, para finalmente encontrar a condição ideal, prosseguindo com o estudo.

**Tabela 8**- Condições testadas para validação do método.

| Proporção de Fase Móvel (Etanol:Água) | Água Acidificada | Vazão (mL/min) | Coluna |
|---|---|---|---|
| 2:98 | Ácido acético 0,1% | 0,5 | C8 |
| 3:97 | Ácido acético 0,2% | 0,7 | C15 |
| 4:96 | Ácido acético 0,3% | 1 | C18 |
| 5:95 | Ácido acético 0,4% | 0,5 | C18 |
| 7:93 | Ácido acético 0,5% | 0,5 | C18 |
| 25:75 | Ácido acético 0,6% | 0,5 | C18 |
| 30:70 | Ácido acético 0,7% | 0,5 | C18 |
| 35:65 | Ácido acético 0,8% | 0,5 | C18 |
| 40:60 | Ácido acético 1% | 0,5 | C18 |
| 50:50 | Ácido fórmico 0,2% | 0,5 | C18 |
| 60:40 | Ácido fórmico 0,4% | 0,5 | C18 |
| 70:30 | Ácido fórmico 0,4% | 0,5 | C18 |
| 75:25 | Ácido fórmico 0,4% | 0,5 | C18 |
| 80:20 | Ácido fórmico 0,4% | 0,5 | C18 |

Através do estudo preliminar foi possível avaliar que a fase móvel composta por etanol: água purificada (60: 40, v/v), vazão 0,7 mL/min e pH 3 da fase móvel ajustado com ácido fórmico, foi a que atendeu todos os quesitos que garantem a quantificação confiável do ativo, como a simetria, altura e largura do pico, a diminuição de resíduos e a conservação da coluna.

BEZERRA (2012) validou uma metodologia analítica para separação e quantificação do ácido gálico utilizando HPLC com detector DAD, capaz de detectar vários comprimentos de onda simultaneamente, garantindo todos os parâmetros

necessários para considerar a metodologia validada. Na varredura espectral de 200 a 400 nm, observou que o melhor sinal cromatográfico do ácido gálico foi em 270 nm, sendo o comprimento de onda com maior absorção do composto.

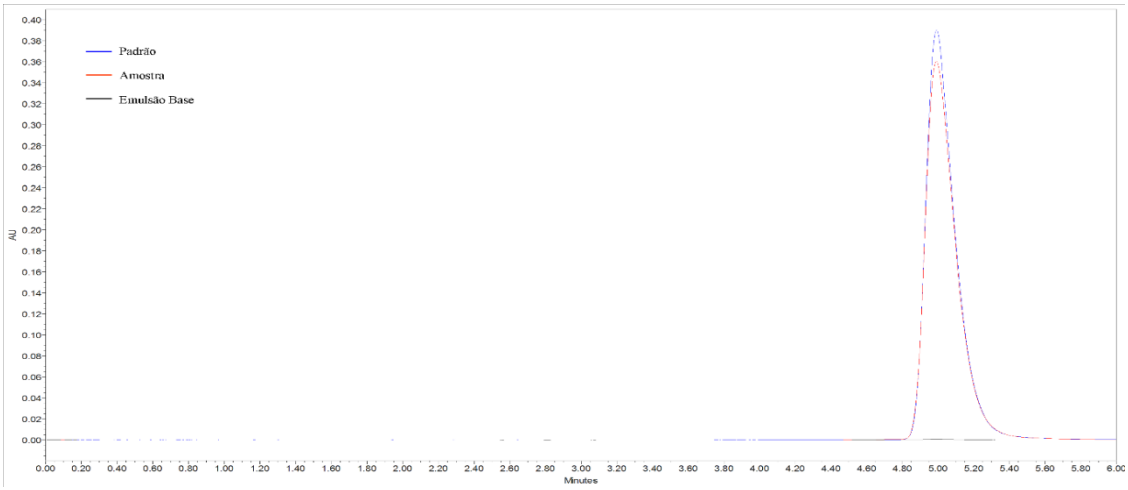
O ácido gálico possui, portanto, máxima absorção no comprimento de onda de 272,5 nm, isso se dá pela soma das absorções do grupo principal do anel benzênico e das três hidroxilas (OH), resultando em uma absorção total de 269 nm, podendo apresentar variações no valor do comprimento de onda calculado (PUBCHEM, 2018; PAVIA *et al*., 2013).

### 5.7.1 Seletividade

Foram preparadas diferentes soluções estoques, afim de garantir a seletividade do método. Preparou-se uma solução da emulsão, uma solução da emulsão com o AG e uma solução do padrão contendo somente AG para comparação. As concentrações das soluções preparadas eram de 40 µg/ mL. Após o preparo das soluções, as mesmas foram submetidas a leitura no equipamento de CLAE, de forma individual e os picos sobrepostos para uma melhor visualização e detecção de possíveis contaminantes.

A Figura 29 representa a injeção da emulsão e da emulsão com o AG, em relação ao padrão de AG a 40 µg/mL.

**Figura 29**- Cromatograma da injeção da emulsão, emulsão com AG e padrão, na concentração de 40 µg/mL diluídas na fase móvel utilizando coluna Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm, Agilent), vazão 0,5 mL/min, detecção a 270 nm.



A partir dos resultados apresentados no cromatograma podemos observar que os picos da emulsão não interfere na análise, e os da emulsão com o AG apresenta picos no mesmo tempo de retenção do AG (padrão), portanto, não interferiram na análise.

Para a condição de estresse, injetou-se diferentes soluções com concentração de 40 µg/mL do AG expostas a degradação ácida, básica, oxidativa, fotolítica e em alta temperatura. Após o período de exposição, estas soluções foram imediatamente injetadas e deste modo, foram obtidos os cromatogramas que podem ser observados nas Figuras 30 a 34.

