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

Wagner Soares Ramos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP
2019

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

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

Wagner Soares Ramos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa

Araraquara - SP
2019

Ramos, Wagner Soares.

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

92 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

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

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

CAPES: 33004030078P6
Esta Ficha não pode ser modificada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 22

3 OBJETIVOS 25

4 MATERIAL E MÉTODOS 26

4.1 Reagentes e matérias-primas 26

4.2 Materiais biológicos 26

4.3 Equipamentos, vidrarias e acessórios 27

4.4 Métodos 28

4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico 28

4.4.1.1 Preparo dos reagentes e da solução estoque de APC 29

4.4.1.2 Preparo dos meios de cultura DMEM e MEM 29

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

4.4.1.4 Determinação do potencial citotóxico do APC 29

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

4.4.1.5.1 Obtenção e preparo dos ovos embrionados 33

4.4.1.5.2 Preparo dos reagentes 33

4.4.1.5.3 Execução do ensaio 33

4.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana 34

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

4.4.2.2 Padronização da suspensão de células bacterianas 35

4.4.2.3 Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima do APC 36

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

4.4.3.1 Especificidade e Seletividade 38

4.4.3.2 Linearidade 39

4.4.3.2.1 Linearidade em Etanol 39

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

4.4.3.2.3 Linearidade em Metanol 41

4.4.3.3 Precisão 41

4.4.3.4 Limite de Detecção 42

4.4.3.5 Limite de Quantificação 42

4.4.3.6 Exatidão 43

4.4.3.7 Robustez 43

4.4.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas 44

4.4.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação 48

4.4.4.1.1 Desenvolvimento de processo em 2 fases 48

4.4.4.1.2 Desenvolvimento de processo em 1 fase 49

4.4.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada 50

4.4.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões 51

4.4.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões 51

4.4.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões 52

4.4.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões 52

4.4.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões 52

4.4.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões 53

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

4.4.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC 54

4.4.5.2 Avaliação da permeação do APC 55

4.4.5.3 Avaliação da retenção do APC 56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58

5.1 Avaliação do potencial citotóxico 58

5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares HDFa e HaCat 58

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

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana 61

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

5.3.1 Especificidade e Seletividade 63

5.3.2 Linearidade 65

5.3.2.1 Linearidade em Etanol 65

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

5.3.2.3 Linearidade em Metanol 69

5.3.3 Precisão 71

5.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação 71

5.3.5 Exatidão 72

5.3.6 Robustez 72

5.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas 73

5.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação 73

5.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada 74

5.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões 74

5.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões 74

5.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões 77

5.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões 77

5.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões 81

5.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões 83

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

5.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC 84

5.5.2 Avaliação da permeação e retenção do APC 85

6 CONCLUSÕES 86

REFERÊNCIAS 87

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

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

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

LISTA DE QUADROS

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

LISTA DE TABELAS

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

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsufóxido

DoE *Design of Experiments* (Desenho de Experimentos)

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

DPR Desvio Padrão Relativo

ECPC Emulsão cosmética contendo ácido p-cumárico

EDTA.2Na Etileno Diamino Tetra Acetato de Sódio

EPPC Emulsão cosmética sem ácido p-cumárico (placebo)

EtOH Etanol

FDA *Food and Drug Administration*

F/T Freeze and Thaw (Congelamento e descongelamento)

G Força G (gravidade)

g Grama

gl Graus de liberdade

H_2O Água

HaCat Queratinócito humano

HDFa *Human Dermal Fibroblast* (Fibroblasto humano)

IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IC_{50} ou IC50 Concentração inibitória 50%

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

IS Índice de irritação

L Litro

LD Limite de detecção

LQ Limite de quantificação

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

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao SER HUMANO Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pela generosidade, humildade, companheirismo e confiança. Nossas conversas e discussões extrapolaram os assuntos acadêmicos e acredito que essa etapa tenha sido muito profícua. A maneira humana como ele conduz tudo em sua vida, fez com que a árdua missão do mestrado ficasse mais tolerável.

Agradeço à minha esposa Elisangela de Lima pelo amor compartilhado, amor incondicional, amor verdadeiro, amor de pessoas que escolheram estar juntas e confiar nas escolhas umas das outras. Agradeço à minha mãe Dulcineia Soares Ramos que depois de tanto tempo me recebeu de braços abertos em sua casa, proporcionando não apenas hospedagem, mas amor de mãe. Ao Sr. Edegar Forner, são-paulino roxo, pelas conversas animadas sobre minha pesquisa e sobre os altos e baixos de seu time de coração.

Agradeço à minha psicanalista Cláudia, pelas pontuações e pelos dados de realidade tão bem colocados, que fizeram com que eu elaborasse determinados assuntos e não atribuísse a mim aquilo que não estava sob meu controle (... será que algo está sob nosso real controle ? ...).

Agradeço aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp, Ilza do laboratório de Cosmetologia, Angélica do laboratório de Plantas Medicinais, Fátima do laboratório de Controle de Qualidade Físico-Químico. Agradeço também a Danúbia do laboratório de Físico-Química do Instituto de Química da Unesp. Todos eles foram fundamentais para a condução de minha pesquisa.

Agradeço aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Profª. Drª. Regina Cicarelli do laboratório de Imunologia, Profª. Drª. Hérida do laboratório de Controle Microbiológico, Profª. Drª. Virgínia do laboratório de Controle Físico-Químico, Profª. Drª. Rosângela do laboratório de Princípios Naturais e Toxicologia e ao Prof. Dr. Andrei do laboratório de Proteômica. Todos eles foram muito generosos em compartilhar suas instalações e seus reagentes conosco.

Agradeço às alunas de doutorado Marina do laboratório de Proteômica e Lígia Fernandes do laboratório de Controle Físico-Químico pelas horas dedicadas em treinamentos e execução de ensaios. Agradeço também à aluna de mestrado Franciny do laboratório de Proteômica, pelas horas dedicadas em me acompanhar nos experimentos.

Agradeço a todos os alunos de iniciação científica e pós graduação do laboratório de cosmetologia, pois foi sensacional dividir com vocês a árdua tarefa de produzir ciência de qualidade no Brasil.

Agradeço a todos os funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, pois foram inúmeras às vezes em que eu fui prontamente atendido em minhas dúvidas administrativas.

Agradeço ao órgão de fomento, pois o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

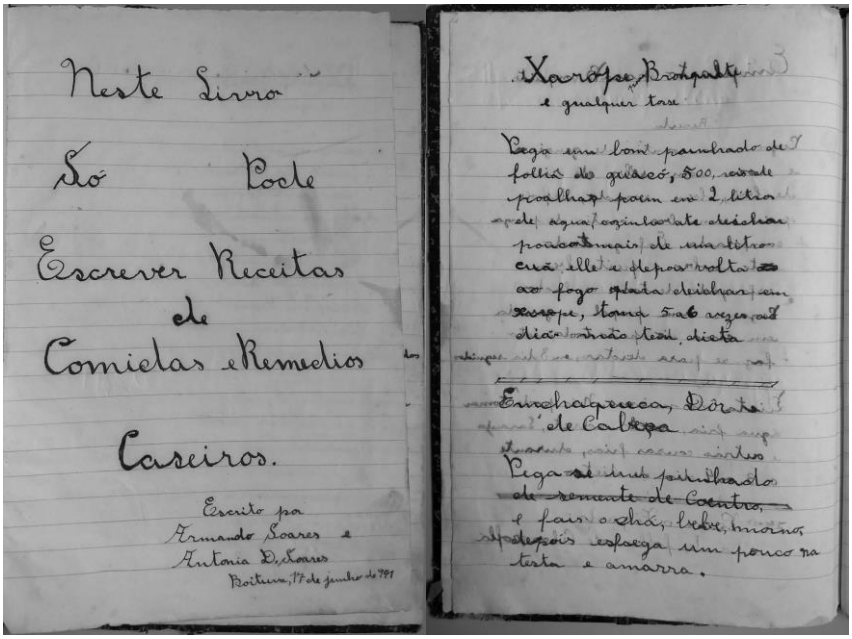
Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas, na pessoa do admirado diretor Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento.

Por último e não menos importante agradeço a todas as pessoas que, mesmo sem saber, me fizeram mais resiliente nas situações adversas.

1 INTRODUÇÃO

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

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



Fonte: Arquivo pessoal do autor

Figura 1. Fragmento do Livro de Receitas de Família

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

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

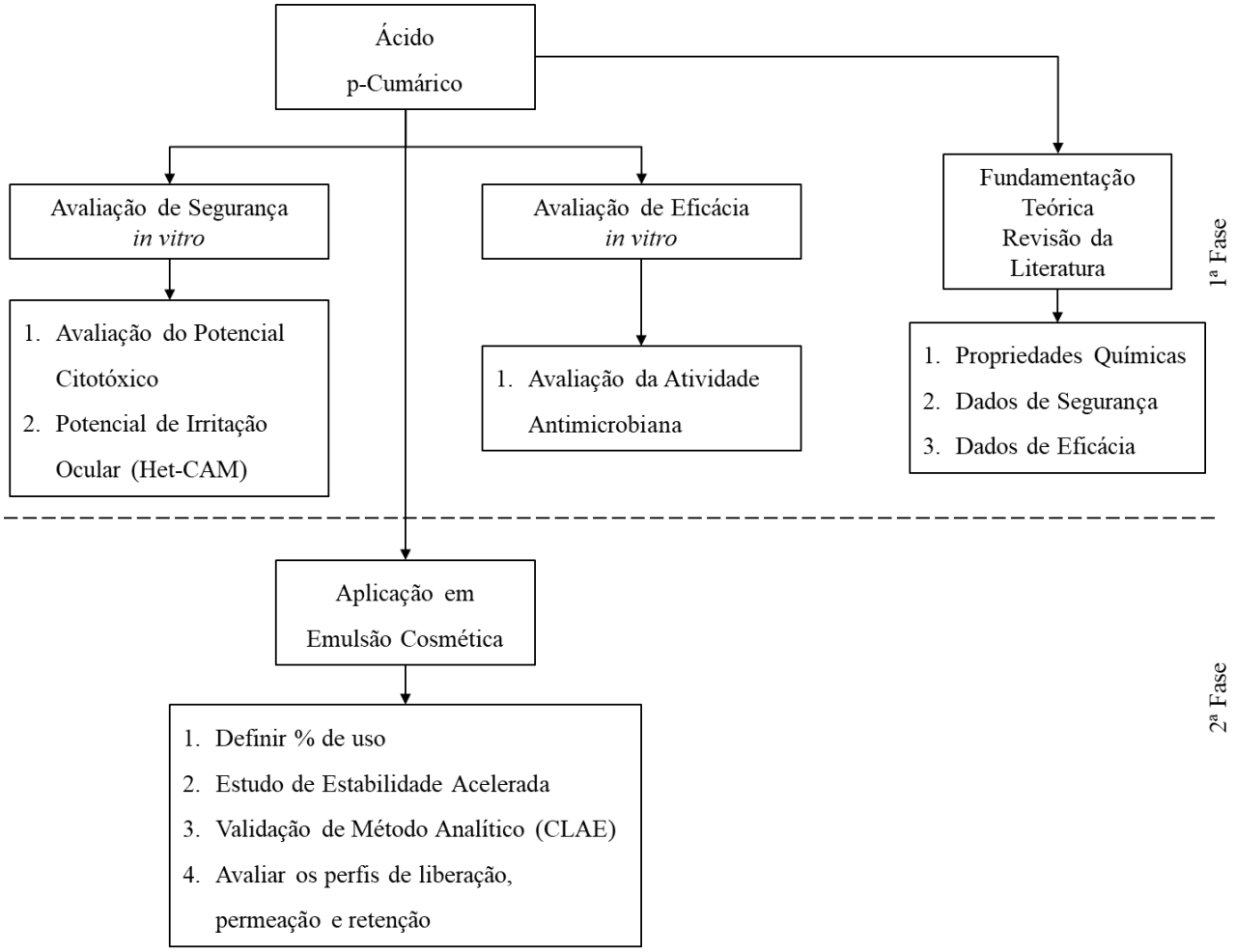
Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, a população brasileira em 2018 ultrapassou os 209 milhões de habitantes, sendo 51,09 e 48,91% mulheres e homens, respectivamente. Do total da população brasileira 9,22% apresenta idade acima dos 65 anos ("IBGE | Projeção da população",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

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

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

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

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



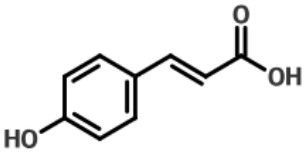
Fonte: Autor

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

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O ácido p-cumárico (APC) é um composto fenólico não flavonóide do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos, encontrado em sementes de cominho, espinafre, beterraba e cereais (CLIFFORD, 2000). Apresenta-se como pó marrom claro com odor característico, cujas características físicas e químicas estão na Tabela 1. O APC tem sido estudado nas ciências dos alimentos devido suas características antioxidantes, antitumoral, anti-inflamatória e por apresentar baixa toxicidade em ratos (DL_{50} = 2.850 mg/kg de peso corporal) (KADOMA et al., 2011); (PEI et al., 2016). No entanto essas características tem sido pouco exploradas na aplicação em produtos cosméticos.

Tabela 1. Características físicas e químicas do ácido p-cumárico

Nome INCI	p-coumaric acid	PubChem
Nome IUPAC	(E)-3-(4-hydroxyphenyl)prop-2-enoic acid	PubChem
Número CAS	501-98-4	PubChem
Fórmula molecular	$C_9H_8O_3$	PubChem
Massa molar (g/mol)	164,2	PubChem
Estrutura química		Molbase
Solubilidade em água (mg/mL)	1,02	DrugBank
Solubilidade em etanol (mg/mL)	50	Sigma-Aldrich®
LogP	1,79	PubChem

Fonte: Autor

Mathew, Abraham e Zakaria (2015) avaliaram a atividade antioxidante do APC, considerando os radicais DPPH e ABTS e verificaram que essa atividade foi menor que a de seus análogos ferúlico, gálico, caféico e vanílico. Porém os autores verificaram que essa atividade antioxidante foi consideravelmente aumentada quando conjugado ao ácido quínico, monossacarídeos e aminas.

Estudos realizados por Lou et al. (2012) mostraram que a atividade bactericida do APC pode ser explicada por dois mecanismos. O primeiro mecanismo se dá pelo aumento da permeabilidade da membrana celular e perda da função de barreira e o segundo mecanismo ocorre pela ligação química do APC ao radical fosfato da dupla hélice do ácido desoxirribonucleico (DNA), inibindo a replicação celular dos microrganismos. Mesmo assim, segundo Pei et al., 2016 estudos de eficácia antimicrobiana do APC mostram contradições em seus resultados quando consideramos diversos autores. Dessa forma, nossa proposta de estudo buscou investigar essa lacuna apresentada pelos autores.

Bag e Chattopadhyay (2015) estudaram a atividade inibitória da nisina, linalol e APC na formação de biofilmes de *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium*. Os resultados mostraram que a inibição em biofilmes de *Bacillus cereus* e *Salmonella typhimurium* foi maior na associação entre APC e nisina (91,58 ± 7,24% e 87,4 ± 7,5%), quando comparada a nisina (25,64 ± 1,56% e 12,29 ± 1,28%) e APC (63,75 ± 5,21% e 52,65 ± 2,21%) isolados.

A cinética de redução da resazurina foi estudada por Chen, Steele e Stuckey (2018) com o objetivo de determinar como e onde essa reação ocorria. Foram estudadas as reações intracelulares de redução metabólica da resazurina em *Enterococcus faecalis*, microrganismo gram positivo, anaeróbio facultativo. Os achados do grupo permitiram inferir que a resazurina é reduzida a resorufina apenas intracelularmente, porém a resorufina pode ser reduzida a dihidroresorufina, tanto intra como extracelularmente. Dessa forma, segundo os autores, esse modelo de estudo pode ser utilizado como um bioensaio rápido para verificação da citotoxicidade de substâncias químicas.

Geetha et al. (2011) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica para quantificação de APC em plantas medicinais (*Leptadinia reticulata*). Nesse estudo foi

utilizado cromatografia em fase reversa e coluna C-18, com eluição isocrática, fase móvel metanol e água acidificada com 0,8% de ácido fórmico (6:4), fluxo de injeção 1 mL/min, temperatura de 35 °C e detector de fotodiodo a 326 nm. A linearidade do método foi determinada entre 0,25 – 50 µg/mL. Estudo semelhante foi realizado por Karthikeyan, Devadasu e Srinivasa Babu (2015) para extrair e caracterizar o APC em extrato metanólico de *Cynodun dactylon Linn*. através de RP-CLAE, coluna C-18, fase móvel água, metanol e ácido acético glacial (65:34:1 v/v), fluxo de injeção 1 mL/min, com detector UV-Vis a 310 nm. A linearidade obtida esteve entre 2 – 10 µg/mL.