**Figura 30** - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gálico (40 µg/mL), em HCl 0,001 M, a 80ºC.

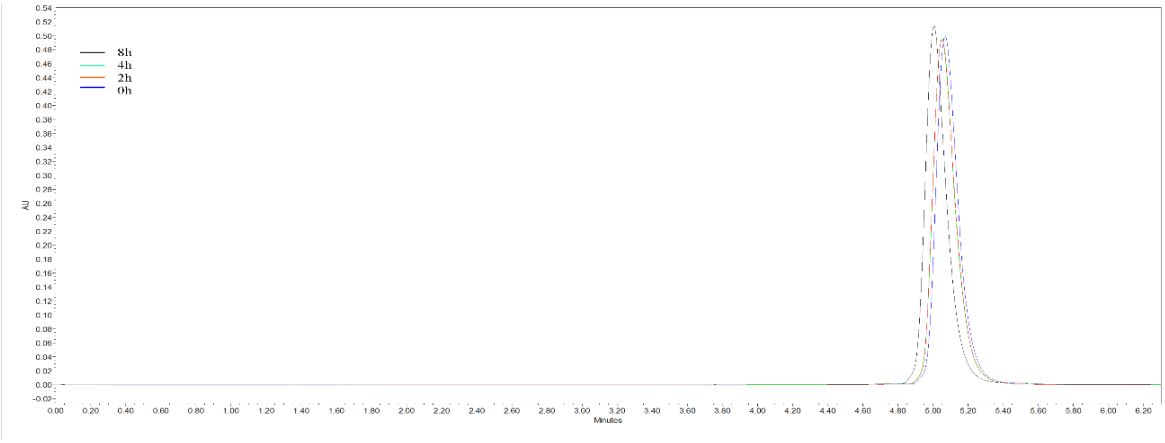



**Figura 31** - Cromatograma obtido por CLAE para solução de ácido gálico (40 µg/mL), em NaOH 0,001 M, a 80ºC.

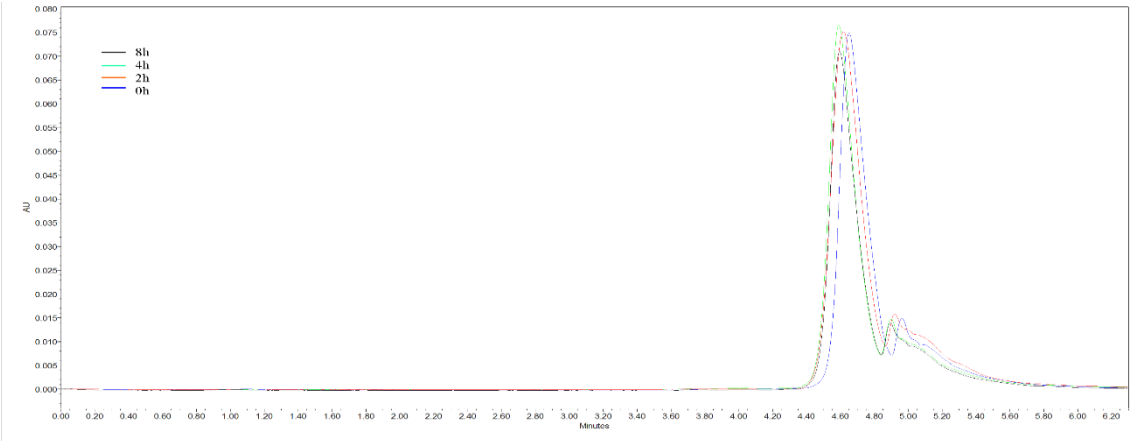


**Figura 32**- Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 µg/mL), em água, a 80ºC.

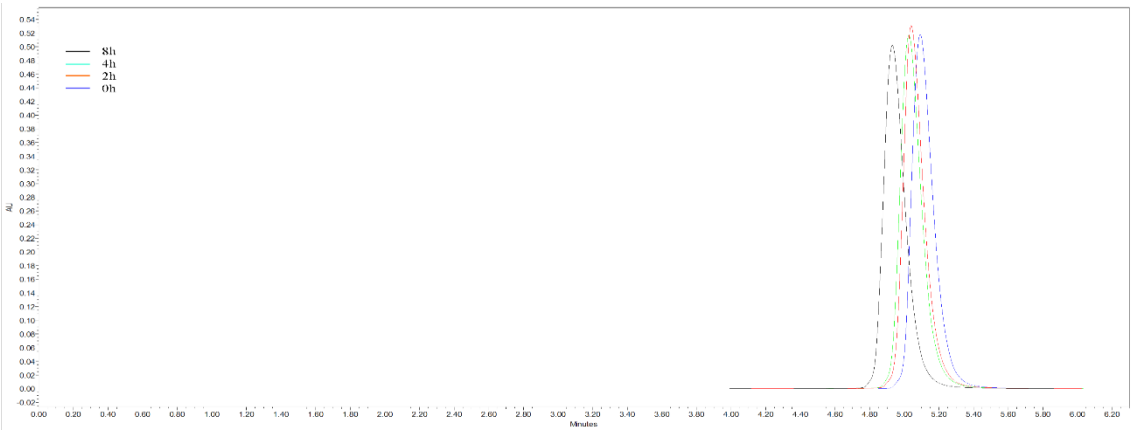



**Figura 33** - Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 µg/mL), em luz ultravioleta.

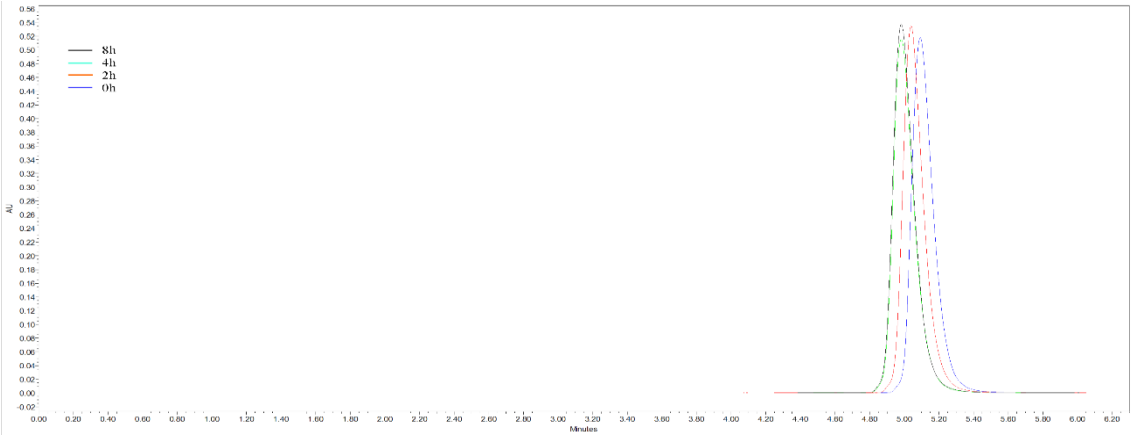
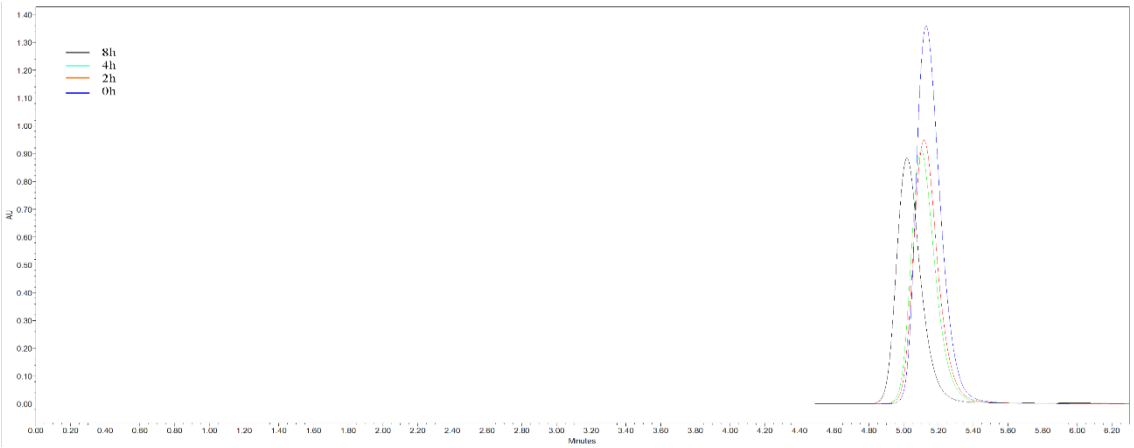



**Figura 34** - Cromatograma obtidos por CLAE para solução de ácido gálico (40 µg/mL), em $H_2O_2$ a 80ºC.




No teste de estresse, notou-se que não existem interferentes no pico de análise do AG, ou seja, não foi observado nenhum pico próximo ao tempo de retenção do

padrão, porém pode ser observado em decorrência da degradação uma diminuição do pico principal e aparecimento de novos picos na degradação com NaOH, e um aumento do pico principal na condição com $H_2O_2$.

### 5.7.2 Linearidade

Na Tabela 9 apresenta-se os valores das áreas obtidas para a curva analítica de AG.

**Tabela 9** - Valores das áreas referentes ao pico de ácido gálico para obtenção da curva analítica do método cromatográfico.

| Concentração final µg/mL | 1ª curva | 2ª curva | 3ª curva | Média | DP | DPR (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | 813683,3330 | 829911,6667 | 860011,0000 | 834535,3332 | 23507,3797 | 2,57 |
| 20 | 1614329,0000 | 1713840,6667 | 1652813,0000 | 1660327,556 | 50179,621 | 2,68 |
| 30 | 2500727,0000 | 2451974,0000 | 2477218,3333 | 2476639,778 | 24381,6488 | 2,13 |
| 40 | 3291221,6667 | 3431267,6667 | 3222848,3333 | 3315112,556 | 106243,755 | 2,03 |
| 50 | 4114803,6667 | 4200781,6667 | 4132428,0000 | 4149337,778 | 45414,8606 | 2,46 |
| 60 | 4922906,0000 | 4955129,3333 | 4910017,3333 | 4929350,889 | 23236,2988 | 0,89 |

DP: desvio padrão; DPR: Desvio Padrão Relativo.

A curva analítica do AG (Figura 35) nas 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= 82227x + 16259 com $R^2$ = 0,9999. O coeficiente de correlação foi satisfatório indicando excelente correlação linear entre os dados analisados.

A figura 36 apresenta o cromotograma com os picos das concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL do ácido gálico.

**Figura 35** - Curva analítica do AG obtida pelo método cromatográfico, utilizando como solvente a fase móvel.

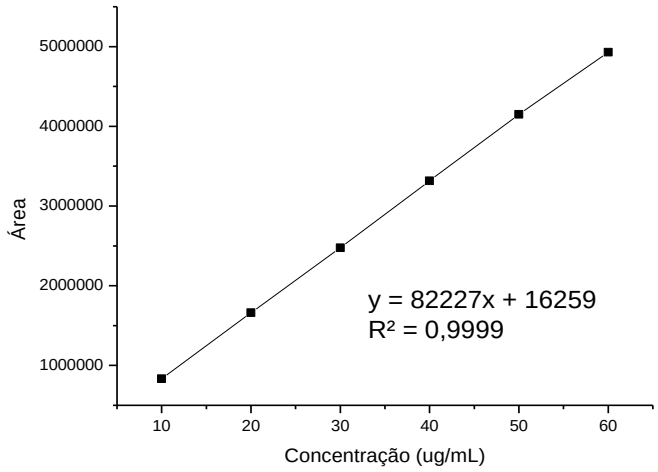
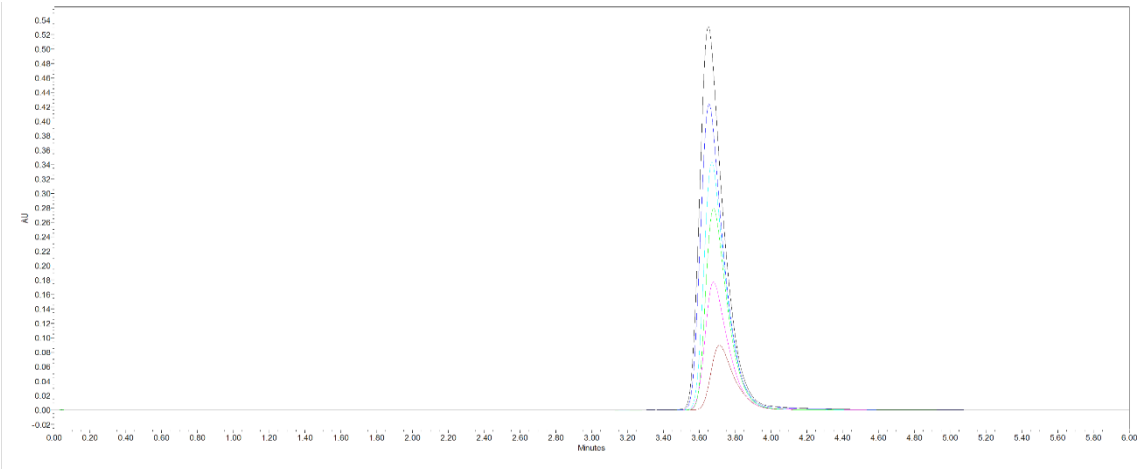



**Figura 36** - Cromatograma do ácido gálico em concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 µg/mL, obtidas pelo CLAE a 270 nm.

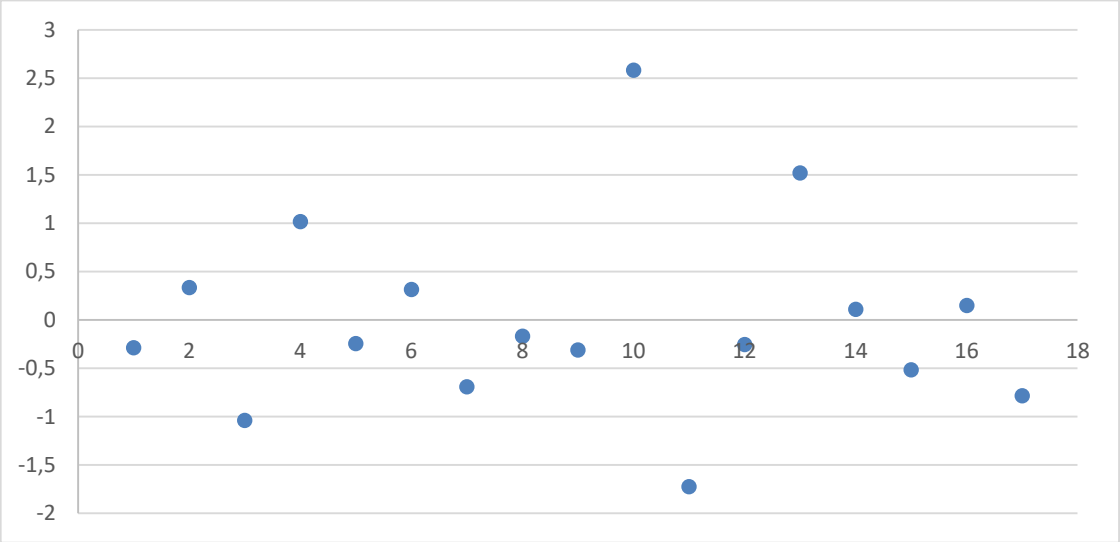


Após a construção da curva analítica e a constatação de que os valores apresentaram-se lineares pelo $R^2$ encontrado ($R^2$: 0,9999) foi realizada a análise de variância (ANOVA) na Tabela 10, para os respectivos valores e feita a análise residual através do gráfico de resíduos apresentado na Figura 37.