3 OBJETIVOS

Avaliar a segurança e a eficácia *in vitro* do ácido p-cumárico (APC) e determinar sua estabilidade físico-química quando incorporado em uma emulsão cosmética óleo em água (O/A).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Reagentes e matérias-primas

- Ácido Acético Glacial
- Ácido p-Cumárico (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%)
- Água Purificada (Mili-Q®)
- Álcool Cetoestearílico (Fagron)
- Aztreonam
- Cefazolina Sódica (ABL - Antibióticos do Brasil)
- Cetaril Sulfato de Sódio (ChemSpecs)
- Corante Amarelo Tartrazina (CI 19140)
- Corante Marrom (F. Braun)
- EDTA.2 Na
- Estearato de Octila (MPR/Via Farma)
- Etanol (Neon®, PanReac®, JT Backer®)
- Fosfato Bibásico de Sódio
- Fosfato Monobásico de Sódio
- Glicerina
- Meios de Cultura (DMEM e MEM)
- Metanol (JT Backer®)
- Monoestearato de Glicerila (EML)
- MTT
- Phenoxyetanol (Clariant®)
- Propilenoglicol (Galena)
- Resazurina

4.2 Materiais biológicos

- *Escherichia coli* (ATCC® 10536)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538)
- *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222)

- Fibroblastos_HDFa (ATCC® PCS-201-012)
- Queratinócitos_HaCat (ATCC® PTA-9170)
- Pele de orelha de porco

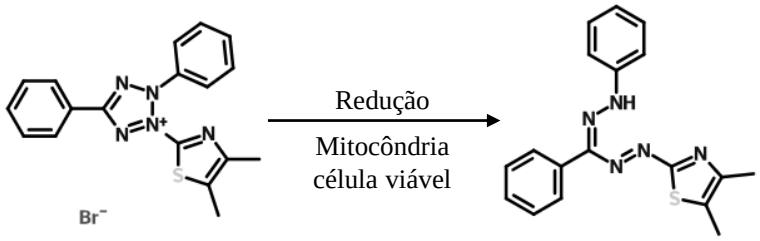
4.3 Equipamentos, vidrarias e acessórios

- Agitador mecânico (Quimis)
- Agitador tipo vórtex
- Balança analítica (Ohaus)
- Balança analítica (Shimadzu - ATX224)
- Balança semi-analítica (Gehaka BG-4000RS)
- Balão Volumétrico 1, 5, 10, 100, 200, 250, 500 mL (Pyrex®)
- Béquer (10, 50, 100, 500, 1000 e 2000 mL)
- Centrífuga (Centribio)
- Cromatógrafo 1100 series com detector UV-Vis (Agilent®)
- Dermatômetro TCM300 (Nouvag®)
- Espátulas (inox e silicone)
- Espectrofotômetro de placas (Spectro Star Nano, BMG Labtech)
- Estufa (Quimis)
- Fogão de 2 bocas
- Garra para béquer
- Geladeira (Eletrolux)
- Hélice Âncora
- Hélice Naval
- Lâminas e lamínulas de vidro
- Microscópio (Carl Zeis®)
- Pão duro
- Permeador Microette 0700-1251 (Hanson-Research®)
- pHmetro (Gehaka PG1800)
- Pipeta de Pasteur não estéril (Hexis Científica)

4.4 Métodos

4.4.1 Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico do APC foi determinado pelo método colorimétrico utilizando 3-(4,5-*dimethyl-2-thiazolyl*)-2,5-*diphenyl*-2H-*tetrazolium bromide* (MTT), que é reduzido a formazana (sal insolúvel de coloração violeta), em nível mitocondrial, pelas células viáveis (BAG; CHATTOPADHYAY, 2015) (Figura 3).

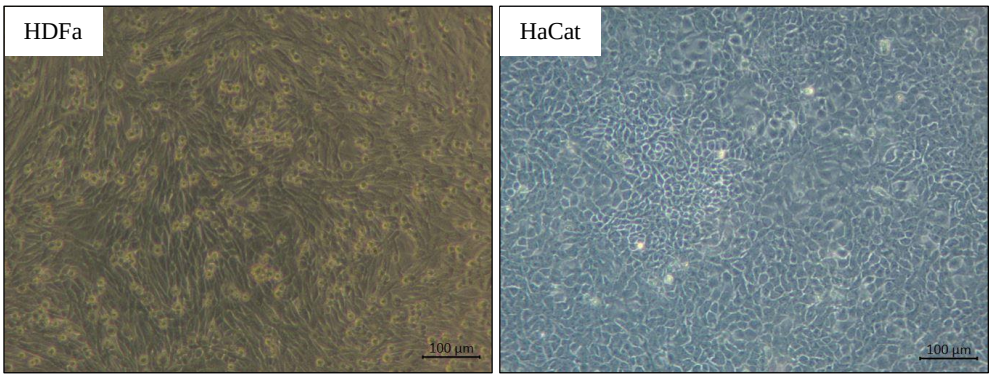


MTT (Amarelo) — Formazana (Violeta)

Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 28/09/2018

Figura 3. Reação de oxidação do *3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide* (MTT)

Foram utilizadas linhagens celulares de fibroblastos humanos (HDFa - *Human Dermal Fibroblasts*, ATCC® PCS-201-012) e queratinócitos humanos (HaCat – *Human Keratinocytes*, ATCC® PTA-9170) (SEOK; BOO, 2015) (Figura 4). As células HDFa e HaCat foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e MEM (*Minimum Essential Media*), respectivamente e suplementados com 10% de soro fetal bovino e antibióticos (penicilina 100 UI/mL e estreptomicina 0,1 mg/mL) (YEMMEN et al., 2017); (CHANG et al., 2018).



Fonte: Autor

Figura 4. Células *Human Dermal Fibroblasts* e *Human Keratinocytes*

4.4.1.1 Preparo dos reagentes e da solução estoque de APC

O tampão fosfato pH 7,2 (PBS – *Phosphate Buffer Saline*) foi preparado solubilizando-se Fosfato Monobásico de Sódio, Fosfato Bibásico de Sódio e Cloreto de Sódio em água Mili-Q®. Em seguida o tampão foi diluído na proporção 1:10 em água Mili-Q® (PBS 1X).

A Tripsina 10X foi diluída 1:10 em PBS 1X, obtendo-se Tripsina 1X. O controle do solvente foi preparado adicionando-se 5% (v/v) de etanol absoluto em meio de cultura (DMEM ou MEM). O controle positivo foi preparado adicionando-se 10% (v/v) de Dimetilsufóxido (DMSO) em meio de cultura (DMEM ou MEM). As soluções estoque (SE) de APC foram preparadas em triplicata, na concentração de 3.750 µg/mL em meio de cultura (DMEM ou MEM) com 5% (v/v) de etanol absoluto.

4.4.1.2 Preparo dos meios de cultura DMEM e MEM

Os meios de cultura foram preparados solubilizando-se meios liofilizados (DMEM ou MEM) em água Mili-Q® e ajustado seu pH para 7,2 com bicarbonato de sódio. Em seguida os meios de cultura foram submetidos a filtração esterilizante à vácuo, de maneira asséptica em fluxo laminar.

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

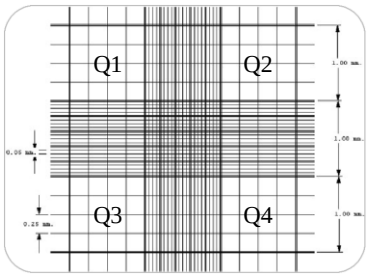
As células foram descongeladas, transferidas para Tubo Falcon® com meio de cultura e centrifugadas a 114 G (1.300 RPM) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio de cultura. Em seguida foi verificada a viabilidade celular com azul de Trypan e posterior observação em microscópio óptico invertido (SEOK; BOO, 2015).

Em seguida as células foram transferidas para frasco de cultura com meio adequado (DMEM ou MEM) e mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2, por um período de 4 a 6 semanas, até confluência de 80 a 90%.

4.4.1.4 Determinação do potencial citotóxico do APC

As células foram removidas das garrafas com uso de Tripsina 1x, transferidas para tubos Falcon® com meio de cultura para inibir a atividade enzimática da tripsina.

Em seguida foram centrifugadas a 114 G (1.300 RPM) por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio de cultura. O cálculo do número de células foi feito com auxílio da Câmara de Neubauer (Figura 5) e azul de Trypan (Equação 1). As células foram diluídas em meio de cultura até concentração de 1 x 10^6 células/mL (CHEN; STEELE; STUCKEY, 2018).



Fonte: Google® imagem

Figura 5. Esquema dos quadrantes da Câmara de Neubauer

$$N° \text{ células} = M_Q \times f_c \times V_d \times 10^4 \quad \textbf{Equação 1}$$

Onde, M_Q é a média do n° de células nos 4 quadrantes (Q), f_c é o fator de correção da diluição com azul de Trypan, V_d é o volume da diluição e 10^4 é o fator de correção da Câmara de Neubauer.

Foram adicionadas 1 x 10^5 células em cada um dos 96 poços das placas e em seguida elas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas.

Após 24 horas observou-se as placas em microscópio invertido para confirmação da aderência celular. O ensaio foi conduzido como descrito abaixo.

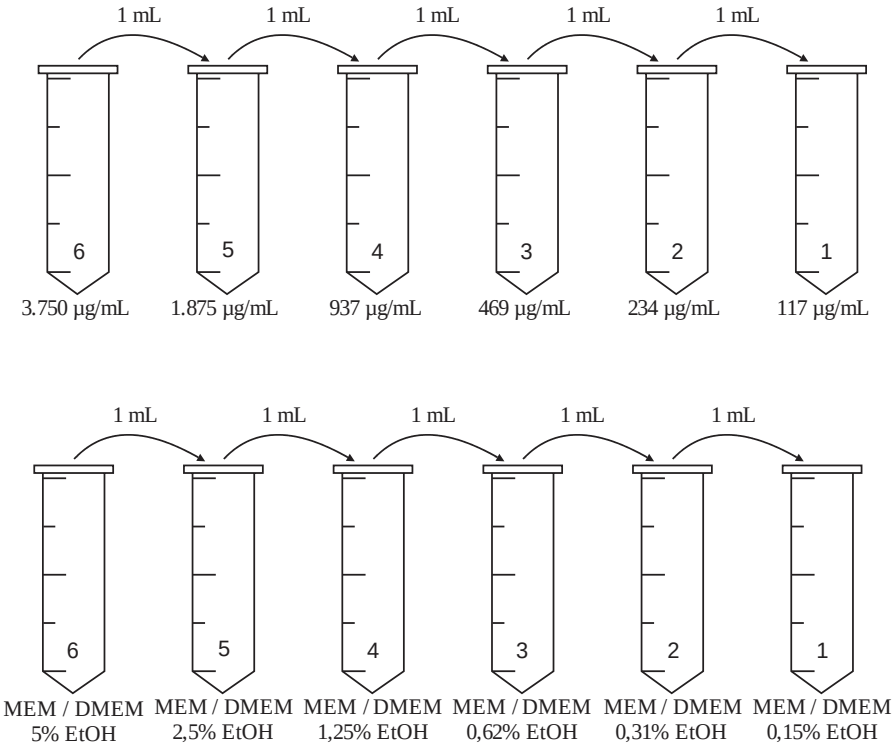
(1) Foram preparadas diluições seriadas do APC em triplicata, adicionando 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino em 5 ependorfs numerados de 1-5. No ependorf 6 foram adicionados 2 mL de SE de APC 3.750 µg/mL. Em seguida foi transferido 1 mL do ependorfs 6 para o ependorfs 5 e assim sucessivamente. Foram preparadas diluições seriadas do controle do solvente em simplicata adicionando 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino em 5 ependorfs numerados de 1-5. No ependorfs 6 foram adicionados 2 mL de solução de meio de cultura e 5% de etanol. Em seguida foi transferido 1 mL do ependorf 6 para o ependorf 5 e assim sucessivamente (Figura 6).

(2) Foram adicionados 100 µL de meio de cultura sem soro fetal bovino na linha A e 100 µL de DMSO 10% (v/v) na linha H, como controles negativo e positivo, respectivamente.

(3) Foram adicionados 100 µL das diluições da SE em triplicata nas colunas 1 a 9, em concentrações crescentes da linha B até a linha G.

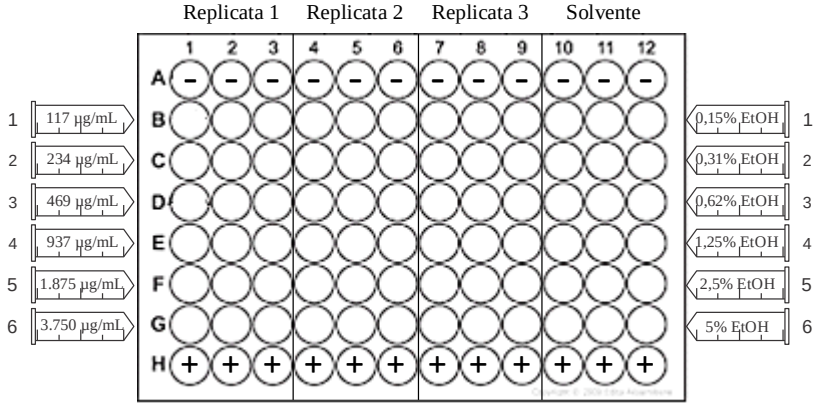
(4) Foram adicionados 100 µL das diluições do solvente em triplicata nas colunas 10 a 12, em concentrações crescentes da linha B até linha G.

(5) As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 24 horas.



Fonte: Autor, CorelDraw X6

Figura 6. Diluições seriadas do APC e do solvente para o ensaio de citotoxicidade



Fonte: Autor, CorelDraw X6, adaptado de Google® imagem

Figura 7. Disposição das amostras na placa de 96 poços para o ensaio de citotoxicidade

Após 24 horas foi preparada uma solução de MTT 1 mg/mL em PBS 1X e as placas foram tratadas da seguinte forma.

(1) O sobrenadante de todos os poços foi retirado com auxílio de micropipeta de vidro e bomba à vácuo.

(2) Cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1X.

(3) O PBS 1X foi removido e 100 µL de MTT 1 mg/mL foram adicionados em cada poço.

(4) A placa foi colocada em estufa a 37°C e 5% CO_2 por 3 horas.

(5) Em seguida o MTT foi removido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados em cada poço.

(6) Após 30 minutos as placas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm e a viabilidade celular calculada de acordo com a Equação 2.

$$\%_{viabilidade} = 100 - \{[1 - (Abs_{amostra} / Abs_{máx}) \times 100] - [1 - (Abs_{solvente} / Abs_{máx}) \times 100]\}$$ **Equação 2**

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

O potencial de irritação ocular do APC foi avaliado através do ensaio da membrana corioalantóica de ovos embrionados. Esse ensaio preconiza a observação de três parâmetros distintos em tempos predeterminados (SALVADOR; CHISVERT, 2007); (MARUNO, 2009); (ICCVAM, 2010); (TANG et al., 2019) (Tabela 2).

Hiperemia: surgimento de capilares sanguíneos ou aumento da intensidade da cor vermelha para os capilares já existentes.

Hemorragia: difusão de sangue no meio.

Coagulação: formação de agregação plaquetária (manchas rosadas) ou coagulação de proteínas (grumos esbranquiçados), podendo ser observado, também, opacidade total ou parcial da membrana.

Tabela 2. Pontuação para cálculo do Índice de Irritação (IS)

Reações	Pontuação		
	$T \leq 0,5$ min	$0,5 < T \leq 2$ min	$2 < T \leq 5$ min
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: adaptado de MARUNO, 2009.

Onde, T é tempo para ocorrência das reações.

4.4.1.5.1 Obtenção e preparo dos ovos embrionados

Os ovos férteis de galinha *Leghorn* branca, postos a menos de sete dias foram obtidos de um criador localizado na cidade de Porto Ferreira, no Estado de São Paulo. Os ovos estavam limpos, sem trincas na casca e tinham entre 50 e 60 g.

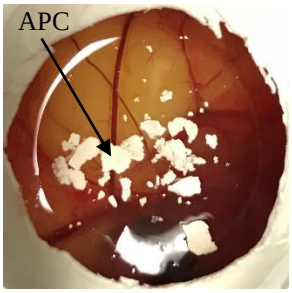
Os ovos foram incubados por 10 dias em estufa com circulação forçada de ar, controle de temperatura e umidade. A temperatura foi mantida em 37,8 ± 0,3°C e a umidade relativa em 58 ± 2%. Após o período de incubação os ovos foram verificados com auxílio de luz incandescente para confirmar a existência de vascularização e localizar a câmara de ar. Em seguida a câmara de ar foi delimitada com um marcador permanente e um pedaço de fita adesiva transparente foi colado sobre a casca. A área delimitada foi removida com uso de tesoura cirúrgica de ponta fina, expondo a membrana externa. A membrana externa foi removida cuidadosamente com auxílio de uma agulha intradérmica e uma pinça cirúrgica de ponta fina, expondo-se a membrana corioalantóica (CAM) (ICCVAM, 2010).

4.4.1.5.2 Preparo dos reagentes

Foram preparadas soluções aquosas de NaCl 0,9% (m/v) e NaOH 0,1 N. Foram pesados 100 µg de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) em triplicata, para uso sem solubilização (ICCVAM, 2010).

4.4.1.5.3 Execução do ensaio

Foram adicionados 100 µg de APC em triplicata (Figura 8) e 300 µL das soluções de NaCl e NaOH como controles negativo e positivo, respectivamente. Em seguida foram feitos registros por imagens, nos tempos 0,5, 2 e 5 minutos (MCKENZIE et al., 2015). Cada replicata possuía um controle sem tratamento (ST), para efeito de comparação.



Fonte: Autor

Figura 8. Membrana Corioalantóica

O IS das substâncias analisadas foi calculado pela média dos valores de ocorrência de hiperemia, hemorragia ou coagulação para cada replicata, de acordo com a Tabela 2 e Equação 3.

$$IS = \sum (\text{Hiperemia} + \text{Hemorragia} + \text{Coagulação}) / 3 \quad \textbf{Equação 3}$$

O teste foi considerado aceitável se os controles negativo (NaCl) e positivo (NaOH) induzissem uma resposta classificada como não irritante (IS=0) e severamente irritante (IS≥19), respectivamente (Tabela 3) (MARQUARDT et al., 2010).

Tabela 3. Classificação do Índice de Irritação

IS	Categorias
0,0 a 0,9	Praticamente não irritante
1,0 a 4,9	Ligeiramente irritante
5,0 a 8,9	Moderadamente irritante
9,0 a 21,0	Severamente irritante

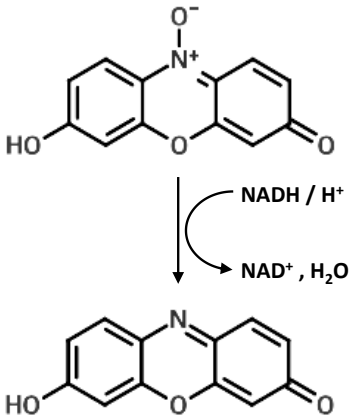
Fonte: Adaptado de MERQUARDT, 2010.

4.4.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do APC foi verificada pela determinação das concentrações inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) utilizando os seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC® 10536), *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222) (ZABKA; PAVELA, 2013); (STOJKOVIĆ et al., 2013); (BAG; CHATTOPADHYAY, 2015); (CHEN; STEELE; STUCKEY, 2018).

4.4.2.1 Preparo das soluções estoque de APC, Antibióticos e Resazurina

As soluções estoque de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foram preparadas nas concentrações de 12 mg/mL em Propilenoglicol / Água (75:25) para o ensaio com *E. coli* e 15 mg/mL em Propilenoglicol / Água (60:40) para os ensaios com *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*. As soluções aquosas dos antibióticos Aztreonam e Cefazolina sódica foram preparadas nas concentrações de 400 e 500 µg/mL, respectivamente. A solução aquosa do corante revelador Resazurina (*7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona-10-óxido*) foi preparada na concentração de 100 µg/mL. A resazurina é um corante azul ou púrpura que em presença de células viáveis se reduz em nível mitocondrial a resorufina, que apresenta cor rosa (Figura 9).



Resazurina (azul ou púrpura)

Resorufina (rosa)

Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 05/08/2018

Figura 9. Reação de oxidação do 7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido

4.4.2.2 Padronização da suspensão de células bacterianas

As suspensões das células bacterianas foram preparadas assepticamente em fluxo laminar, através do repique dos microrganismos em Caldo Soja Tripticaseína (TSB) e mantidas em estufa a 37°C por 24 horas.