**Tabela 10** - Análise de Variância (ANOVA) para os valores da Curva Analítica.

| FONTES DE VARIAÇÃO | GL | SQ | VARIÂNCIA | F calc | Ftab (0,05) |
|---|---|---|---|---|---|
| ENTRE DOSES | 5 | 35500180941602,50000 | 7100036188320,51000 | 2426,64 | 3,11 |
| REGRESSÃO LINEAR | 1 | 35500180941602,50000 | 35500180941602,50000 | 12133,20 | 4,75 |
| DESVIO LINEARIDADE | 4 | 0,00003 | 0,0000075 | 2,56E-15 | 3,26 |
| DENTRO (RESÍDUO) | 12 | 35110453524,4687000 | 2925871127,039060000 | - | - |
| TOTAL | 17 | 35535291395127,00000 | - | - | - |

**Figura 37** - Gráfico de Resíduos




Na análise da variância (ANOVA) foi possível constatar que não houve variação significativa entre as doses, uma vez que F calculado (2426,64) > F tabelado (3,11), o desvio da linearidade também não foi significativo, pois F calculado (2,56E-15) < F tabelado (3,26) e a análise demonstrou que a regressão linear foi significativa, visto que F calculado (12133,20) > F tabelado (4,75).

O gráfico de dispersão dos resíduos apresentou resultados favoráveis, pois os pontos não ultrapassaram os valores entre 2 e -2 no eixo vertical, obtendo somente um outlier, ou seja uma única observação que descorda de todos os outros, garantindo assim a linearidade do método.

### 5.7.3 Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetibilidade, sendo que o desvio padrão relativo entre as medidas do analista 1 foi de 1,7605% e do analista 2 foi de 1,7369% (Tabela 11). Os resultados demonstram a concordância dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

**Tabela 11** - Valores das áreas referentes ao pico de ácido gálico no estudo da repetibilidade e precisão intermediária do método.

| 40µg/mL | Área1 | Área2 | Área3 | Área4 | Área5 | Área6 | Área7 | Média | DPR% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Analista1 | 3219124 | 3327464 | 3342889 | 3298192 | 3402595 | 3307931 | 3265204 | 3309057 | 1,7605 |
| Analista2 | 3402862 | 3362947 | 3282745 | 3321972 | 3310397 | 3273038 | 3422134 | 3339442 | 1,7369 |

DPR: Desvio Padrão Relativo

Na Tabela 12, encontra-se o teste estatístico utilizado para comprovação da precisão do método proposto, o teste F. Com base nos resultados apresentados pode-se concluir que não houve diferença significativa entre os valores de absorbância encontrados entre os dois analistas, já que o $F_{cal}$ 1,008 < $F_{tab}$ 4,28 e o $P_{valor}$ 0,49 > 0,05 comprovando a precisão intermediária do método proposto, frente ao parâmetro avaliado.

**Tabela 12** - Teste F da precisão interanalista do método de CLAE.

| | Variável 1 | Variável 2 |
|---|---|---|
| Média | 3309057 | 3339442,143 |
| Variância | 3393854253 | 3364233706 |
| Observações | 7 | 7 |
| Gl | 6 | 6 |
| F | 1,008804545 | |
| P(F<=f) uni-caudal | 0,495891011 | |
| F crítico uni-caudal | 4,283865714 | |

### 5.7.4 Limite de detecção

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 13 na equação 4, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de detectar é 0,95370 µg/mL de AG.

**Tabela 13** - Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do AG por CLAE.

| | Intercepção com o eixo Y | Inclinação Curva Analítica |
|---|---|---|
| Curva 1 | -7554,4 | 82395 |
| Curva 2 | 23864 | 83046 |
| Curva 3 | 39105 | 81527 |
| Média | 18471,533 | 82322,667 |
| Desvio Padrão | 23792,518 | 762,07895 |

### 5.7.5 Limite de quantificação

Aplicando-se os valores apresentados na Tabela 13 na Equação 5, foi encontrado que a concentração mínima que o método analítico é capaz de quantificar é 2,89 µg/mL de AG.

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 2,89 µg/mL, a concentração inicial utilizada na curva analítica é de 10ug/mL, portanto é um valor que pode ser detectado e quantificado.

### 5.7.6 Exatidão

Na tabela 14 encontra-se os resultados do teste, onde a recuperação média foi de 101,41% e não houve variações maiores que 5%, demonstrando assim a proximidade entre as concentrações teóricas e experimentais, garantindo a exatidão do método.

**Tabela 14 -** Valores obtidos no teste de recuperação do AG na emulsão utilizando o método por CLAE.

| | AG adicionado (µg/mL) | AG recuperado (µg/mL) | Recuperação (%) | Recuperação Média (%) | DPR |
|---|---|---|---|---|---|
| R1 | 32 | 32,10 | 99,299 | | |
| R2 | 40 | 40,40 | 101,82 | 101,41 | 1,94 |
| R3 | 48 | 49,41 | 103,11 | | |

DPR: desvio padrão relativo

### 5.7.7 Robustez

A robustez foi avaliada, modificando-se a temperatura da coluna, o comprimento de onda, vazão de fase móvel, proporção etanol: água na fase móvel e volume de injeção.

De acordo com os resultados obtidos na tabela 15, o método se apresentou robusto, uma vez que os valores do teor após as modificações não apresentaram valores de desvio padrão relativo (DPR) maiores que 5%. Isso indica, que pequenas alterações no método utilizado não provocam variações significativas nos resultados obtidos.

**Tabela 15 -** Valores obtidos na avaliação da robustez do método por CLAE para análise de AG.

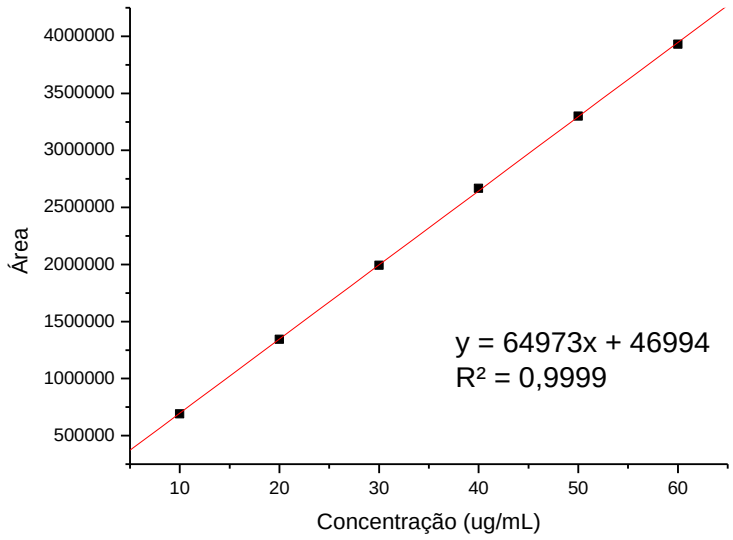
| Variável | Faixa investigada | AG (%) | DPR (%) |
|---|---|---|---|
| Comprimento de onda (nm) | 268 | 100,88 | 1,96 |
| | 270 | 100 | |
| | 272 | 103,81 | |
| Vazão da Fase móvel (mL/min) | 0,45 | 101,52 | 1,83 |
| | 0,50 | 100 | |
| | 0,55 | 97,88 | |
| Proporção etanol: água na fase móvel | 65:35 | 103,73 | 2,47 |
| | 60: 40 | 100 | |
| | 55: 45 | 104,86 | |
| Volume de injeção (μL) | 8 | 97,20 | 3,59 |
| | 10 | 100 | |
| | 12 | 104,36 | |
| Temperatura | 23 | 105,11 | 2,64 |
| | 25 | 100 | |
| | 27 | 104,18 | |

DPR: desvio padrão relativo

### 5.7.8 Curva analítica com solvente diferente

A avaliação da liberação e permeação do AG das formulações, foram feitas utilizando como solvente uma solução de tampão fosfato (pH = 5,5) e etanol, 1:1. A Figura 38 apresenta a curva analítica construída os solventes utilizados nos estudos.

**Figura 38**- Curva analítica para quantificação do AG utilizando tampão fosfato pH 5,5 + etanol como sistema solvente.




## 5.8 Avaliação da estabilidade

A primeira avaliação foi realizada após 24 horas da manipulação da emulsão, para que o produto adquirisse viscosidade e consistência final (CORRÊA, 2012; ISSAC *et al*., 2008).

O objetivo do estudo de estabilidade é de garantir a qualidade e as características do produto em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais e de estresse a que foi submetido (SPAGNOL, 2014).

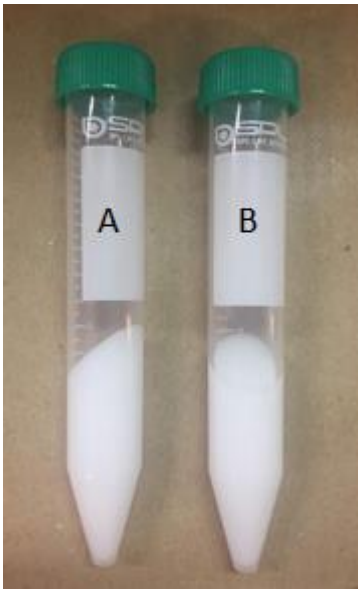
O estudo foi realizado conforme preconiza o Guia de Estabilidade de Estudos Produtos Cosméticos da ANVISA, Isaac *et al*. (2008) e Farmacopeia Brasileira 5. ed. (2010).

### 5.8.1 Teste de centrifugação

Este teste fornece informações prévias e artificiais sobre a estabilidade, pois a não ocorrência de separação de fases não assegura sua estabilidade, somente indica que o produto pode ser submetido, sem necessidade de reformulação (ISAAC *et al*., 2008).

Após a centrifugação as amostras não sofreram nenhuma alteração, indicando assim a estabilidade da formulação, como pode ser observado na Figura 39, prosseguindo o estudo de estabilidade.

**Figura 39** – Foto da emulsão (A) e emulsão com AG (B) após o teste de centrifugação.




### 5.8.2. Avaliação Macroscópica

Conforme apresentado na Figura 40, a emulsão (A) se manteve inalterada, porém a emulsão com o AG (B) apresentou um leve amarelamento depois dos 90 dias nas diferentes condições de temperatura, 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC.

**Figura 40 -** Foto da emulsão (A) e emulsão com AG (B) após os 90 dias do teste de estabilidade.

### 5.8.3. Determinação do pH

Quanto ao valor de pH das formulações, foi possível observar uma pequena variação na condição de 45ºC da emulsão e na condição de ciclo da emulsão com o ácido gálico, porém não foi observada variação significativa do pH na emulsão (6,81 ± 0,14) e na emulsão com AG (3,43 ± 0,04) ao longo do tempo (90 dias), conforme apresentado nas Figuras 41 e 42. As formulações com AG demonstraram um menor valor de pH devido ao seu caráter ácido.

**Figura 41** – Representa os valores de pH da emulsão, submetida a diferentes condições de temperatura 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante 90 dias de análise.

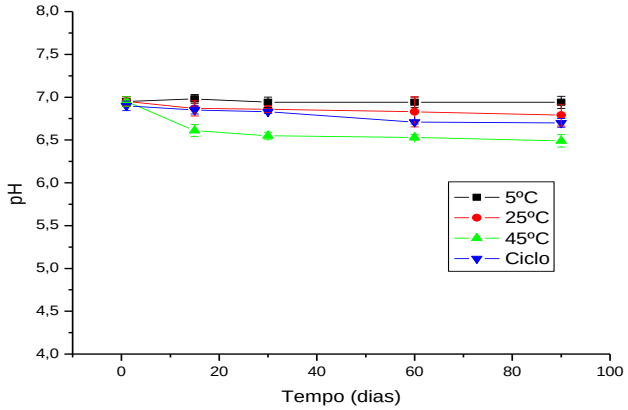
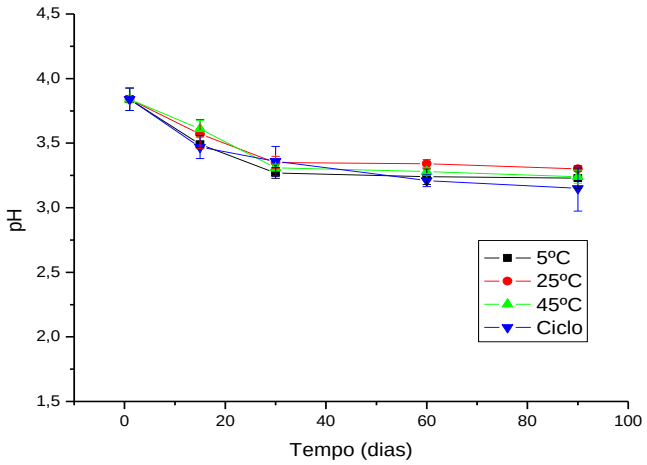


**Figura 42** - Representa os valores de pH da emulsão com AG, submetida a diferentes condições de temperatura 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante 90 dias de análise.




### 5.8.4 Determinação da densidade

Os resultados (Figuras 43 e 44) demonstraram que não houve variação significativa da densidade da emulsão com e sem o AG (0,99 ± 0,005) ao longo dos 90 dias, nas condições estudadas (5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC).

**Figura 43** – Representa os valores da densidade da emulsão mantida em diferentes temperaturas 5ºC, 25ºC, 45ºC e-5ºC/45ºC, durante os 90 dias de avaliação da estabilidade.