Após 24 horas a suspensão foi padronizada pela adição de caldo TSB até atingir 25% da transmitância, obtida por leitura em espectrofotômetro a 580 nm. Essa concentração corresponde a 1 x 10^8 UFC/mL. Em seguida a suspensão foi diluída 1:100 em caldo TSB, obtendo-se concentração de 1 x 10^6 UFC/mL.

4.4.2.3 Determinação das concentrações inibitória e bactericida mínima do APC

A determinação da CIM foi feita aplicando-se alíquotas da solução estoque de APC, controles positivo e negativo e antibióticos em placas de 96 poços, como descrito abaixo.

(1) Foram adicionados 100 µL de H_2O estéril nos 96 poços da placa.

(2) Foram adicionados 100 µL de caldo TSB em A1 e B1, que foram os controles negativo e positivo, respectivamente.

(3) Foram adicionados 100 µL de solvente (propilenoglicol : água) em C1.

(4) Foram adicionados 100 µL de antibiótico em D1.

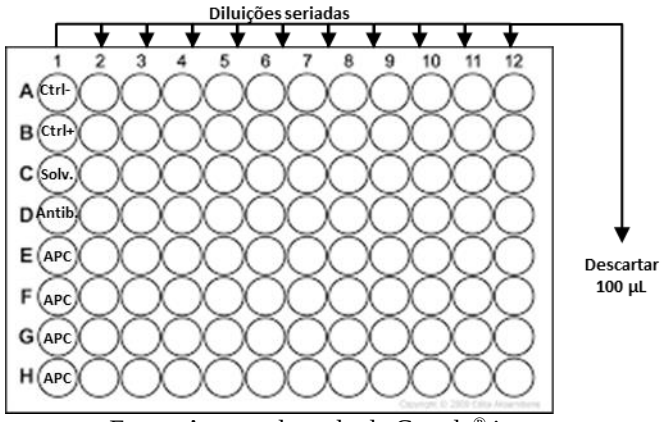
(5) Foram adicionados 100 µL da solução estoque de APC em E1, F1, G1 e H1.

(6) A partir da coluna 1 foram feitas diluições seriadas com pipetador multivias, transferindo 100 µL da coluna 1 para a coluna 2 e assim sucessivamente, homogeneizando 3x a cada transferência.

(7) Ao final das diluições seriadas, foram descartados 100 µL da coluna 12.

(8) Foram adicionados 100 µL da diluição 1:100 de microrganismo em cada poço, exceto na linha A (controle negativo).

(9) A placa foi incubada em estufa a 37°C por 24 horas.



Fonte: Autor, adaptado de Google® imagem

Figura 10. Disposição das amostras na placa de 96 poços para o ensaio de Atividade Antimicrobiana

Após 24 horas as placas foram lidas em espectrofotômetro Spectro Star Nano/BMG Labtech a 530 nm e a porcentagem de inibição do crescimento microbiano foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\%_{\text{inibição}} = 1 - (Abs_{amostra} / Abs_{máx}) \times 100$$ **Equação 4**

A determinação da CBM foi feita na sequência com descrito abaixo.

(1) Placas de Petri com ágar Mueller-Hinton (AMH) foram divididas em 8 partes iguais e o conteúdo dos poços C1, C2, H1, H2, H3, H4, H5 e H6 semeados assepticamente em fluxo laminar, com auxílio de hastes de madeira estéreis.

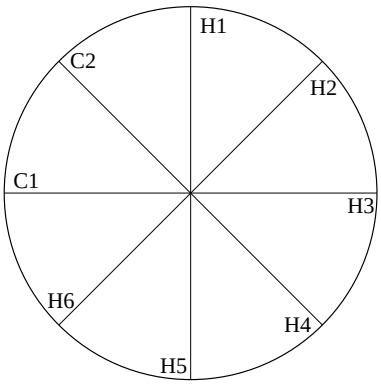
(2) As Placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

(3) Em seguida foram adicionados 30 µL de resazurina (100 µg/mL) em cada um dos 96 poços da placa.

(4) A placa foi fechada e homogeneizada levemente.

(5) Após 20 minutos foram feitas leituras visuais nas placas de 96 poços que continham o corante revelador resazurina. Os resultados visuais foram comparados com as leituras espectrofotométrica, feitas previamente.

(6) Após 24 horas, as Placas de Petri foram observadas e a CBM foi calculada com base na presença ou ausência de crescimento bacteriano.



Fonte: Autor

Figura 11. Placa de Petri com ágar Mueller-Hinton

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

O objetivo da validação foi determinar os parâmetros analíticos (Quadro 5) e garantir que o método fosse exato, preciso, estável e reprodutível considerando uma faixa específica de concentração da substância analisada (SINGH; GOVINDARAJAN; RAWAT, 2008); (GEETHA et al., 2011); (KARTHIKEYAN et al., 2015); (TÓTH et al., 2016); (SOUZA; MAIA CAMPOS, 2017); (BRASIL, 2017).

De acordo com a Resolução ANVISA, RDC n° 166, de 24 de julho de 2017, testes quantitativos com a finalidade de determinar princípios ativos em produtos acabados, são classificados como Categoria I e necessitam realizar em sua validação ensaios de Especificidade, Linearidade, Precisão, Limites de Detecção e Quantificação, Exatidão e Robustez.

4.4.3.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade e seletividade consistem na capacidade do método em identificar o analito de interesse na presença de interferentes que podem estar contidos na amostra, podendo ser impurezas, componentes da formulação base ou produtos de degradação (temperatura, hidrólise ácida/alcalina, oxidação e luz). Para isso a substância química de referência (SQR) deve ser utilizada na comparação dos resultados (BRASIL, 2017).

A solução estoque da emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), lote 140218, foi preparada na concentração de 100 µg/mL em etanol absoluto e a solução da emulsão ECPC310817#PL (sem APC), lote 021017, foi preparada solubilizando-se 4,6 g dessa emulsão em etanol absoluto.

A solução estoque de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foi preparada na concentração de 500 µg/mL em etanol absoluto. As amostras foram submetidas a ultrassom por 30 minutos.

Em seguida foram feitas diluições de forma a se obter concentrações finais de APC de 50 µg/mL. As diluições foram filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas por CLAE a 310 nm.

Tabela 4. Diluições das amostras de emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), ECPC310817#PL (sem APC) e Solução padrão de APC

Solução Estoque	V_{SE}	V_{EtOH}	Degradante	Condições de análise
ECPC310817#4	5 mL	2 mL	3 mL NaOH/0,1M	8 h / 80°C
(0,10% de APC)	5 mL	2 mL	3 mL HCl/0,1M	8 h / 80°C
	5 mL	2 mL	3 mL H_2O_2/3%	8 h / 80°C
	5 mL	2 mL	3 mL H_2O	8 h / 80°C
	5 mL	5 mL	Luz UV	8 h
ECPC310817#PL	5 mL	2 mL	3 mL NaOH/0,1M	8 h / 80°C
(sem APC)	5 mL	2 mL	3 mL HCl/0,1M	8 h / 80°C
	5 mL	2 mL	3 mL H_2O_2/3%	8 h / 80°C
	5 mL	2 mL	3 mL H_2O	8 h / 80°C
	5 mL	5 mL	Luz UV	8 h
Padrão de APC	2,5 mL	22,5 mL	Não se aplica	Não se aplica

Fonte: Autor

4.4.3.2 Linearidade

A linearidade consiste na obtenção de respostas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma determinada amostra. No mínimo cinco concentrações diferentes devem ser preparadas em triplicata, de forma independente. As concentrações das replicatas devem contemplar toda a faixa estabelecida para o método e as diluições podem ser preparadas a partir de uma mesma solução estoque (BRASIL, 2017).

4.4.3.2.1 Linearidade em Etanol

As soluções estoque (SE) foram preparadas, em triplicata, na concentração de 500 µg/mL em etanol absoluto. Em seguida foram preparadas diluições conforme Tabela 5. As diluições foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas por CLAE a 310 nm.

Tabela 5. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em etanol

V_{SE}	V_{EtOH}	C_{final}
800 µL	9.200 µL	40,0 µg/mL
900 µL	9.100 µL	45,0 µg/mL
1.000 µL	9.000 µL	50,0 µg/mL
1.100 µL	8.900 µL	55,0 µg/mL
1.200 µL	8.800 µL	60,0 µg/mL

Fonte: Autor

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

Esta etapa foi necessária para determinar as condições *sink* que foram utilizadas no ensaio de liberação.

O tampão fosfato pH = 7,4 foi preparado pela adição de soluções de Fosfato Monobásico de Sódio (0,9073 g/100 mL) e Fosfato Bibásico de Sódio (1,187 g/100 mL) na proporção 1:4.

A solução estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foi preparada na concentração de 500 µg/mL em tampão fosfato pH = 7,4 e em seguida diluída 1:10 no mesmo tampão (D1). As concentrações finais de APC para linearidade em tampão fosfato foram definidas entre 0,05 – 120% (Tabela 6).

Tabela 6. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em tampão fosfato pH = 7,4

Diluição	$V_{diluição}$	$V_{tampão}$	C_{final}
D1	5 µL	9.995 µL	0,025 µg/mL
SE	5 µL	9.995 µL	0,25 µg/mL
SE	10 µL	9.990 µL	0,50 µg/mL
SE	100 µL	9.900 µL	5,0 µg/mL
SE	200 µL	9.800 µL	10,0 µg/mL
SE	800 µL	9.200 µL	40,0 µg/mL
SE	900 µL	9.100 µL	45,0 µg/mL
SE	1.000 µL	9.000 µL	50,0 µg/mL
SE	1.200 µL	8.800 µL	60,0 µg/mL
Controle do tampão	0	10.000 µL	Não se aplica

Fonte: Autor

As diluições e o controle do tampão foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas em triplicata por CLAE a 310 nm. O controle do tampão foi necessário para eliminarmos a hipótese de existência de interferência na mesma faixa de absorção do APC.

4.4.3.2.3 Linearidade em Metanol

A solução estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foi preparada na concentração de 500 µg/mL em metanol e em seguida diluída 1:10 no mesmo solvente (D1). As concentrações finais de APC para linearidade em metanol foram definidas entre 0,05 – 120% (Tabela 7). As diluições foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas em triplicata por CLAE a 310 nm.

Tabela 7. Diluições das soluções estoque para determinação da linearidade em metanol

Diluição	Alíquota	Tampão	Concentração
D1	5 µL	9.995 µL	0,025 µg/mL
SE	5 µL	9.995 µL	0,25 µg/mL
SE	10 µL	9.990 µL	0,50 µg/mL
SE	100 µL	9.900 µL	5,0 µg/mL
SE	200 µL	9.800 µL	10,0 µg/mL
SE	400 µL	9.600 µL	20,0 µg/mL
SE	600 µL	9.400 µL	30,0 µg/mL
SE	800 µL	9.200 µL	40,0 µg/mL
SE	1.000 µL	9.000 µL	50,0 µg/mL
SE	1.200 µL	8.800 µL	60,0 µg/mL

Fonte: Autor

4.4.3.3 Precisão

A precisão avalia a proximidade entre os resultados das análises realizadas em dias diferentes, com preparo de soluções distintas a cada dia. A precisão foi calculada pelo desvio padrão relativo (DPR) dos resultados das seis replicatas preparadas por dois analistas, no mesmo equipamento em dois dias distintos (BRASIL, 2017) (Equação 5).

$$DPR = (DP / CMD) \times 100 \quad \textbf{Equação 5}$$

Onde, DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada

Foram preparadas 6 soluções estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) na concentração de 500 µg/mL em etanol absoluto para cada dia de análise e em seguida diluídas 1:10 no mesmo solvente.

As diluições foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas por CLAE a 310 nm, nos dias 1 e 2.

4.4.3.4 Limite de Detecção

O limite de detecção (LD) corresponde a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada.

Foram preparadas três soluções estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) na concentração de 57,5 µg/mL em etanol absoluto. Em seguida foram preparadas diluições, para cada SE, conforme Tabela 8. As diluições foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas por CLAE a 310 nm.

Tabela 8. Diluições das soluções estoque para determinação dos limites de detecção e quantificação do APC

V_{SE}	V_{EtOH}	C_{final}
10 µL	24.990 µL	0,023 µg/mL
100 µL	24.900 µL	0,23 µg/mL
200 µL	24.800 µL	0,46 µg/mL
20.000 µL	5.000 µL	46,0 µg/mL

Fonte: Autor

O LD foi calculado com base no desvio padrão (DP) do intercepto das curvas com o eixo Y e na média da inclinação das três curvas analíticas (IC) (BRASIL, 2017) (Equação 6).

$$LD = (3,3 \times DP) / IC \quad \textbf{Equação 6}$$

4.4.3.5 Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada e quantificada com precisão e exatidão.

O LQ foi calculado com base no desvio padrão (DP) do intercepto das curvas com o eixo Y e na média da inclinação das três curvas analíticas (IC) (BRASIL, 2017) (Equação 7).

$$LQ = (10 \times DP) / IC \quad \textbf{Equação 7}$$

4.4.3.6 Exatidão

A exatidão refere-se à concordância entre os resultados individuais e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão foi calculada pela porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito através de nove determinações, respeitando-se o intervalo de linearidade do método. Foram utilizados três níveis de concentração em relação ao padrão: baixo, médio e alto, cada um em triplicata (BRASIL, 2017).

As soluções estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foram preparadas na concentração 500 µg/mL em etanol absoluto e em seguida diluídas 1:10 com mesmo solvente. As soluções placebo fortificadas foram preparadas a partir da emulsão ECPC310817#PL (sem APC), lote 021017, com adição de APC, obtendo-se concentrações de 40 e 60 µg APC/mL em etanol absoluto, níveis baixo e alto, respectivamente. As soluções de nível médio foram preparadas a partir da emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), lote 140218, obtendo-se a concentração de 50 µg APC/mL em etanol absoluto.

As diluições foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e suas alíquotas analisadas por CLAE a 310 nm.

A exatidão foi calculada pela porcentagem de recuperação do APC adicionado em concentrações conhecidas nas amostras (BRASIL, 2017) (Equação 8).

$$\% \text{ Recuperação} = (CME / CT) \times 100 \quad \textbf{Equação 8}$$

Onde, CME é a concentração média experimental e CT a concentração teórica

4.4.3.7 Robustez

A robustez de um método analítico é dada por sua capacidade em resistir a pequenas e intencionais variações dos parâmetros analíticos, indicando a confiança do método em uso normal (BRASIL, 2017).

A robustez do método foi determinada pela variação de seis parâmetros (Tabela 9).

Tabela 9. Parâmetros utilizados na determinação da robustez do método analítico

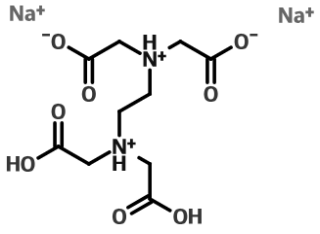
Parâmetros	Condições nominais		
	Baixo	Original	Alto
Fluxo da fase móvel (mL/min)	0,78	0,80	0,82
Proporção da fase móvel (H_2O:EtOH)	59:41	60:40	61:39
Comprimento de onda (nm)	304	310	316
pH da fase móvel	2,56		2,76
Fornecedor de Etanol	PanReac®		J.T. Backer®
Coluna cromatográfica	Phenomenex® C18, 150 mm		Agilent® C18, 150 mm

Fonte: Autor

4.4.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas

O desenvolvimento das emulsões foi feito considerando as características químicas e as potenciais incompatibilidades farmacotécnicas entre os insumos (DRAELOS; THAMAN, 2006); (IWATA; SHIMADA, 2013).

O etilenodiaminotetracetato de sódio (EDTA.2Na) é um sal dissódico amplamente utilizado em medicamentos, cosméticos e alimentos como agente sequestrante de cátions polivalentes. Auxilia na estabilidade de formulações sensíveis a eletrólitos e na eficácia de alguns conservantes. $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$, 336,208 g/mol, *Ethylenediaminetetraacetic acid disodium*, CAS n° 6381-92-6 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).

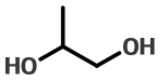


Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018

Figura 12. Fórmula estrutural do EDTA.2Na

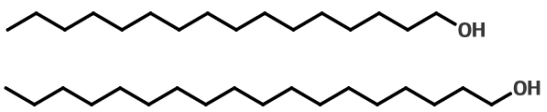
O propilenoglicol é um composto orgânico levemente viscoso, inodoro, incolor e insípido. Utilizado como umectante em cosméticos, medicamentos e alimentos, possui

propriedades solventes que facilita a incorporação de ingredientes ativos insolúveis em água. $C_3H_8O_2$, 76,095 g/mol, *Propyleneglycol*, CAS n° 57-55-6 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



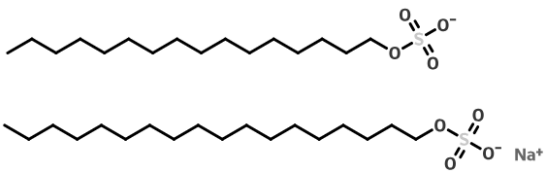
Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 13. Fórmula estrutural do propilenoglicol

O álcool cetoestearílico é uma mistura 30:70 de álcoois cetílico (C-16) e estearílico (C-18), com aspecto de cera branca, com odor característico que se funde em temperatura acima de 45 °C. Possui função de doador de viscosidade em emulsões e embora não seja um tensoativo verdadeiro é utilizado como tensoativo secundário ou co-tensoativo em formulações cosméticas. $C_{34}H_{72}O_2$, 512,948 g/mol, *Cetearyl alcohol*, CAS n° 67762-27-0 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



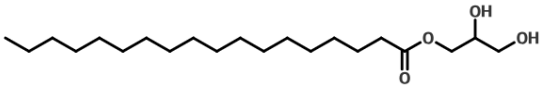
Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 14. Fórmula estrutural do álcool cetoestearílico

O cetearil sulfato de sódio é um tensoativo aniônico utilizado em emulsões óleo em água (O/A), que apresenta grupamento sulfato orgânico (-OSO_3.Na), com carga negativa quando em solução aquosa. $C_{34}H_{70}Na.O_8S_2^-$, 694,036 g/mol, *Sodium Cetearyl Sulfate*, CAS n° 59186-41-3 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



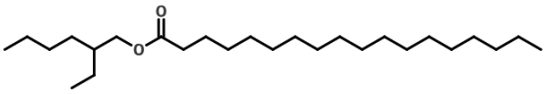
Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 15. Fórmula estrutural do cetearil sulfato de sódio

O estearato de glicerila é um éster graxo doador de viscosidade, resultante da reação entre o ácido esteárico (C-18) e o glicerol. Devido a essa cadeia longa com 18 átomos de carbono, apresenta forma sólida em escamas, levemente amareladas. $C_{21}H_{42}O_4$, 358,563 g/mol, *Glyceryl Stearate*, CAS n° 123-94-4 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



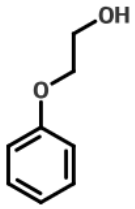
Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 16. Fórmula estrutural do estearato de glicerila

O estearato de etilexila é um éster resultante da reação entre o ácido esteárico (C-18) e o álcool etilhexílico, utilizado como umectante. Embora tenha 18 átomos de carbono em sua estrutura, o estearato de etilexila é um líquido levemente amarelado e viscoso, devido a presença de insaturação na cadeia oriunda do álcool carboxílico. $C_{26}H_{52}O_2$, 396,7 g/mol, *2-Ethylhexyl Stearate*, CAS n° 22047-49-0 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 17. Fórmula estrutural do estearato de etilexila

O fenoxietanol é um éter glicólico amplamente utilizado como agente antimicrobiano em medicamentos e cosméticos. $C_8H_{10}O_2$, 138,166 g/mol, *2-Phenoxyethanol*, CAS n° 122-99-6 (CORRÊA, 2012); (PubChem, acesso em 06/02/2018).