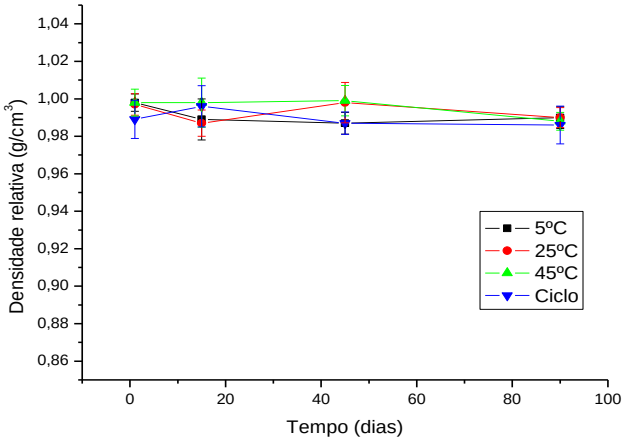
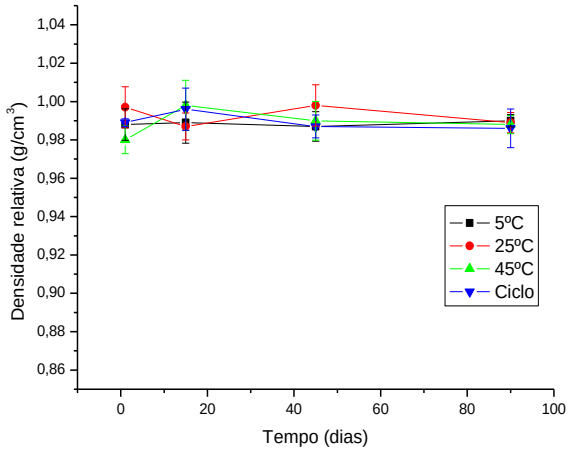


**Figura 44** - Representa os valores da densidade da emulsão com AG mantida em diferentes temperaturas 5ºC, 25ºC, 45ºC e -5ºC/45ºC, durante os 90 dias de avaliação da estabilidade.




### 5.8.5 Determinação do teor de AG por Cromatografia Liquida de Alta Eficiência.

A estabilidade do ativo presente na emulsão também foi avaliada e os resultados estão apresentados na Figura 45 e Tabela 16. Essa avaliação é importante para garantir a eficácia do produto.

Para análise do teor de ativo, foram pesados 0,1g da emulsão contendo 1% de AG, o que corresponde a 1000 µg/mL de AG, foram diluídos em 10 mL de solução de etanol: água (60:40) pH 3 acidificado com ácido fórmico, portanto a concentração teórica de AG nesta solução foi de 100µg/mL. A partir dessa solução foram tomados 4 mL obtendo uma concentração final de 40 µg /mL. As concentrações experimentais obtidas ao longo do tempo nas diversas condições de estresse estão apresentadas na Figura 45 e Tabela 16.

**Figura 45 -** Gráfico das concentrações experimentais (µg/mL) e o desvio padrão de AG na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas.

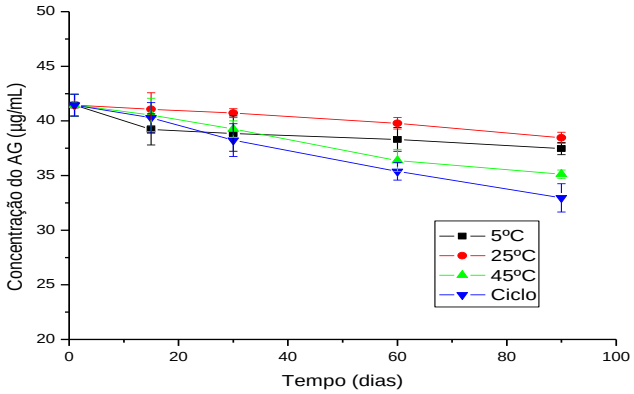



**Tabela 16 -** Média das concentrações experimentais (µg/mL) e o desvio padrão de AG na emulsão durante o estudo de estabilidade nas condições de estresse estudadas.

| | 5°C | 25°C | 45°C | 5°C/45°C |
|---|---|---|---|---|
| Dia 1 | 41,44 ± 1,0 [a] | 41,44 ± 1,0[a] | 41,44 ± 1,0[a] | 41,44 ± 1,0[a] |
| Dia 15 | 39,22 ± 1,43[a,b] | 41,07 ± 1,50[a] | 40,55 ± 1,52[a] | 40,28 ± 1,38[a] |
| Dia 30 | 38,84 ± 1,62[a,b] | 40,71±0,41[a,b] | 39,25 ± 0,75[a] | 38,24 ± 1,56[a,b] |
| Dia 60 | 38,31 ± 1,08[a,b] | 39,78±0,53[a,b] | 36,38 ± 1,02[b] | 35,38 ± 0,83[b,c] |
| Dia 90 | 37,47 ± 0,56[b] | 38,46 ± 0,5[b] | 35,13 ± 0,4[b] | 32,96 ± 1,32[c] |

[a,b,c] Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Avaliando a análise estatística (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey ($p<0,05$), realizada para as diferentes condições de estresse (5ºC, 25ºC, 45ºC e 5ºC/45ºC) e entre os diferentes dias de análise (Tabela 15), pode-se afirmar que houve variação na concentração de AG, em todas as condições nos últimos dias de estabilidade.

Nas condições de 5ºC e 25ºC a variação significativa ocorreu no nonagésimo dia de estabilidade, já nas condições de 45ºC e 5ºC/45ºC a partir do sexagésimo dia.

## 5.9 Avaliação do perfil de liberação do AG a partir da formulação, permeação e retenção cutâneas do AG

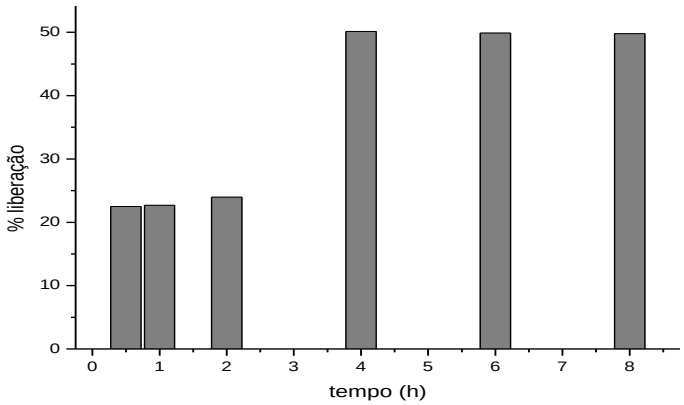
Os ensaios de liberação foram realizados com a emulsão contendo o AG nas concentrações de 1%, com o intuito de avaliar se a concentração e/ou a formulação influencia no perfil de liberação do ativo, bem como nos ensaios de permeação e retenção cutânea.

O tampão selecionado para compor a solução receptora foi o de pH 5,5, pois não ocorreu alteração nos valores de área durante as 8 horas de estudo, diferente do tampão pH 7,4, que com o passar do tempo houve uma diminuição significativa nos valores de área, indicando degradação do composto.

### 5.9.1 Avaliação da liberação do AG contido na emulsão

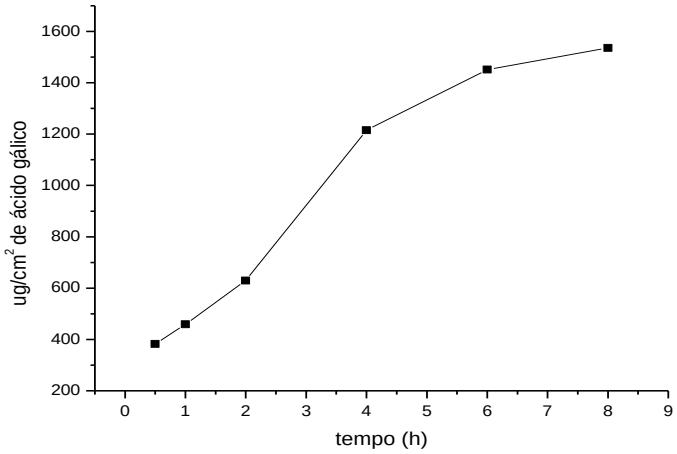
A fase receptora coletada das células de Franz, foram injetadas no equipamento de CLAE e quantificou-se o ativo ali presente. A partir desses resultados pode-se calcular a concentração de AG presente na solução, liberada da emulsão. O gráfico da porcentagem de liberação ao longo do tempo foi construído a partir dos valores obtidos nos ensaios com a emulsão, conforme mostra a Figura 46.

**Figura 46** - Porcentagem de liberação do ácido gálico da emulsão contendo 1% do ativo nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.




A partir destes resultados, pode-se verificar a quantidade de ativo liberado da formulação por unidade de área de difusão, conforme demonstra a Figura 47. A área de difusão da célula de Franz do equipamento utilizado é de 1,77 $cm^2$.

**Figura 47** - Quantidade em µg de ácido gálico liberado da emulsão contendo 1% do ativo por unidade de área (cm2) nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 h.




Com base nos dados obtidos pelo ensaio, pode-se afirmar que a emulsão é capaz de liberar o AG nela contido, permitindo que haja o contato do mesmo com a pele, pois quase 50% de ativo foi liberado em 4h.

Para avaliação do perfil cinético de liberação do AG a partir da emulsão, foram utilizados três modelos matemáticos, o de 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 AG liberado (SPAGNOL, 2014).

A cinética de ordem zero é demonstrada quando existe uma relação linear, entre a quantidade de ativo liberada e o intervalo de tempo; já os modelos de primeira ordem e o de Higuchi indica que a quantidade de ativo remanescente não é constante em função do tempo (SPRICIGO, 2006). Seleciona-se o modelo mais adequado através do valor do coeficiente de correlação ($r^2$) obtido a partir da linearização dos diferentes perfis de liberação, os quais estão apresentados nas Figuras 48 a 50 e na Tabela 17.

**Figura 48** – Modelo Matemático de Zero Ordem aplicado para interpretação da cinética de liberação.

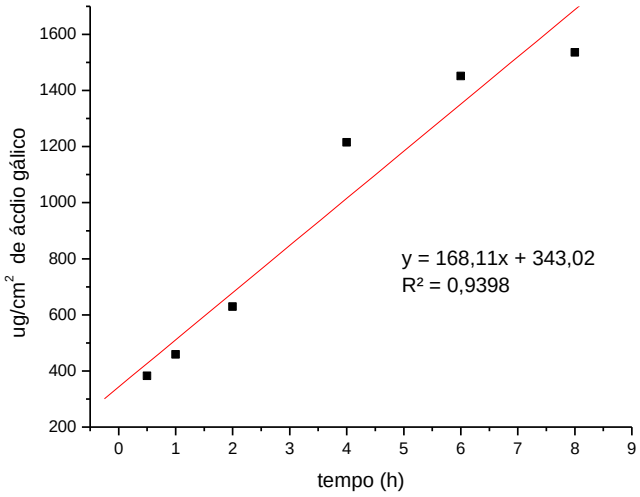



**Figura 49** - Modelo Matemático de Primeira Ordem aplicado para interpretação da cinética de liberação.

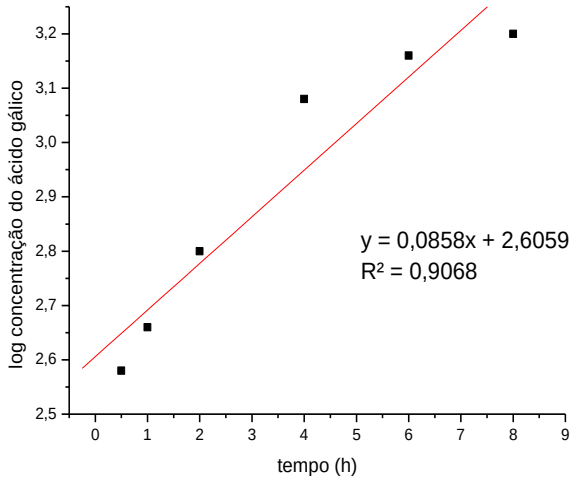


**Figura 50** – Modelo Matemático de Higuchi aplicado para interpretação da cinética de liberação.

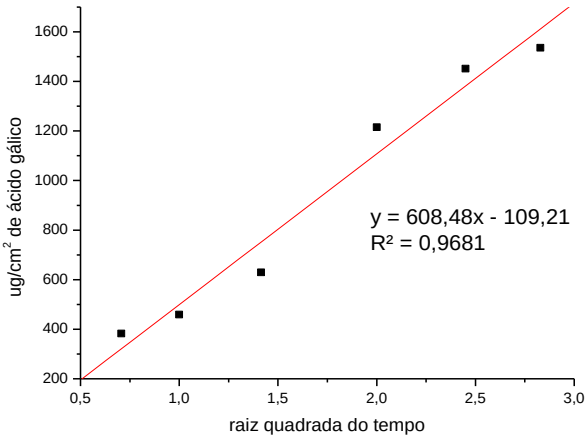



**Tabela 17** - Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação da emulsão contendo 1% de ácido gálico.

| Modelos Matemáticos | 1% |
|---|---|
| Zero ordem | 0,9398 |
| Primeira ordem | 0,9068 |
| Modelo de Higuchi | 0,9681 |

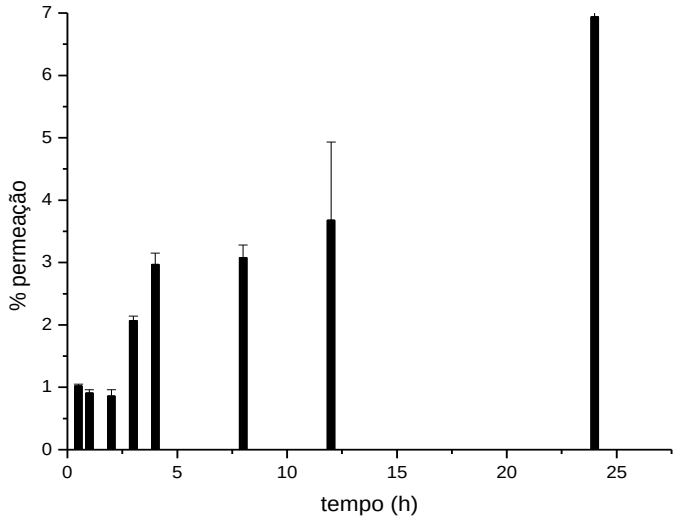
O modelo mais adequado que descreve o perfil cinético de liberação do ativo da formulação, é o de Higuchi, onde ele descreve o mecanismo de liberação dos fármacos como um processo de difusão baseado na lei de Fick, estando dependente da raiz quadrada do tempo (LOPES *et al*., 2005).