Fonte: Autor, criado em www.molbase.com em 19/10/2018
Figura 18. Fórmula estrutural do fenoxietanol

O conceito de *Design of Experiments* (DoE) (LAZIĆ, 2005); (SHEKHAWAT et al., 2018); (MIKI et al., 2018) foi utilizado no desenvolvimento das formulações, uma vez que essa ferramenta preconiza caracterizar o problema, escolher os fatores de influência e suas variáveis de resposta, elaborar o modelo de planejamento do estudo, conduzir o estudo e analisar seus dados (LOWENTHAL, 2001). Assim, foram definidos como fatores de influência o processo de fabricação da emulsão em 1 ou 2 fases, uso de diferentes concentrações do APC (0,04, 0,06, 0,08 e 0,10%), a solubilidade do APC em glicerina ou propilenoglicol e o uso de diferentes concentrações do álcool

cetoestearílico (4, 6 e 8%). Foram definidas como variáveis de resposta o tempo de processo de fabricação, pH, viscosidade e separação de fases da emulsão após centrifugação.

No total foram desenvolvidas 10 formulações de emulsão óleo em água (O/A) divididas em duas etapas. Na primeira etapa foram desenvolvidas 5 formulações (Quadro 1) cujas diferenças foram o processo de fabricação em uma ou duas fases, uso de glicerina ou propilenoglicol como solubilizante do APC e diferentes concentrações de álcool cetoestearílico como agente doador de viscosidade. Essas 5 formulações foram submetidas ao estudo de estabilidade preliminar por 15 dias, com avaliação das características organolépticas, pH e microscopia. O objetivo principal da primeira etapa foi observar a resposta da viscosidade frente às diferentes concentrações de álcool cetoestearílico e em seguida verificar qual o melhor solubilizante para o APC.

Quadro 1. Formulações cosméticas desenvolvidas na 1ª etapa

NOME COMERCIAL	**INCI NAME**	**FUNÇÃO**	**EPPC 160817B**	**EPPC 180817**	**EPPC 240817**	**ECPC 300817**	**ECPC 310817**
Água Purificada	*Water/Aqua*	Veículo	82,98	86,98	84,98	84,88	84,88
EDTA dissódico	*Disodium EDTA*	Agente Sequestrante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilenoglicol	*Propyleneglycol*	Emoliente / Solvente	0,00	0,00	0,00	0,00	3,00
Glicerina	*Glycerin*	Emoliente	3,00	3,00	3,00	3,00	0,00
Álcool cetoestearílico	*Cetearyl Alcohol*	Doador de Viscosidade	8,00	4,00	6,00	6,00	6,00
Cetearil sulfato de sódio	*Sodium Cetearyl Sulfate*	Emulsionante aniônico	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Estearato de glicerila	*Glyceryl Stearate*	Doador de Viscosidade	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Estearato de octila	*Ethylhexyl Stearate*	Emoliente	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Phenoxyethanol	*Phenoxyethanol*	Conservante	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Ác. p-cumárico	*p-Coumaric Acid*	Ativo	0,00	0,00	0,00	0,10	0,10
Processo de Fabricação			2 fases	2 fases	2 fases	1 fase	1 fase

Fonte: Autor

EPPC: emulsão cosmética sem APC; ECPC: emulsão cosmética com APC

Após estudo de estabilidade preliminar, a formulação cosmética eleita na primeira etapa (ECPC310817) foi preparada com diferentes concentrações de APC. Nessa segunda etapa foram preparadas 5 formulações (Quadro 2) que foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada por 90 dias. O objetivo da segunda etapa foi

verificar a influência de diferentes concentrações de APC na estrutura das emulsões. Essa avaliação foi feita comparativamente a uma formulação sem APC (placebo) .

Quadro 2. Formulações cosméticas desenvolvidas na 2ª etapa

NOME COMERCIAL	INCI NAME	FUNÇÃO	ECPC 310817#PL	ECPC 310817#1	ECPC 310817#2	ECPC 310817#3	ECPC 310817#4
Água Purificada	*Water/Aqua*	Veículo	84,98	84,94	84,92	84,90	84,88
EDTA dissódico	*Disodium EDTA*	Agente Sequestrante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Propilenoglicol	*Propyleneglycol*	Emoliente / Solvente	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Álcool cetoestearílico	*Cetearyl Alcohol*	Doador de Viscosidade	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Cetearil sulfato de sódio	*Sodium Cetearyl Sulfate*	Emulsionante aniônico	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Estearato de glicerila	*Glyceryl Stearate*	Doador de Viscosidade	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Estearato de octila	*Ethylhexyl Stearate*	Emoliente	3,00	3,00	3,00	3,00	3,00
Phenoxyethanol	*Phenoxyethanol*	Conservante	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Ác. p-cumárico	*p-Coumaric Acid*	Ativo	0,00	0,04	0,06	0,08	0,10
Processo de Fabricação			1 fase	1 fase	1 fase	1 fase	1 fase

Fonte: Autor

4.4.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação

Uma vez definidas as formulações, o próximo passo foi desenvolver os processos de fabricação em uma ou duas fases. Nessa etapa do projeto foi importante conhecer e entender as necessidades das empresas do segmento cosmético, pois elas buscam processos robustos, menos complexos e que possam ser realizados com menor número de etapas de processo. Ainda que os processos em duas fases sejam mais tradicionais e preconizados com maior frequência (CORRÊA, 2012), os processos em uma fase são preferidos quando se pensa em escala industrial, pois minimizam erros operacionais e perdas de processo e maximizam a eficiência industrial, com redução do tempo entre os lotes.

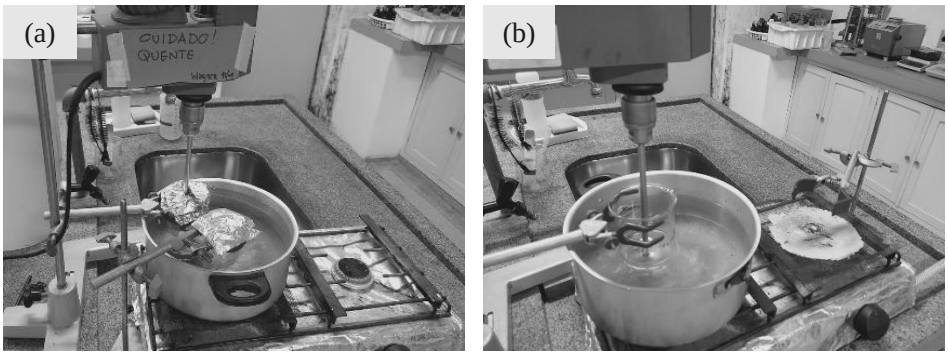
4.4.4.1.1 Desenvolvimento de processo em 2 fases

(1) Foram adicionados ao béquer principal: água, EDTA dissódico e glicerina. Iniciaram-se agitação à 200 RPM e aquecimento até 70-75°C (Fase aquosa).

(2) Em béquer auxiliar foram adicionados: álcool cetoestearílico, cetearil sulfato de sódio, estearato de glicerila e estearato de octila (Fase oleosa). Iniciou-se aquecimento entre 70-75°C, sem agitação, até completa fusão dos componentes sólidos.
(3) Quando ambas fases estavam com temperatura entre 70-75°C, com todo material solubilizado e fundido, foi vertida sob agitação a Fase oleosa sobre a Fase aquosa. Foram mantidos aquecimento entre 70-75°C e agitação de 1200 RPM durante 8 minutos.
(4) Iniciou-se o resfriamento em banho de água, sob agitação de 500-700 RPM até temperatura inferior a 40°C.
(5) Adicionou-se o fenoxietanol em temperatura abaixo de 40°C sob agitação de 400 RPM que foi mantida por 2 minutos.

4.4.4.1.2 Desenvolvimento de processo em 1 fase

(1) Foram adicionados ao béquer: água e EDTA dissódico. Iniciaram-se agitação à 200 RPM e aquecimento até 70-75°C.
(2) O ácido p-cumárico foi solubilizado em propilenoglicol em béquer auxiliar e adicionado na fase anterior (água e EDTA) sob agitação de 600 RPM. Depois de adicionado a agitação foi reduzida para 200 RPM.
(3) Quando a temperatura estava entre 70-75°C, foram adicionados um a um sob agitação de 500 RPM: álcool cetoestearílico, estearato de glicerila e estearato de octila.
(4) Foram mantidos aquecimento entre 70-75°C e agitação de 500 RPM e adicionado, lentamente, o cetearil sulfato de sódio. A agitação foi aumentada para 800 RPM e mantida por 3 minutos.
(5) Iniciou-se o resfriamento em banho de água, sob agitação de 500-700 RPM até temperatura inferior a 40°C.
(6) Adicionou-se o fenoxietanol em temperatura abaixo de 40°C sob agitação de 600 RPM. Em seguida diminuiu-se a agitação para 400 RPM, que foi mantida por 3 minutos.



Fonte: Autor

Figura 19. (a) Processo de Fabricação em 2 etapas e (b) Processo em 1 etapa

4.4.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada

O estudo de estabilidade das emulsões foi conduzido segundo Guia de Estabilidade da ANVISA com modificações (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004). As emulsões foram preparadas e acondicionadas em embalagens plásticas de 60 gramas, brancas opacas, devidamente identificadas (Figura 20).

Fonte: Autor

Figura 20. Modelo de identificação das amostras

As amostras foram mantidas durante 3 meses em temperaturas preestabelecidas (Quadro 3 e Quadro 4).

Quadro 3. Condições da Estabilidade Acelerada e periodicidade das análises

Temperaturas	Periodicidade da Análises				
	Inicial	15 dias	30 dias	60 dias	90 dias
5°C	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+

(+) realizar análises

Quadro 4. Ciclos de Congelamento e Descongelamento (F/T)

	1° Ciclo		2° Ciclo		3° Ciclo	
Gelo e Degelo	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h	24 h
(F/T)	-5°C	25°C	-5°C	25°C	-5°C	25°C

Fonte: Autor

As avaliações de aparência, cor, odor, reologia, separação de fases, microscopia, pH e teor de APC foram realizadas ao final de cada período de tempo e com a temperatura das amostras estabilizadas em 25°C. As amostras foram mantidas em retenção, ao abrigo da luz e em temperatura ambiente, durante todo o período de estudo da Estabilidade Acelerada (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

A quantificação do teor de ativo foi realizada apenas com a formulação contendo 0,10% de APC (ECPC310817#4), pois o estudo de estabilidade das demais formulações foi iniciado anteriormente à validação da metodologia de quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

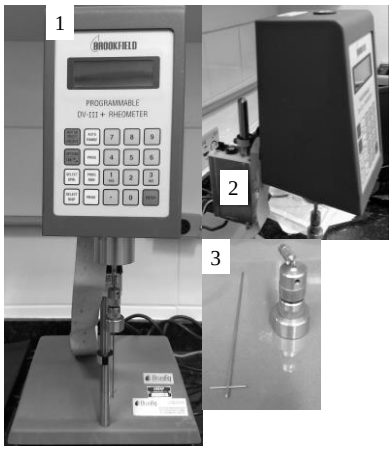
4.4.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões

A avaliação das características organolépticas foi realizada durante todo o estudo de Estabilidade Acelerada de forma visual comparativamente a amostra inicial, que foi mantida ao abrigo da luz e em temperatura ambiente (VARKA, 2012).

As observações foram feitas depois de estabilizada a temperatura das amostras em 25°C. Foram avaliados brilho, aeração, existência de grumos ou partículas estranhas, escurecimento ou amarelamento e alteração no odor da base (amostra não continha fragrância) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILâNCIA SANITÁRIA, 2004).

4.4.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões

A viscosidade foi determinada em viscosímetro Brokfield RVT com sistema Helipath, utilizando-se fuso TD (Figura 21), sob rotação de 10 RPM, durante 1 minuto. As leituras foram feitas em triplicata do mesmo lote, em sala climatizada, antes das demais análises para evitar o cisalhamento das amostras (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004); (SCHRAMM, 2006).



Fonte: Autor

Figura 21. Viscosímetro Brokfield
Onde, (1) viscosímetro Brokfield RVT, (2) Sistema Helipath e (3) Fuso TD.

4.4.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões

A avaliação da separação de fases foi realizada durante o estudo de Estabilidade Acelerada. As amostras foram preparadas em simplicata, pesando-se cerca de 5 gramas de cada emulsão em Tubo Falcon® de 15 mL. Em seguida as amostras foram submetidas a centrifugação de 605 G (3.000 RPM) por 15 minutos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILâNCIA SANITÁRIA, 2004); (ISAAC et al., 2008).

4.4.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões

A avaliação microscópica foi realizada com o objetivo de observar formação de coalescência e ou surgimento de recristalização durante o Estudo de Estabilidade Acelerada. Foram preparadas lâminas com as emulsões ECPC310817#PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC) e #4 (0,10% de APC) que foram observadas ao microscópio óptico Carl Zeis® sob aumento de 100 x (VARKA, 2012). O registro das imagens foi feito com o auxílio de *smartphone* Moto G 5-Plus.

A caracterização da fase dispersante da emulsão foi feita utilizando dois tipos de corantes, um oleoso (F. Brown a 1%,) e um aquoso (Amarelo Tartrazina a 1%, CI 19140). A solubilização desses corantes pela fase dispersante possibilitou classificar a emulsão como sendo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (CORRÊA, 2012).

4.4.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões

As amostras foram preparadas através das dispersões à 10% (m/m) em água purificada, homogeneizadas em agitador tipo vórtex. As leituras foram feitas em

triplicata do mesmo lote em peagômetro Gehaka PG1800 de acordo com o planejamento da Estabilidade Acelerada (Quadro 3 e Quadro 4) (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILâNCIA SANITÁRIA, 2004); (ISAAC et al., 2008).

4.4.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões

O teor de APC foi determinado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) conforme planejamento do estudo de Estabilidade Acelerada.

As soluções estoque da emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), lote130318, foram preparadas na concentração de 50 µg APC/mL em etanol absoluto. As soluções estoque (SE) de APC (Sigma-Aldrich®, pureza ≥ 98%) foram preparadas na concentração de 500 µg/mL em etanol absoluto e diluídas 1:10 em etanol absoluto. As soluções foram submetidas a ultrassom por 30 minutos, filtradas em filtro de PTFE de 0,45 µm e analisadas por CLAE a 310 nm (GEETHA et al., 2011); (KARTHIKEYAN et al., 2015).

Quadro 5. Parâmetros cromatográficos de análise

Cromatógrafo	Agilent Technologies®, modelo 1100 series
Software	LC1100, Agilent® ChemStation
Coluna	Phenomenex® C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm)
Detector	UV/Vis
Fase Móvel	Água : Etanol : Ácido Acético Glacial (58 : 40 : 2)
Taxa de vazão	0,8 mL/min
Eluição	Isocrática
Comprimento de onda de detecção	310 nm
Tempo de execução	5 minutos
Temperatura	25°C
Volume de injeção	10 µL

Fonte: Autor

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

Os perfis de liberação, permeação e retenção cutâneas foram determinados com base nos dados de linearidade do método analítico. Foi utilizada a emulsão

ECPC310817#4, lote 130318, devido sua maior concentração de APC (0,10%) (PAYE; BAREL; MAIBACH, 2001).

4.4.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC

O ensaio para avaliar o perfil de liberação do APC foi conduzido após determinação das condições *sink* (LEE et al., 2019). Foram utilizados permeador Microette Hanson-Research® (Figura 22), membranas de celulose (Sigma-Aldrich®) e 6 células de difusão de Franz com volume de 7 mL cada (Figura 23). As alíquotas foram coletadas nos tempos inicial, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas e analisadas em Cromatógrafo Agilent®, 1100 series com detector UV-Vis a 310 nm (OECD, 2011). O tampão fosfato pH = 7,4 foi preparado pela adição de soluções de Fosfato Monobásico de Sódio (0,9073 g/100 mL) e Fosfato Bibásico de Sódio (1,187 g/100 mL) na proporção 1:4. Em seguida o tampão foi filtrado em sistema à vácuo com membrana filtrante e submetido a ultrassom por 30 minutos. O ensaio foi conduzido conforme descrito abaixo.

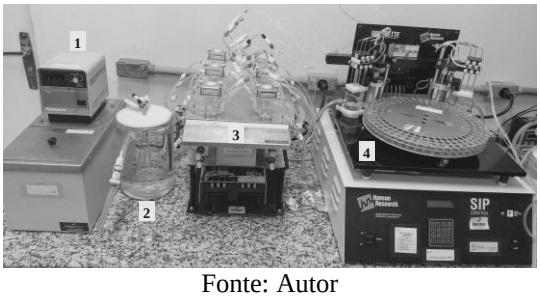
(1) O banho circulante foi estabilizado em 37 ± 2 °C por 30 minutos.

(2) Foram adicionados cerca de 500 mL da solução receptora (tampão pH 7,4) no béquer jaquetado.

(3) As células de difusão de Franz foram preenchidas com solução receptora (tampão pH 7,4).

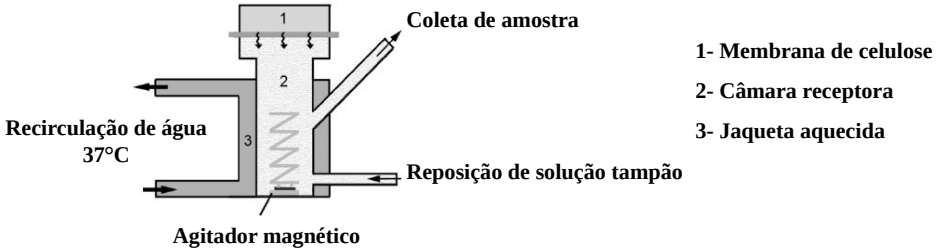
(4) As membranas de celulose foram colocadas cuidadosamente sobre as células de difusão de Franz e fixadas com discos de Teflon®. Em seguida foram adicionados 300 mg da emulsão ECPC310817#4 (0,10% de APC), lote 130318 sobre cada membrana. O sistema foi fechado com tampas de acrílico.

(5) As alíquotas foram analisadas por CLAE a 310 nm, após cada coleta nos tempos 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas.



Fonte: Autor

Figura 22. Permeador Microette Hanson-Research®
Onde, 1- Banho circulante, 2- Béquer jaquetado, 3- Células de difusão de Franz, 4- Sistema coletor



Fonte: adaptado de (KIM et al., 2012)
Figura 23. Modelo esquemático da célula de difusão de Franz

4.4.5.2 Avaliação da permeação do APC

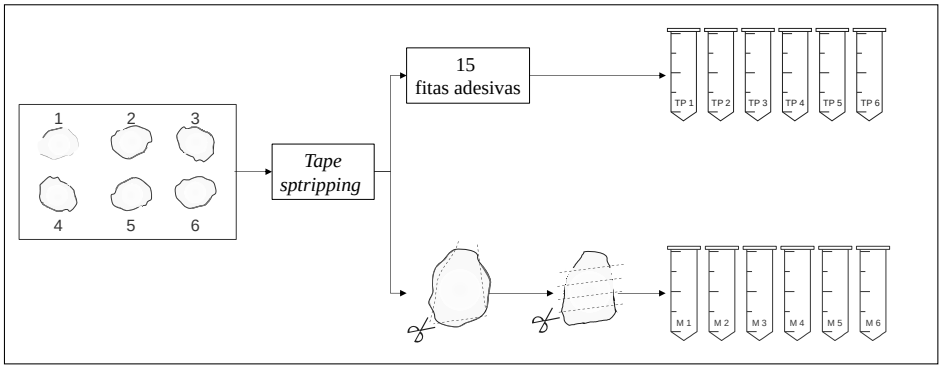
Foram obtidas orelhas de porco frescas e íntegras, sem passarem por processo de escaldamento e transportadas sob-refrigeração. As orelhas de porco foram dermatomizadas com uso de dermatômetro manual para obtenção de peles com espessura de aproximadamente 500 µm (Figura 24). Em seguida as peles foram mantidas sob refrigeração até o dia do experimento (OECD, 2011).

Fonte: www.nouvag.com, acesso em 30/09/2018
Figura 24. Dermatômetro Nouvag® TCM300

O ensaio para avaliar a permeação do APC seguiu as mesmas etapas do ensaio de liberação, exceto pelo uso de pele de orelha de porco em substituição às membranas de celulose e pela periodicidade de coleta das alíquotas que foram feitas nos tempos inicial, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18 e 24 horas e analisadas em Cromatógrafo Agilent®, 1100 series com detector UV-Vis a 310 nm.

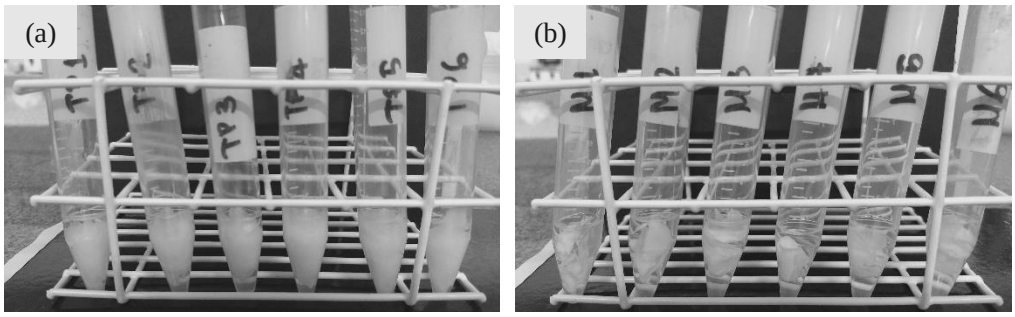
4.4.5.3 Avaliação da retenção do APC

(1) As peles foram cuidadosamente retiradas das células de difusão de Franz com auxílio de uma pinça.
(2) As peles foram gentilmente rinsadas com água Mili-Q® para remover o excesso de emulsão e foram dispostas sobre uma folha de papel alumínio devidamente identificadas (Figura 25).
(3) Procedeu-se o *tape stripping* das peles com auxílio de 16 pedaços de fita adesiva transparente (3M®) para cada um dos 6 pedaços de pele. A primeira fita de cada amostra foi descartada.
(4) Os 15 pedaços de fita adesiva de cada amostra foram adicionados em tubos Falcon® contendo 4 mL de metanol. Os tubos foram identificados como TP (*tape stripping*) (Figura 26a).
(5) Em seguida foram recortados os excessos de pele de cada amostra, com auxílio de tesoura sem ponta, preservando-se a área que ficou em contado com a emulsão.
(6) As amostras de pele foram cortadas em pequenas tiras e adicionadas em tubos Falcon® contendo 4 mL de metanol. Os tubos foram identificados como M (macerado) (Figura 26b).
(7) Os 12 tubos Falcon® foram submetidos a agitação em agitador tipo vórtex por 1 minuto, banho ultrassônico por 20 minutos e mais 1 minuto em agitador tipo vórtex. Os sobrenadantes foram filtrados em filtro de PTFE 0,45 µm e analisados em Cromatógrafo Agilent®, 1100 series com detector UV-Vis a 310 nm.



Fonte: Autor, CorelDraw X6

Figura 25. Etapas do ensaio de retenção cutânea



Fonte: Autor

Figura 26. (a) Fitas adesivas em metanol e (b) Pele de orelha de porco em metanol

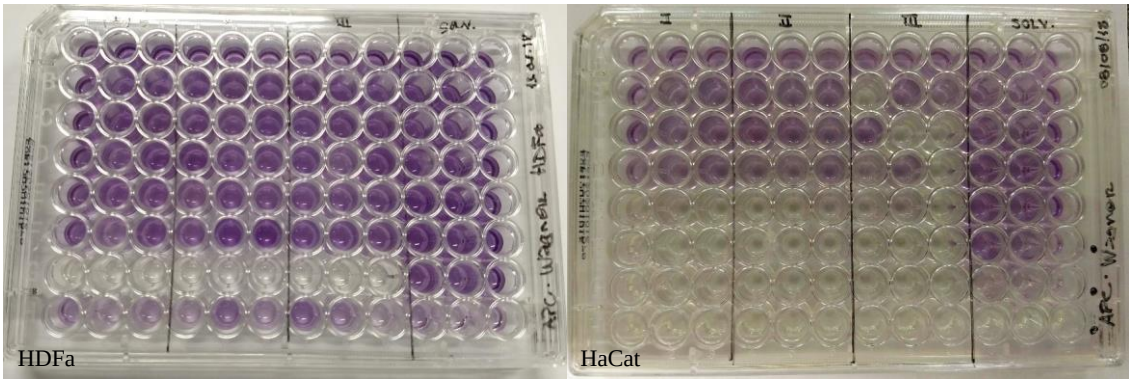
Onde TP = *tape stripping* e M = macerado

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do potencial citotóxico

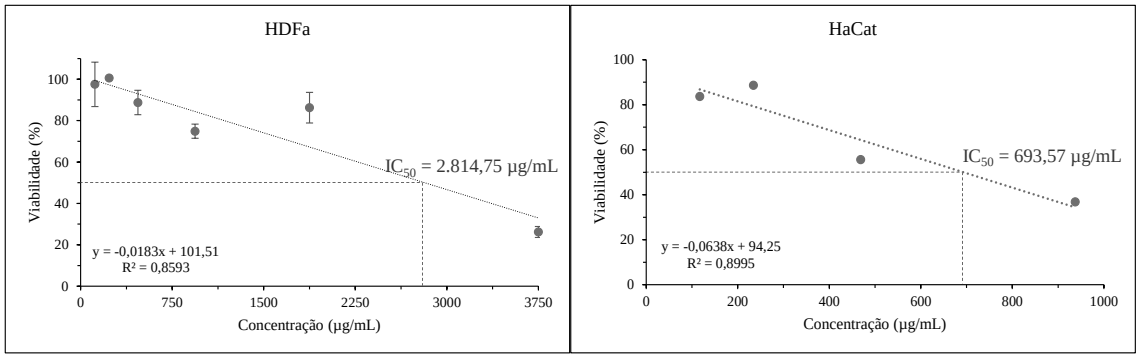
5.1.1 Avaliação da citotoxicidade em linhagens celulares HDFa e HaCat

Os resultados das leituras em espectrofotômetro foram plotados em gráficos de viabilidade celular. O IC_{50} que indica a concentração de APC necessária para inibir o crescimento de 50% das células foi calculado pelas equações da reta y = ax + b (Figura 27 e Figura 28).



Fonte: Autor

Figura 27. Placas contendo linhagens celulares HDFa e HaCat e *3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide* (MTT)



Fonte: Autor

Figura 28. Viabilidade celular e IC_{50} das linhagens HDFa e HaCat

O IC 50% das células HaCat e HDFa foi 693,57 µg/mL e 2.814,75 µg/mL, respectivamente. A viabilidade celular no controle do solvente (5% de etanol) foi 82% para as células HDFa e 50% para as células HaCat. (ANVISA, 2012); (MOHAMMED et al., 2016); (AL-MADHAGI et al., 2018); (VELOZO-SÁ et al., 2019); (ÁLVAREZ-

GÓMEZ et al., 2019); (LI et al., 2019). Os resultados mostram que as células HaCat são mais suscetíveis a morte celular que as células HDFa. Esses resultados já eram esperados de certa forma, uma vez que a confluência das células HaCat foi atingida mais tardiamente quando comparadas a confluência das células HDFa. Outro indício de que isso era esperado, é que a viabilidade das células HaCat foi cerca de 60% menor que a das células HDFa no controle do solvente (5% de etanol).

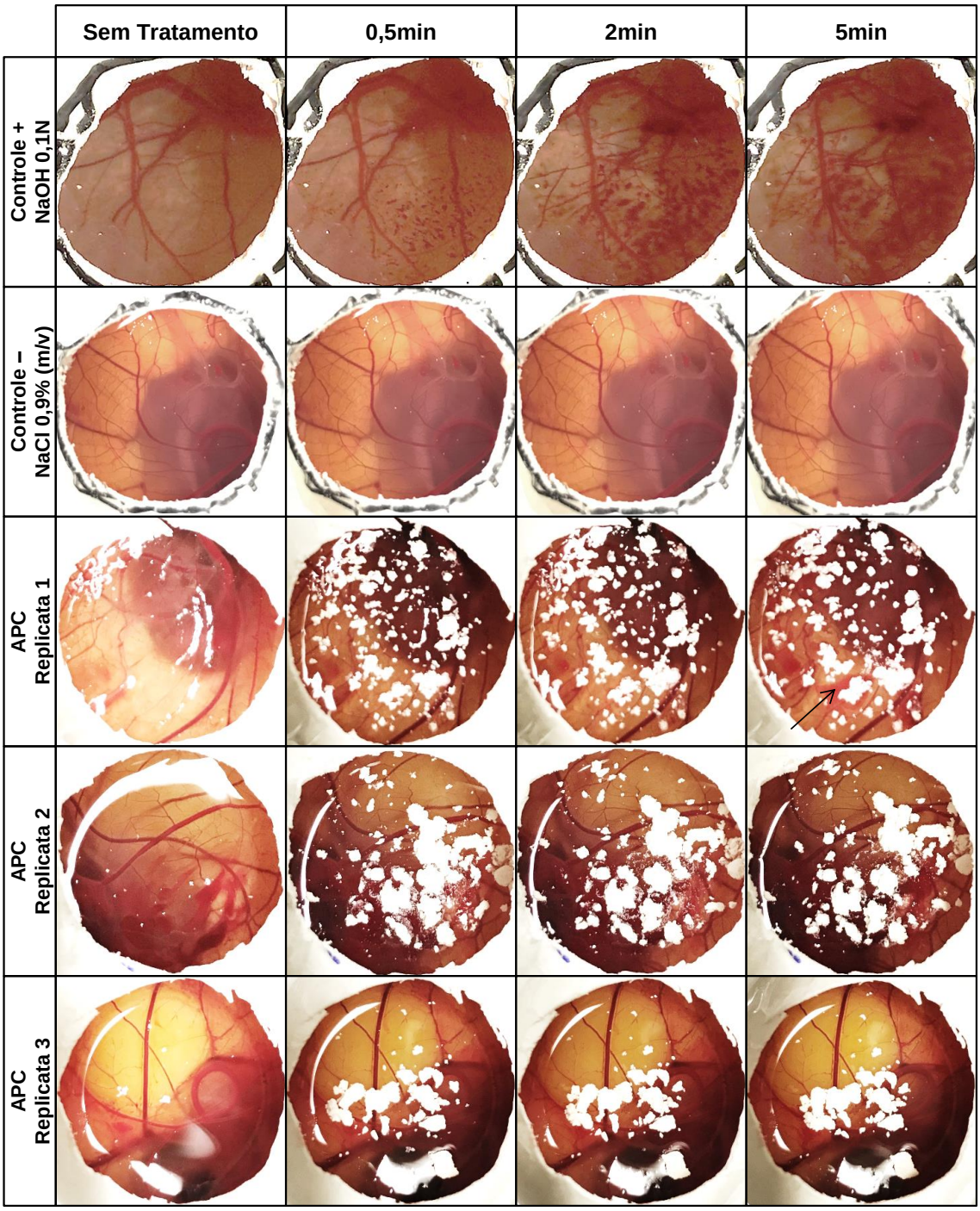
5.1.2 Avaliação do potencial de irritação ocular pelo método HET-CAM (*Hen´s Eggs Test – Chorio Allantoic Membrane*)

Após aplicação de diferentes substâncias na CAM, observou-se a ocorrência ou não de reações de hiperemia, hemorragia ou coagulação (Figura 29). Em seguida os resultados foram expressos em valores de Índice de Irritação (IS) e plotados na Tabela 10. A solução de NaCl 0,9% apresentou IS=0, pois não foram observadas reações de hiperemia, hemorragia ou coagulação nos 5 minutos de condução do ensaio. A solução de NaOH 1N apresentou IS=19, pois foram observadas hemorragia e coagulação aos 30 segundos e hiperemia no segundo minuto de condução do ensaio. Embora 100 µg de APC puros tenham apresentado IS=0 para duas das três replicatas, há forte indício de ocorrência de hemorragia no tempo 5 minutos para a replicata n° 1, o que levou ao recálculo do índice de irritação para IS=1 (ligeiramente irritante).(MARUNO, 2009); (MARQUARDT et al., 2010); (ANVISA, 2012); (ICCVAM).

Tabela 10. Classificação do Índice de Irritação (IS) para cada substância, Método HET-CAM.

Substâncias	Tempo[1]	IS	Classificação
NaCl 0,9% (m/v)	Sem alterações em 5 min	0	Praticamente não irritante
NaOH 0,1N	19 segundos	19	Severamente irritante
APC	Alteração em 5 min	1[2]	Ligeiramente irritante

[1] Tempo em que ocorreu a primeira alteração na CAM.
[2] Média da triplicata.

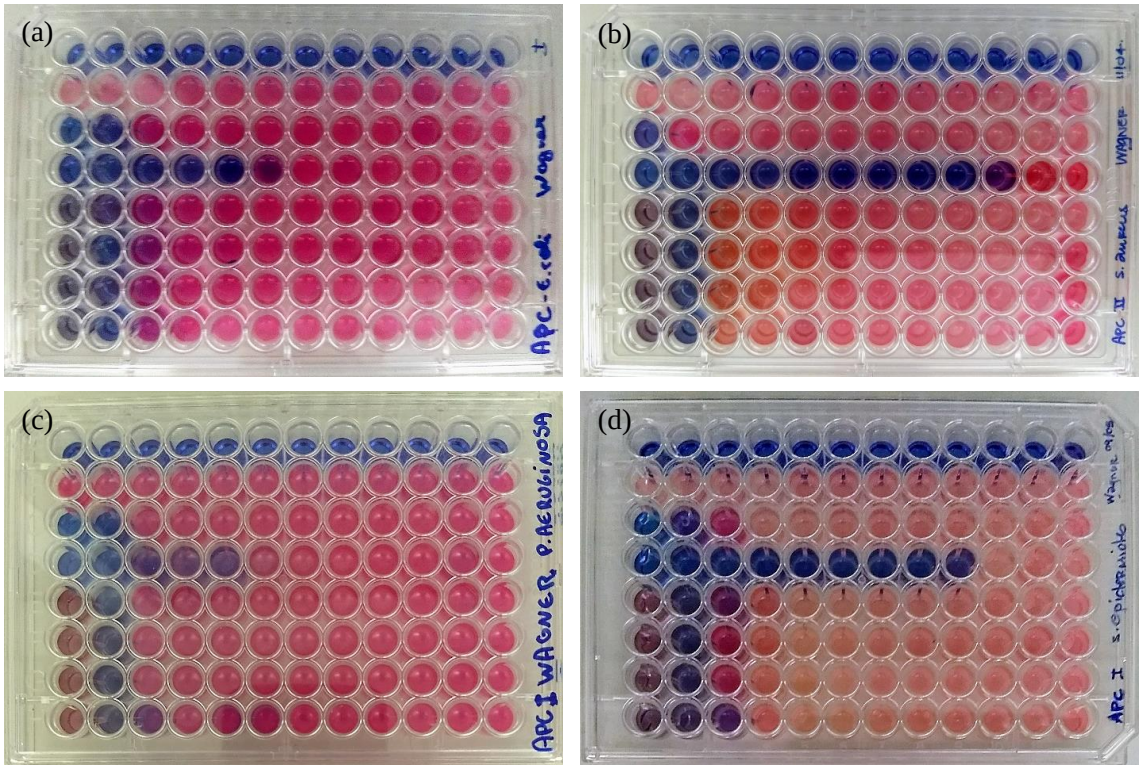


Fonte: Autor

Figura 29. Ocorrência de reações de hiperemia, hemorragia ou coagulação após adição de NaOH, NaCl e APC na CAM

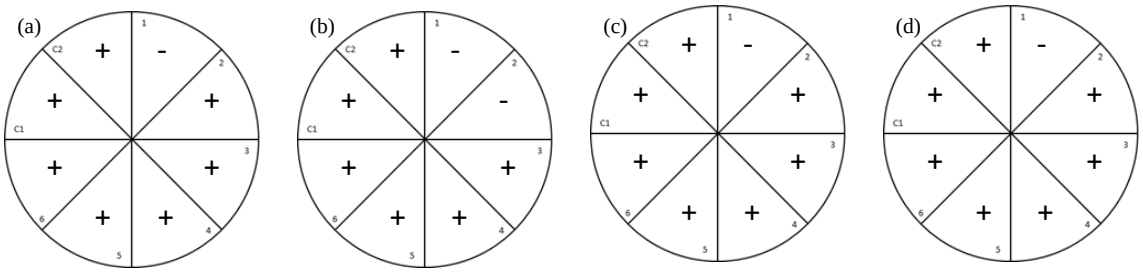
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

A viabilidade celular e a IC_{50} foram calculadas após leituras em espectrofotômetro a 530 nm (Figura 30 e Figura 32). A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada em placas de Petri contendo meio sólido ágar Mueller-Hinton (AMH), pela comparação entre os poços controle (C1 e C2) e os poços contendo APC (H1-H6) (Figura 31) (Tabela 11) (CELIKTAS et al., 2007); (ZABKA; PAVELA, 2013); (ABDI; ABIHPEC; SEBRAE, 2015).