O quanto o ativo penetra ou permeia vai depender da capacidade em atravessar a camada córnea da pele e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula (MENDONÇA *et al*., 2009).

### 5.9.2 Avaliação da permeação cutânea do AG contido na emulsão

O ensaio de permeação foi conduzido repetindo a metodologia do ensaio de liberação, onde coletou-se a fase receptora nas células de Franz e quantificou-se o ativo por CLAE. A partir dos resultados obtidos construiu-se o gráfico da Figura 51.

**Figura 51** - Porcentagem de permeação do ácido gálico da formulação nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 e 24 h.




A concentração de AG permeado presente na solução receptora no tempo de 24h foi de 6,94%, considerou-se 3000 µg como 100%, calcula-se que a concentração de AG liberado seja de 208,2 µg, e em 7 mL de solução receptora corresponde a 29,74 µg/mL.

De acordo com os estudos de citotoxicidade realizados em células HDFa, a concentração de 241,63 µg/mL provocou, após 24h de exposição, 50% de morte celular, portanto a concentração permeada está bem abaixo da concentração considerada tóxica para célula em estudo.

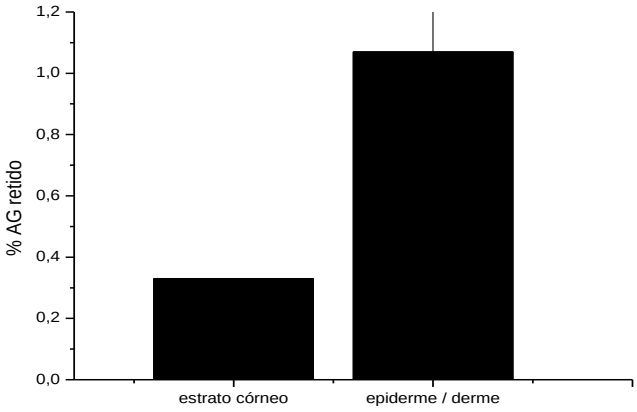
Esses resultados comprovam que a concentração de 1% de AG na emulsão é adequada para a realização dos estudos subsequentes já que apresentou valor de permeação em 24 h bem abaixo da concentração tóxica às células.

### 5.9.3 Avaliação da retenção no estrato córneo, epiderme e derme do AG contido na emulsão.

O único solvente testado para a extração do ativo nas fitas adesivas que gerou um pico dentro das condições ideias (simetria, altura, largura, dentre outros) foi a proporção da fase móvel utilizada no método validado por CLAE, etanol: agua (60:40) pH 3 acidificado com ácido fórmico. O metanol, etanol e a acetonitrila apresentaram picos largos e com tempo de retenção variados.

Neste ensaio, a quantidade de AG retido no estrato córneo, epiderme e derme foi passível de detecção e quantificação pelo método analítico validado utilizando CLAE e o gráfico da Figura 52 foi construído através dos resultados obtidos após 24 horas de exposição da formulação contendo 1% de AG na pele.

**Figura 52** - Porcentagem de ácido gálico retido no estrato córneo e na epiderme/derme na formulação.




A porcentagem de AG retido na epiderme e derme a partir da emulsão foi de 1,07%. Então, considerando 3000 µg como 100%, a quantidade retida em 1,07% foi de 32,11 µg que foram diluídos em 4 mL de fase móvel, obtendo-se a concentração de AG na solução igual a 8,03 µg/mL.

Substituindo esses valores de concentração nas equações da reta apresentadas na avaliação da porcentagem de inibição dos radicais DPPH e ABTS (Figura 7 e 11), foi obtido que a concentração de AG retida na emulsão provoca mais de 100% de inibição dos radicais.

Em relação a atividade despigmentante, a quantidade de ácido gálico que permeia a pele não promove ação antimelanogênica, visto que a quantidade necessária deveria ser 1640µg/mL, por outro lado não causa nenhum dano para células em estudo, pois a concentração necessária para se ter essa ação é toxica para célula HDFa.

No estudo da atividade antimicrobiana, pode-se concluir que os valores utilizados de AG para bactérias gram-positivas não são citotóxicos, porém para bactérias gram-negativas a quantidade de ativo utilizada para promover essa ação, provoca mais de 50% da morte celular de HDFa.

Levando em consideração, que a concentração retida (8,03 µg/mL) é cerca de 30 vezes menor que a concentração de 241,63 µg/mL do ensaio de citotoxicidade que provocou após 24h de exposição 50% de morte celular, o resultado obtido é satisfatório, pois de forma geral, obteve-se ação antioxidante na porcentagem utilizada na emulsão de 1%, sem causar danos para células.

Foi observada uma elevada liberação do ativo da formulação, o que colabora para a eficiência do produto, uma baixa porcentagem de permeação do ativo, o que caracteriza um cosmético e a maior quantidade permeada foi capaz de permanecer retida na epiderme/derme, local onde deve ter ação.

Para avaliação da permeação do ácido gálico na pele, Marti-Mestres e colaboradores (2007), utilizaram pele suína, comprovando através do perfil de permeação, da avaliação dos parâmetros de fluxo e fotos utilizando microscopia de fluorescência, que o composto é capaz de ultrapassar o estrato córneo.

Santos (2016) corrobora com os mesmos resultados, seu estudo demonstrou a capacidade de permeação do ácido gálico na pele a partir de um sistema nanoencapsulado para utilização tópica, obtendo resultados promissores, visto que a maior quantidade de ácido gálico se manteve retida na derme, obtendo uma boa permeação devido ao sistema no qual foi incorporado para permeação.

O ácido gálico deve atuar na epiderme/derme pois sua ação antioxidante e despigmentante deverá proteger a pele contra fatores externos, tais como radiação solar que atua diretamente nessas camadas da pele. Dentre os efeitos causados pelos raios UV na epiderme/derme, um deles é a produção de radicais livres pelos raios UVA que atuam nas metaloproteinases I, II e III alterando a síntese de colágeno na derme, além disso o excesso de radicais livres na epiderme pode ocasionar manchas hipercrômicas (SCOTTI, 2002).

# 6 CONCLUSÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

COUTO, A.; NICOLAU, R.A. **Estudo do envelhecimento da derme e epiderme - revisão bibliográfica.** Disponível em: <http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2007/trabalhos/saude/epg/EPG00392_01O.pdf >. Acesso em: jan., 2019.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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