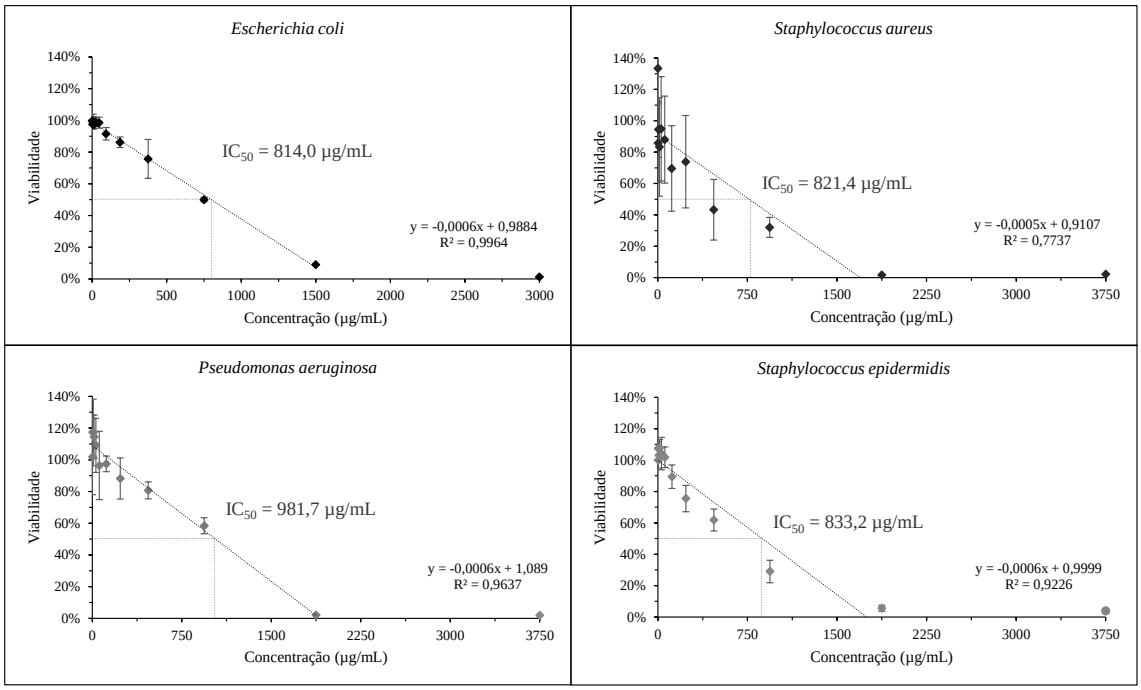
Fonte: Autor

Figura 30. Placas de 96 poços contendo Resazurina e (a) *Escherichia coli* (ATCC® 10536), (b) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), (c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853) e (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222)



Fonte: Autor

Figura 31. Placas com AMH. C1 e C2, controles do solvente. Divisões 1 a 6, controle das linhas H1-H6 (APC). (a) *Escherichia coli* (ATCC® 10536), (b) *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538), (c) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853), (d) *Staphylococcus epidermidis* (ATCC® 1222)
Onde, (+) e (-) significam presença e ausência de crescimentos bacterianos, respectivamente.



Fonte: Autor

Figura 32. Viabilidade celular e IC_{50} das cepas bacterianas

Tabela 11. Valores de CIM, CBM e IC_{50} do APC em µg/mL

Microrganismos	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)
Escherichia coli (ATCC® 10536)	1500	3.000	814,0
Staphylococcus aureus (ATCC® 6538)	1.875	1.875	821,4
Pseudomonas aeruginosa (ATCC® 27853)	938	3.750	981,7
Staphylococcus epidermidis (ATCC® 1222)	938	3.750	833,2

Fonte: Autor

CIM: concentração inibitória mínima (concentração bacteriostática), CBM: concentração bactericida mínima

Considerando a razão entre os valores de IC_{50} do APC para células HaCat e HDFa e os valores de CIM para os microrganismos estudados, foi possível calcular Índice de Seletividade (IC_{50}/CIM), que mede o quanto o APC é seletivo contra os microrganismos sem causar danos às células (Tabela 12). A concentração de 693,57 µg/mL de APC não foi seletivo contra os microrganismos estudados (índice de seletividade < 1). A concentração de 2.814,75 µg/mL de APC foi mais seletivo contra os microrganismos estudados que tóxico para as células HFDa. Essa concentração foi 1,9 vezes mais seletivo contra *E. coli*, 1,5 vezes mais seletivo contra *S. aureus*, 3 vezes

mais seletivo contra *P. aeruginosa* e 3 vezes mais seletivo contra *S. epidermides* (TILGASE et al., 2018); (JAŚKIEWICZ et al., 2019).

Tabela 12. Valores de CIM, IC_{50} e Índice de Seletividade do APC

	CIM (µg/mL)	IC_{50} (µg/mL)		Índice de Seletividade (IC_{50}/CIM)	
		HaCat	HDFa	HaCat	HDFa
E. coli	1.500	693,57	2.814,75	0,5	1,9
S. aureus	1.875			0,4	1,5
P. aeruginosa	938			0,7	3,0
S. epidermides	938			0,7	3,0

Fonte: Autor

CIM: concentração inibitória mínima (concentração bacteriostática), IC_{50}: concentração inibitória em 50% das células

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

5.3.1 Especificidade e Seletividade

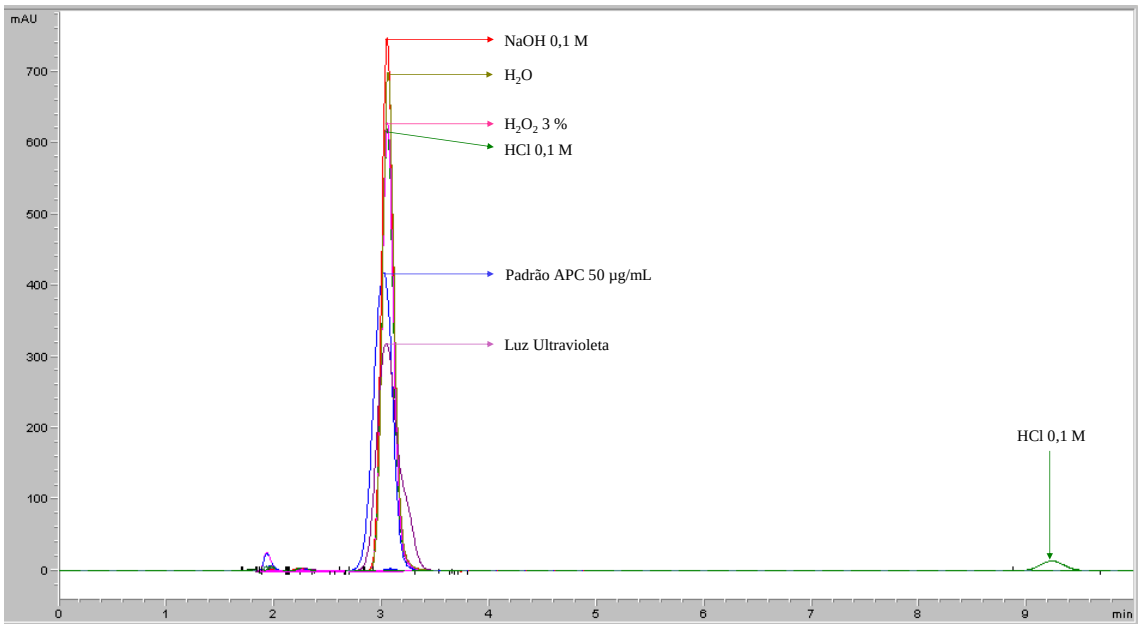
A especificidade do método foi demonstrada por meio de sua capacidade em identificar e quantificar o APC em solução com agentes degradantes, mantida 8 horas a 80 °C. A seletividade do método foi demonstrada pela análise da emulsão sem APC em solução com os mesmos agentes degradantes e sob as mesmas condições de tempo e temperatura. Após esse período as áreas dos picos foram comparadas para verificar a existência de estruturas com mesmo tempo de retenção, que pudessem interferir no método. A concentração de APC foi calculada com base na equação de linearidade y = 99,847 + 31,922.

As curvas cromatográficas sugerem que o APC foi suscetível a degradação sob condições extremas de tempo e temperatura (8 horas a 80 °C) em meio aquoso, alcalino, ácido, oxidante e sob luz ultravioleta (ANVISA, 2008); (BRASIL, 2017) (Figura 33).

Tabela 13. Comparação entre as áreas das emulsões ECPC310817#4 (0,10% de APC) e ECPC310817#PL (sem APC), mantidas 8 horas a 80 °C sob condições de degradação

Amostra	Agente degradante	Área
ECPC310817#4	NaOH 0,1 M	5899,979
(0,10% de APC)	HCl 0,1M	4859,568
	H_2O_2 3%	4918,436
	H_2O	5537,827
	Luz Ultravioleta	4773,456
ECPC310817#PL	NaOH 0,1 M	0
(sem APC)	HCl 0,1M	0
	H_2O_2 3%	0
	H_2O	0
	Luz Ultravioleta	0

Fonte: Autor



Fonte: Ramos W.S.

Figura 33. Comparação entre as curvas cromatográficas do padrão de APC 50 µg/mL e dos agentes degradantes, obtidas por CLAE a 310 nm

5.3.2 Linearidade

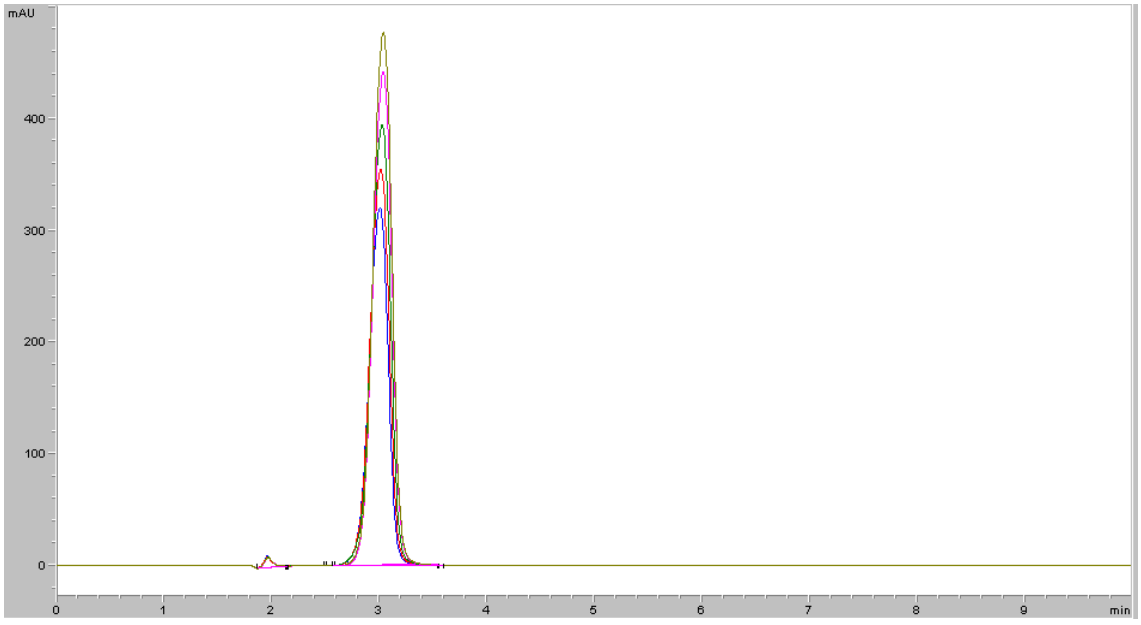
5.3.2.1 Linearidade em Etanol

A equação de linearidade do APC em etanol (y = ax + b) foi determinada através da regressão linear de três curvas analíticas, utilizando BioEstat® 5.0. O método foi linear entre 40 – 60 µg/mL (p < 0,0001) (GUEDES, 2008); (BRASIL, 2017) (Figura 35). Considerando nível de significância de 0,05 (α = 0,05), o F de significância dos resíduos foi de 1,0261E-17, ou seja, menor que o valor de α. Dessa forma podemos inferir que a regressão linear foi significativa (Tabela 15).

Tabela 14. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em etanol (p<0,0001), BioEstat® 5.0

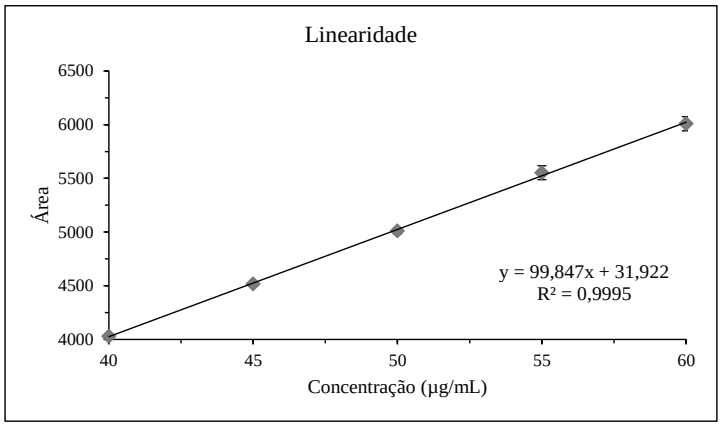
	Intercepto com eixo Y	Inclinação da curva analítica	R^2
Curva 1	-63,076	101,97	0,9994
Curva 2	236,46	95,11	0,9995
Curva 3	-77,618	102,46	0,9985
M	31,922	99,847	0,9991
DP	177,2843	4,1082	0,0006

Fonte: Autor



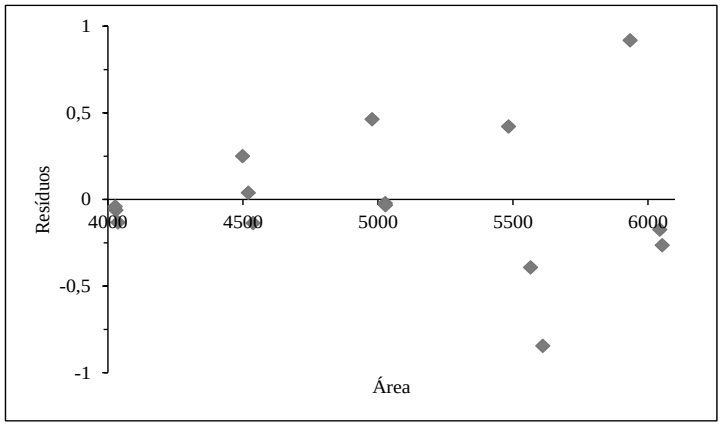
Fonte: Autor

Figura 34. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações de 40, 45, 50, 55 e 60 µg/mL em etanol, obtidas por CLAE a 310 nm



Fonte: Autor

Figura 35. Gráfico de Linearidade do APC em etanol



Fonte: Autor

Figura 36. Gráfico de resíduos da Linearidade em etanol

Tabela 15. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em etanol (p 0,05)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9985
R-Quadrado	0,9969
R-quadrado ajustado	0,9967
Erro padrão	0,4214
Observações	15

	gl	SQ	MQ	F	F $_{\text{de significação}}$
Regressão	1	747,6913	747,6913	4210,1961	1,0261E-17
Resíduo	13	2,3087	0,1776		
Total	14	750,0000			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	Valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	-0,1648	0,7807	-0,2111	0,8361	-1,8515	1,5219	-1,8515	1,5219
Área	0,0100	0,0002	64,8860	1,02605E-17	0,0097	0,0103	0,0097	0,0103

Fonte: Autor

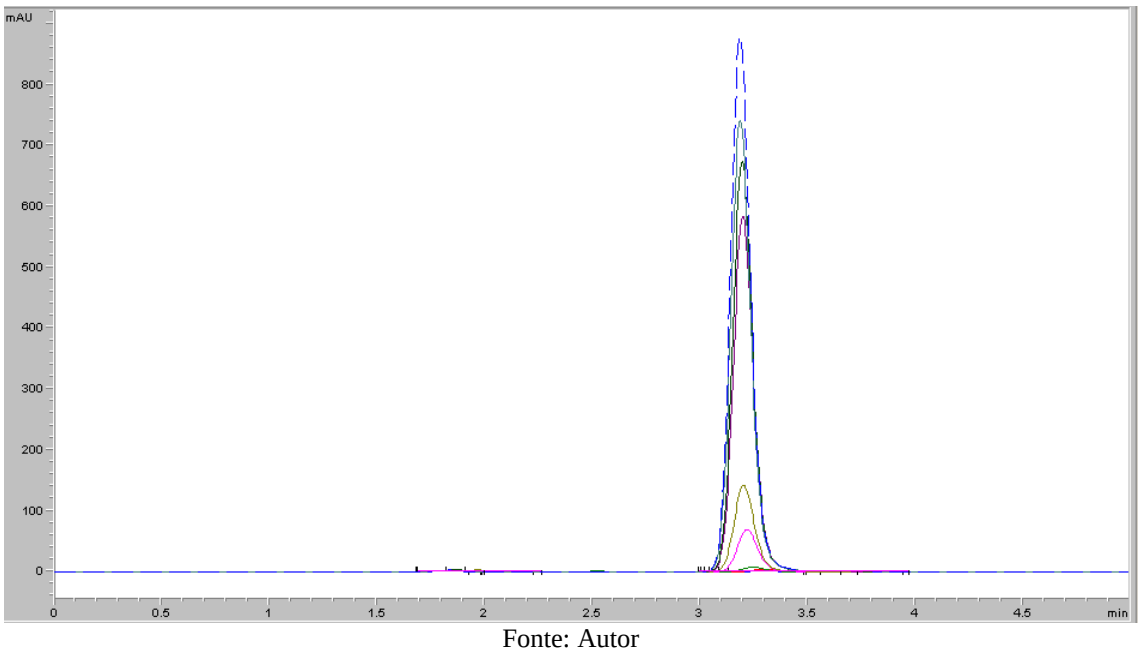
5.3.2.2 Linearidade em Tampão Fosfato (pH = 7,4) (*sink conditions*)

A equação de linearidade do APC em tampão fosfato pH = 7,4 (y = ax + b) foi determinada através da regressão linear de três curvas analíticas, utilizando BioEstat® 5.0. O método foi linear entre 0,025 – 60 µg/mL (p < 0,0001) (GUEDES, 2008) (BRASIL, 2017) (Figura 38). Considerando nível de significância de 0,05 (α = 0,05), o F de significância dos resíduos foi de 1,9459E-44, ou seja, menor que o valor de α. Dessa forma podemos inferir que a regressão linear foi significativa (Tabela 17).

Tabela 16. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em tampão fosfato pH = 7,4 (p<0,0001), BioEstat® 5.0

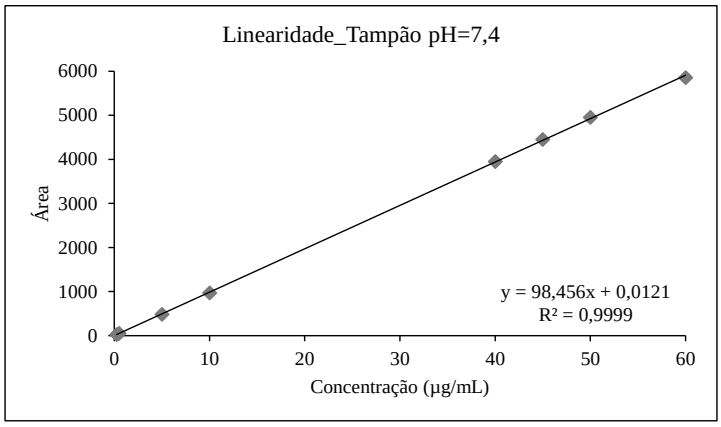
	Intercepto com eixo Y	Inclinação da curva analítica	R^2
Curva 1	3,6715	98,38	0,9999
Curva 2	2,7532	98,47	0,9999
Curva 3	-6,3886	98,52	0,9998
M	0,0120	98,456	0,9999
DP	5,5621	0,0688	0,0001

Fonte: Autor



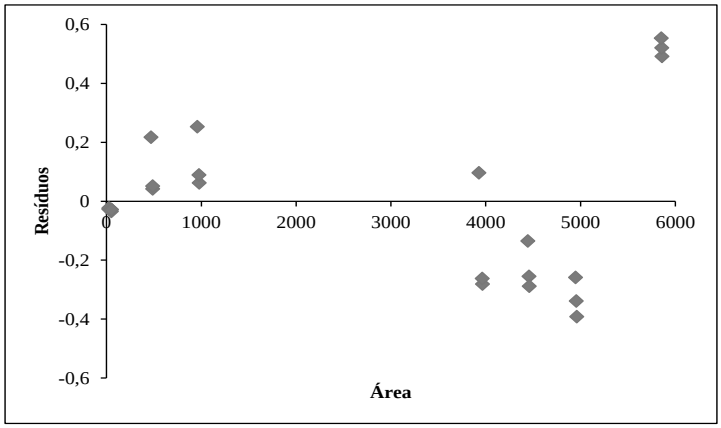
Fonte: Autor

Figura 37. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações 0,025, 0,25, 0,5, 5, 10, 40, 45, 50 e 60 µg/mL em tampão fosfato pH = 7,4, obtidas por CLAE a 310 nm



Fonte: Autor

Figura 38. Gráfico de Linearidade do APC em tampão fosfato pH = 7,4



Fonte: Autor

Figura 39. Gráfico de resíduos da Linearidade em tampão fosfato pH = 7,4

Tabela 17. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em tampão fosfato pH = 7,4 (p 0,05)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9999
R-Quadrado	0,9999
R-quadrado ajustado	0,9999
Erro padrão	0,2706
Observações	24

	gl	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	12893,49059	12893,49059	176078,2316	1,9459E-44
Resíduo	22	1,610970251	0,073225921		
Total	23	12895,10156			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	Valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	0,0032	0,0836	0,0379	0,9701	-0,1702	0,1766	-0,1702	0,1766
ÁREA	0,0102	2,4202E-05	419,6168	1,9459E-44	0,0101	0,0102	0,0101	0,0102

Fonte: Autor

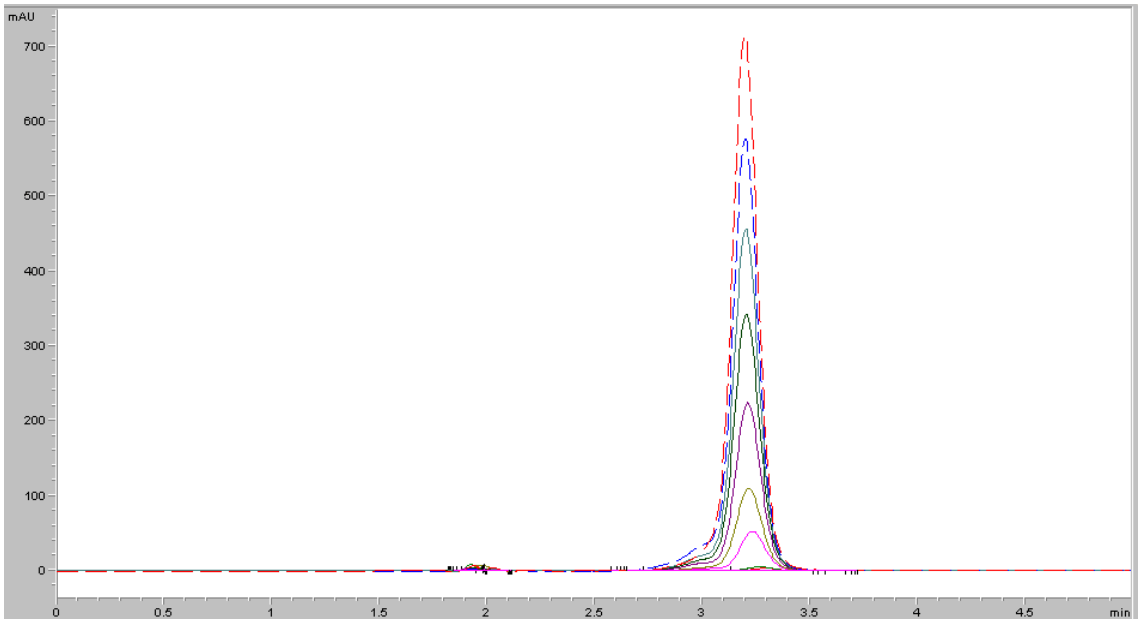
5.3.2.3 Linearidade em Metanol

A equação de linearidade do APC em metanol (y = ax + b) foi determinada através da regressão linear de três curvas analíticas, utilizando BioEstat® 5.0. O método foi linear entre 0,025 – 60 µg/mL (p < 0,0001) (GUEDES, 2008); (BRASIL, 2017) (Figura 41). Considerando nível de significância de 0,05 (α = 0,05), o F de significância dos resíduos foi de 5,3566E-44, ou seja, menor que o valor de α. Dessa forma podemos inferir que a regressão linear foi significativa (Tabela 19).

Tabela 18. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas de linearidade do APC em metanol (p<0,0001), BioEstat® 5.0

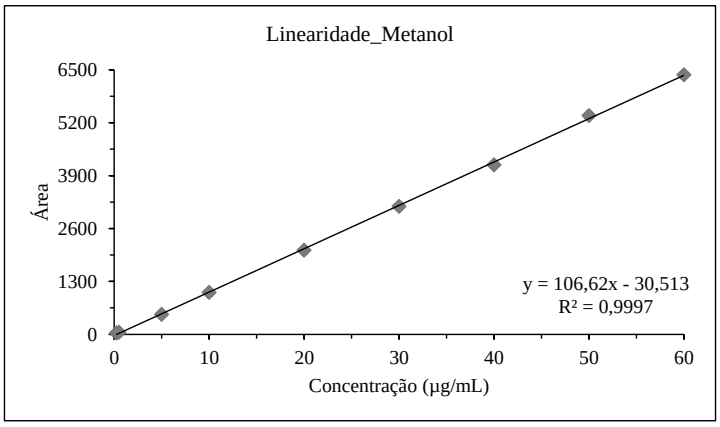
	Intercepto com eixo Y	Inclinação da curva analítica	R^2
Curva 1	-24,157	106,11	0,9997
Curva 2	-32,395	107,22	0,9995
Curva 3	-34,986	106,53	0,9997
M	-30,513	106,62	0,9996
DP	5,6546	0,5604	0,0001

Fonte: Autor



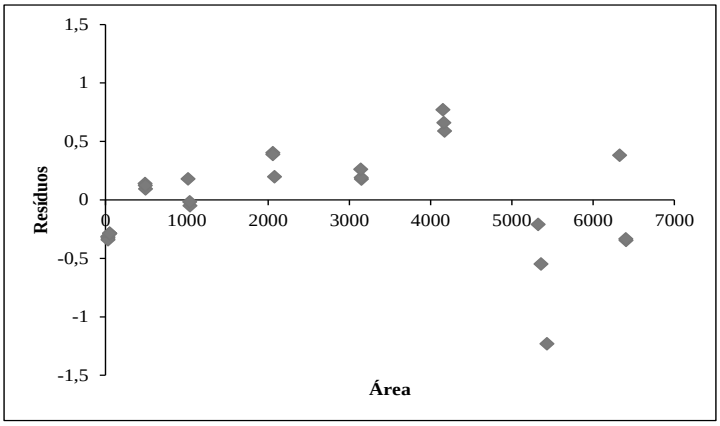
Fonte: Autor

Figura 40. Curvas cromatográficas de linearidade do APC nas concentrações 0,025, 0,25, 0,5, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µg/mL em metanol, obtidas por CLAE a 310 nm



Fonte: Autor

Figura 41. Gráfico de Linearidade do APC em metanol



Fonte: Autor

Figura 42. Gráfico de resíduos da Linearidade em metanol

Tabela 19. Análise de variância (ANOVA) dos resíduos - linearidade em metanol (p 0,05)

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,9998
R-Quadrado	0,9996
R-quadrado ajustado	0,9996
Erro padrão	0,4358
Observações	27

	gl	SQ	MQ	F	F $_{\text{de significação}}$
Regressão	1	11855,16883	11855,16883	62424,01003	5,3566E-44
Resíduo	25	4,747840142	0,189913606		
Total	26	11859,91667			

	Coeficientes	Erro padrão	Stat t	Valor-P	95% inferiores	95% superiores	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interseção	0,2957	0,1265	2,3363	0,0278	0,0350	0,5563	0,0350	0,5563
Área	0,0094	3,7523E-05	249,8480	5,3566E-44	0,0093	0,0095	0,0093	0,0095

Fonte: Autor

5.3.3 Precisão

Observamos que a interação entre as análises realizadas em dias diferentes foi estatisticamente significativa ao nível de 5%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os resultados dos dois dias de análises (p-valor 0,89). Dessa forma como o F calculado (0,0180) foi menor que o F crítico (4,9646), podemos inferir que a hipótese nula (H_0) foi aceita, ou seja, a variância dos resultados nos dias 1 e 2 foram iguais e o método foi considerado preciso (BRASIL, 2017).

Tabela 20. Análise de variância (ANOVA) entre dois dias de análise de precisão

Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
Dia_1	6	30655,9100	5109,3183	3543,6910
Dia_2	6	30618,9600	5103,1600	9097,5399

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	p-valor	$F_{crítico}$
Entre grupos	113,7752	1	113,7752	0,0180	0,8959	4,9646
Dentro dos grupos	63206,1545	10	6320,6154			
Total	63319,9297	11				

Fonte: Autor

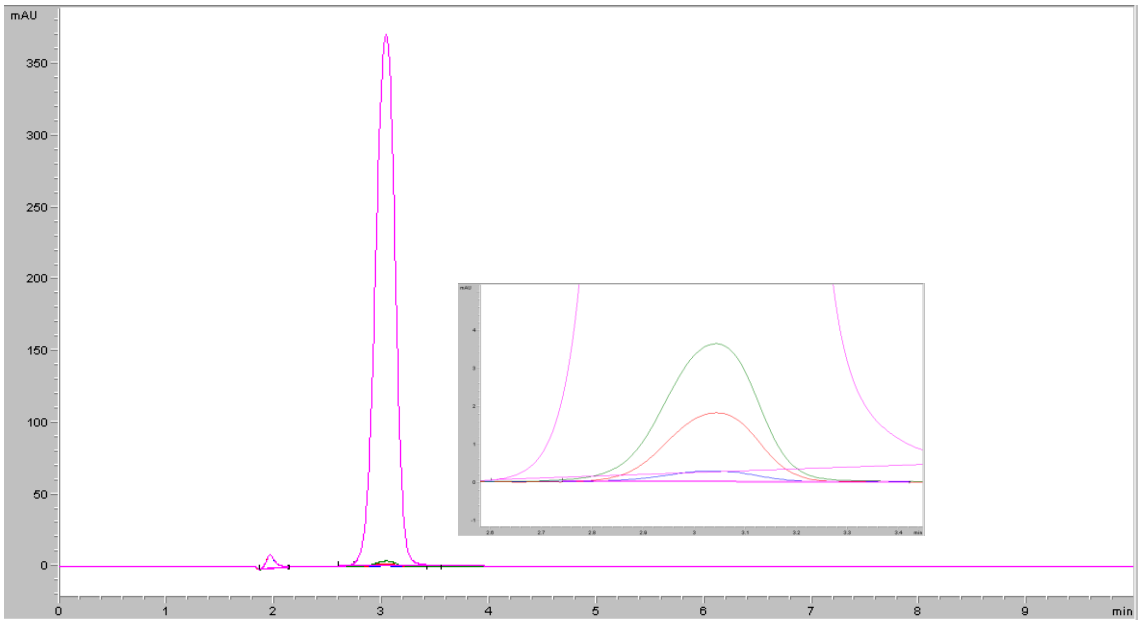
5.3.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base no desvio padrão dos interceptos com o eixo Y e na média da inclinação das curvas analíticas. Os valores de LD e LQ do APC foram determinados pelas Equações 5 e 6 em 0,00873 e 0,02646 µg/mL, respectivamente (BRASIL, 2017).

Tabela 21. Valores de intercepto com eixo Y e inclinação das curvas analíticas para cálculo de LD e LQ

	Intercepto com eixo Y	Inclinação da curva analítica	R^2
Curva 1	5,117	99,97	1
Curva 2	4,888	100,51	1
Curva 3	4,584	102,29	1
M	4,863	100,92	-
DP	0,2671	1,2140	-

Fonte: Autor



Fonte: Autor

Figura 43. Curvas cromatográficas para cálculo de LD e LQ do APC nas concentrações 0,023, 0,23, 0,46 e 46 µg/mL em etanol, obtidas por CLAE a 310 nm

5.3.5 Exatidão

As porcentagens de recuperação do APC nas emulsões foram obtidas pela relação entre a concentração teórica (CT) e concentração média experimental (CME). Os resultados estão de acordo com o preconizado pela Anvisa, que estabelece porcentagem de recuperação entre 80 – 110%. Dessa forma o método analítico foi considerado exato para as amostras analisadas (BRASIL, 2017).

Tabela 22. Porcentagem de recuperação do APC para cálculo de exatidão

CT (µg/mL)	CME (µg/mL)	% recuperação	DPR (%)
40,00	40,71	101,76 ± 0,41%	0,407
50,00	51,60	103,20 ± 0,23%	0,227
60,00	61,63	102,71 ± 2,31%	2,252

Fonte: Autor

5.3.6 Robustez

A robustez do método analítico foi verificada com base na porcentagem de recuperação do APC. Os resultados indicam que o método foi robusto uma vez que o

percentual de recuperação esteve entre 80-100% como preconizado pela legislação vigente (BRASIL, 2017).

Tabela 23. Porcentagem de recuperação do APC para cálculo de robustez

Variáveis	CT (µg/mL)	CME (µg/mL)	% recuperação
Vazão da fase móvel	50,00	51,64	103,07 ± 2,00%
Proporção da Fase Móvel	50,00	51,73	103,23 ± 0,73%
Comprimento de onda	50,00	50,00	99,78 ± 2,98%
Fabricante de Etanol	50,00	51,35	102,47 ± 0,94%
pH da Fase Móvel	50,00	51,57	102,92 ± 0,30%
Coluna cromatográfica	50,00	52,10	103,98 ± 1,19%

Fonte: Autor

5.4 Desenvolvimento das emulsões cosméticas

As características qualitativas de aparência, cor, odor, separação de fases e microscopia das 5 formulações desenvolvidas na primeira etapa mantiveram-se inalteradas. Algumas formulações apresentaram variação de pH entre 5 e 15%, sendo descartadas aquelas com variação superior a 5%. A viscosidade aparente das formulações foi diretamente proporcional à concentração de álcool cetoestearílico (4, 6 e 8%). Dessa forma, foi escolhida a concentração de 6% de álcool cetoestearílico pois a proposta do projeto foi desenvolver uma emulsão que pudesse ser facilmente aplicada na face ou região dos olhos. O APC foi melhor solubilizado em propilenoglicol do que em glicerina.

5.4.1 Desenvolvimento do processo de fabricação

Os tempos de processo de fabricação em uma ou duas fases não foram significativamente diferentes (CORRÊA, 2012). Porém quando se pensa em processo em maiores escalas, há uma tendência para processos em uma fase, onde os rendimentos podem ser maximizados. Dessa forma, foi escolhido o processo em uma fase para continuar no projeto.

5.4.2 Avaliação da estabilidade acelerada

Após o estudo de Estabilidade Preliminar e etapa de seleção, as fórmulas ECPC310817#PL (sem APC), ECPC310817#1 (0,04% de APC), ECPC310817#2 (0,06% de APC), ECPC310817#3 (0,08% de APC) e ECPC310817#4 (0,10% de APC) foram submetidas ao estudo de Estabilidade Acelerada por 3 meses nas condições preestabelecidas (Quadro 3 e Quadro 4) (Tabela 24).

Tabela 24. Resumo das análises feitas durante o estudo de Estabilidade Acelerada

	PL	#1	#2	#3	#4
Aparência	✓	✓	✓	✓	✓
Cor	✓	✓	✓	✓	✓
Odor	✓	✓	✓	✓	✓
Viscosidade (mPas)	✓	✓	✓	✓	✓
Separação de fases	✓	✓	✓	✓	✓
pH	✓	✓	✓	✓	✓
Teor de APC					✓

Fonte: Autor

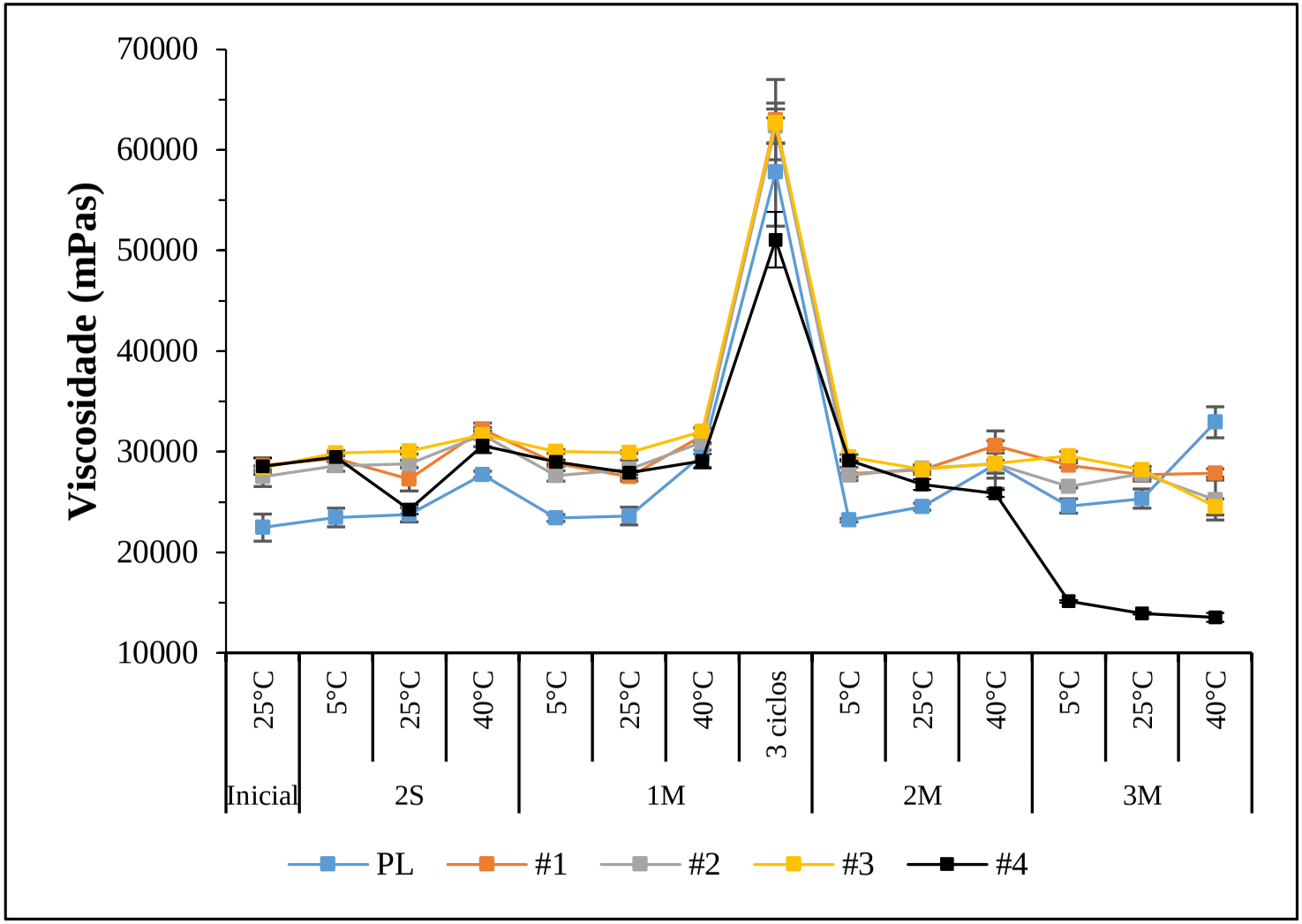
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

5.4.2.1 Avaliação da aparência, cor e odor das emulsões

As amostras ECPC310817#PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC) e #4 (0,10% de APC) mantidas a 5, 25 e 40 °C, não apresentaram alterações na aparência, cor e odor, durante os 3 meses de estudo de estabilidade. A amostra ECPC310817#4 mantida a 40 °C apresentou perda de água no 2° e 3° meses. As amostras submetidas aos ciclos F/T apresentaram perda de brilho (ANVISA, 2008).

5.4.2.2 Avaliação da viscosidade das emulsões

A viscosidade inicial das emulsões contendo APC não apresentou variação entre si, porém foi diferente da viscosidade da emulsão sem APC. Esse fato pode estar relacionado aos valores de pH das emulsões com e sem APC. Os ciclos de congelamento e descongelamento interferem diretamente no incremento da viscosidade das emulsões, independentemente de conterem ou não o APC (Tabela 25). A amostra ECPC310817#4 (0,10% de APC) apresentou diminuição no valor da viscosidade no 3° mês, para todas as temperaturas estudadas (Figura 44) (ANVISA, 2008); (SCHRAMM, 2006).



Fonte: Autor

Figura 44. Gráfico de viscosidade das emulsões durante estudo de Estabilidade Acelerada, mPas

2S (2 semanas), 1M (1 mês), 2M (2 meses), 3M (3 meses), PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

Tabela 25. Valores de viscosidade das emulsões ECPC310817#PL, #1, #2, #3 e #4 durante estudo de Estabilidade Acelerada, mPas (*M* ± *DP*)

Temperatura	Tempo	PL	#1	#2	#3	#4
5 °C	2S	23.467 ± 945	29.333 ± 231	28.600 ± 529	29.867 ± 231	29.467 ± 462
	1M	23.400 ± 346	28.867 ± 306	27.600 ± 529	30.000 ± 200	29.000 ± 200
	2M	23.200 ± 200	27.800 ± 800	27.667 ± 231	29.467 ± 306	29.133 ± 115
	3M	24.600 ± 721	28.667 ± 231	26.533 ± 115	29.600 ± 400	15.133 ± 115
	Média	*23.667 ± 632*	*28.667 ±642*	*27.600 ± 845*	*29.733 ± 243*	*25.683 ± 7.036*
	DPR	*0,0267*	*0,0224*	*0,0306*	*0,0082*	*0,2740*
25 °C	T0	22.467 ± 1.332	28.667 ± 702	27.533 ± 1.007	28.400 ± 200	28.533 ± 833
	2S	23.733 ± 702	27.267 ± 1.155	28.800 ± 346	30.067 ± 306	24.267 ± 462
	1M	23.600 ± 872	27.533 ± 462	28.267 ± 902	29.933 ± 115	27.933 ± 231
	2M	24.533 ± 416	28.200 ± 529	28.333 ± 416	28.267 ± 306	26.733 ± 643
	3M	25.333 ± 945	27.733 ± 416	27.800 ± 721	28.200 ± 346	13.933 ± 115
	Média	*23.933 ± 1075*	*27.880 ± 557*	*28.147 ± 493*	*28.973 ± 941*	*24.280 ± 6.011*
	DPR	*0,0449*	*0,0200*	*0,0175*	*0,0325*	*0,2476*
40 °C	2S	27.733 ± 306	32.200 ± 200	31.667 ± 416	31.667 ± 1.172	30.600 ± 721
	1M	29.667 ± 1.222	31.600 ± 800	30.933 ± 757	32.000 ± 346	29.067 ± 702
	2M	28.733 ± 2.914	30.600 ± 1.778	28.800 ± 1.732	28.867 ± 1.222	25.867 ± 416
	3M	32.933 ± 1.553	27.867 ± 416	25.200 ± 2.000	24.533 ± 808	13.533 ± 416
	Média	*29.767 ± 2.254*	*30.567 ± 1.917*	*29.150 ± 2.901*	*29.267 ± 3.454*	*24.767 ± 7.744*
	DPR	*0,0757*	*0,0627*	*0,0995*	*0,1180*	*0,3127*
	3 Ciclos FT	57.800 ± 5.381	63.000 ± 4.000	62.333 ± 1.704	62.667 ± 1.963	51.067 ± 2.759
	DPR	*0,0931*	*0,0635*	*0,0273*	*0,0313*	*0,0540*

Fonte: Autor

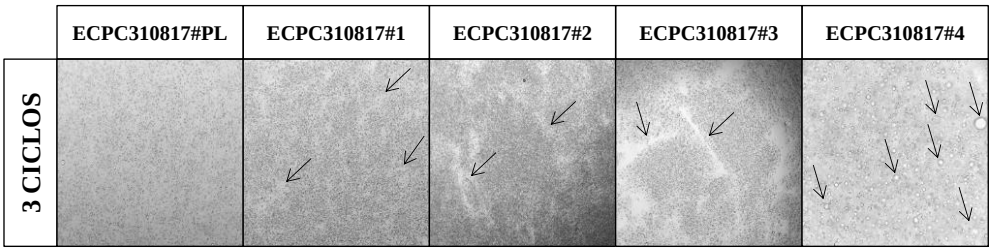
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

5.4.2.3 Avaliação da separação de fases das emulsões

Não houve separação de fases das emulsões mantidas a 5, 25 e 40 °C durante os 3 meses de estudo de Estabilidade Acelerada e também nas amostras submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento (ANVISA, 2008).

5.4.2.4 Avaliação e caracterização microscópica das emulsões

As amostras ECPC310817#1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC) e #3 (0,08% de APC) submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, apresentaram alteração estrutural semelhante a estrias quando observadas ao microscópio. A amostra ECPC310817#4 (0,10% de APC) submetida aos mesmos ciclos, apresentou pequeno aumento no tamanho das gotículas da fase dispersa, o que não foi suficiente para ocorrer coalescência e separação de fases. Todas as amostras submetidas aos ciclos de congelamento e descongelamento apresentaram perda de brilho, mas mantiveram cor e odor inalterados (Figura 45).



Fonte: Autor

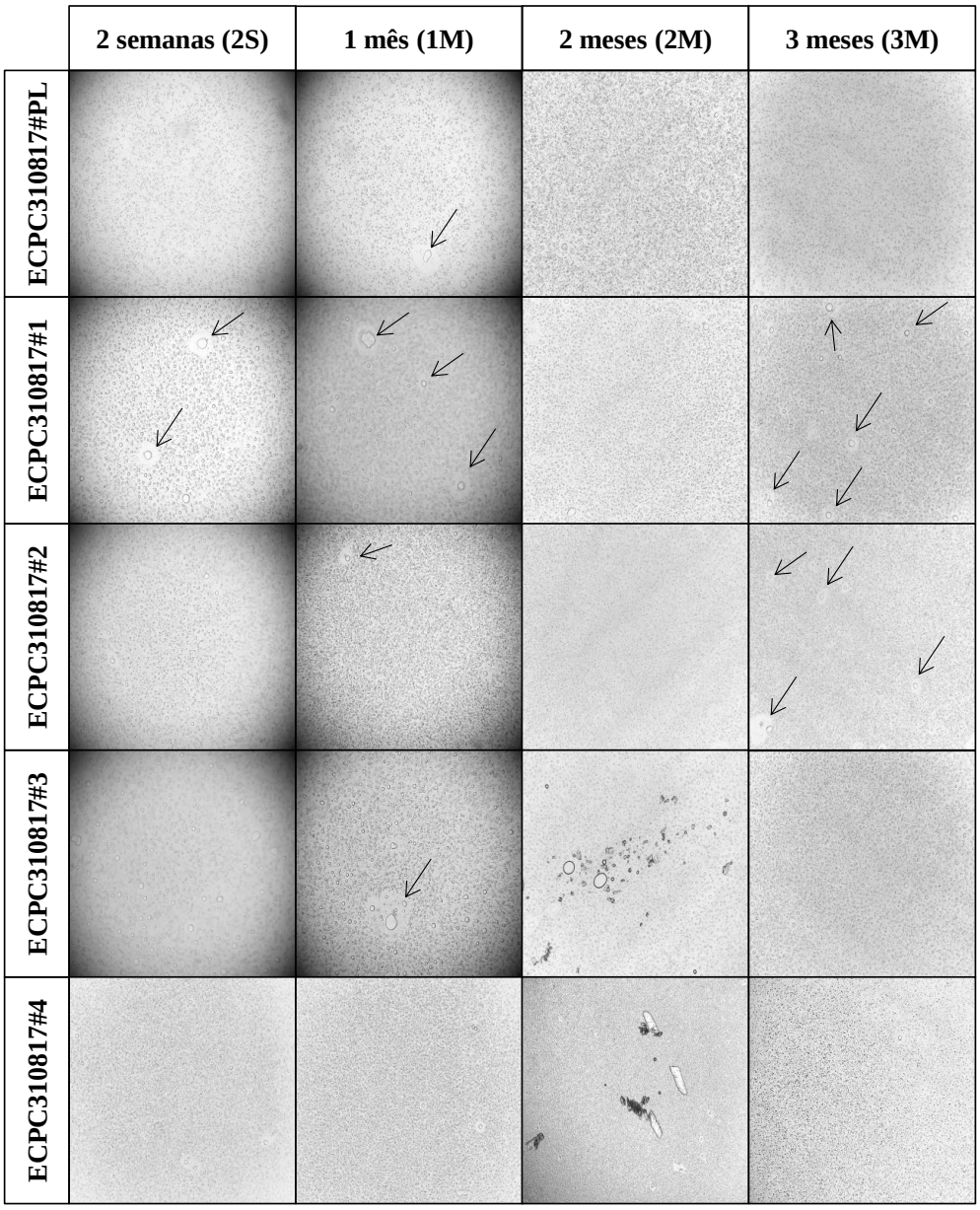
Figura 45. Microscopia das emulsões submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento, aumento de 100x
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

As amostras ECPC310817#PL (1M), ECPC310817#1 (2S, 1M e 3M), ECPC310817#2 (1M e 3M) e ECPC310817#3 (1M), mantidas a 5 °C apresentaram coalescência, porém não houve separação de fases. As amostras ECPC310817#3 (0,08% de APC) e #4 (0,10% de APC) apresentaram material recristalizado no segundo mês da estabilidade a 5 °C (Figura 46). Essa recristalização pode ter sido do APC, uma vez que a concentração do ativo na mesma amostra foi menor que nas demais amostras (0,095 ± 0,00025%) (Figura 51).

As amostras ECPC310817#PL (T0, 2S e 1M), ECPC310817#1 (1M), ECPC310817#2 (1M, 2M e 3M) e ECPC310817#4 (1M e 3M), mantidas a 25 °C

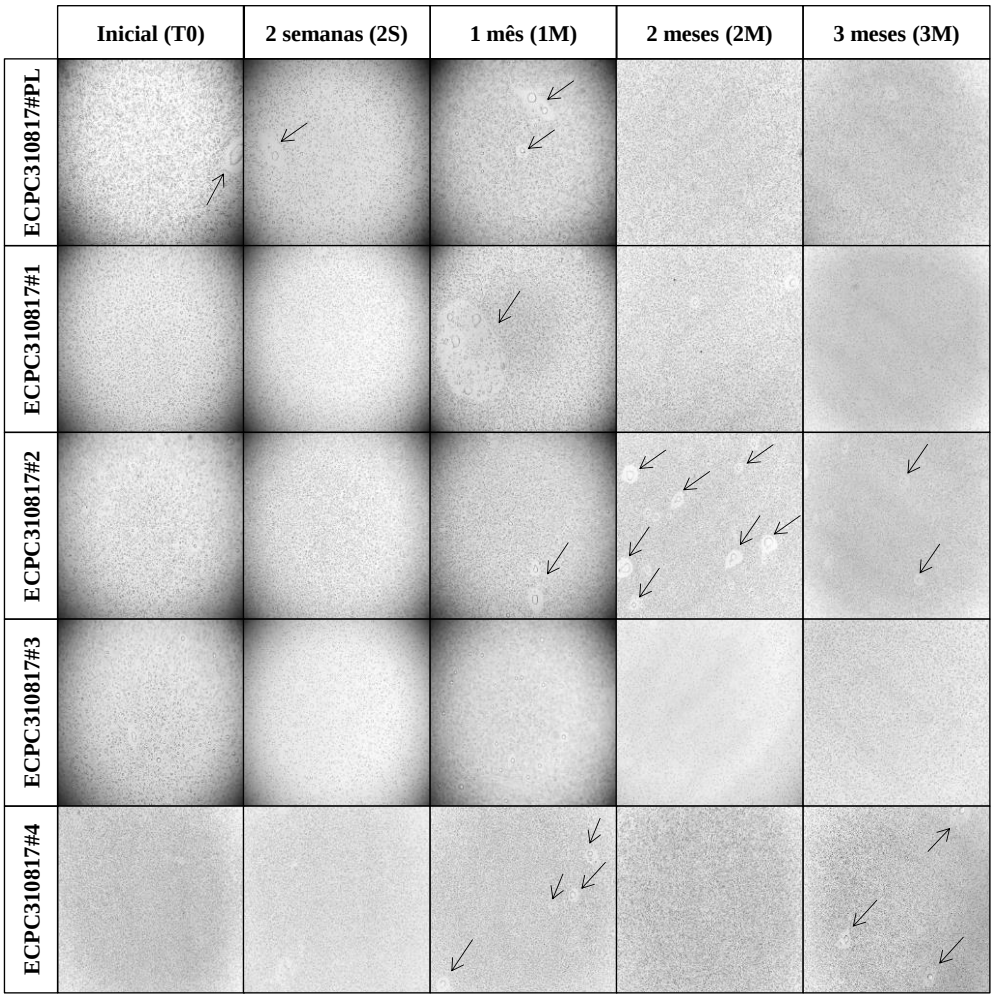
apresentaram coalescência, porém não houve separação de fases nem alterações nas características organolépticas (Figura 47).

As amostras ECPC310817#PL (2M), ECPC310817#1 (1M, 2M e 3M), ECPC310817#2 (2S, 1M, 2M e 3M), ECPC310817#3 (1M e 3M) e ECPC310817#4 (1M e 2M) mantidas a 40 °C apresentaram coalescência, porém não houve separação de fases nem alterações nas características organolépticas (Figura 48).



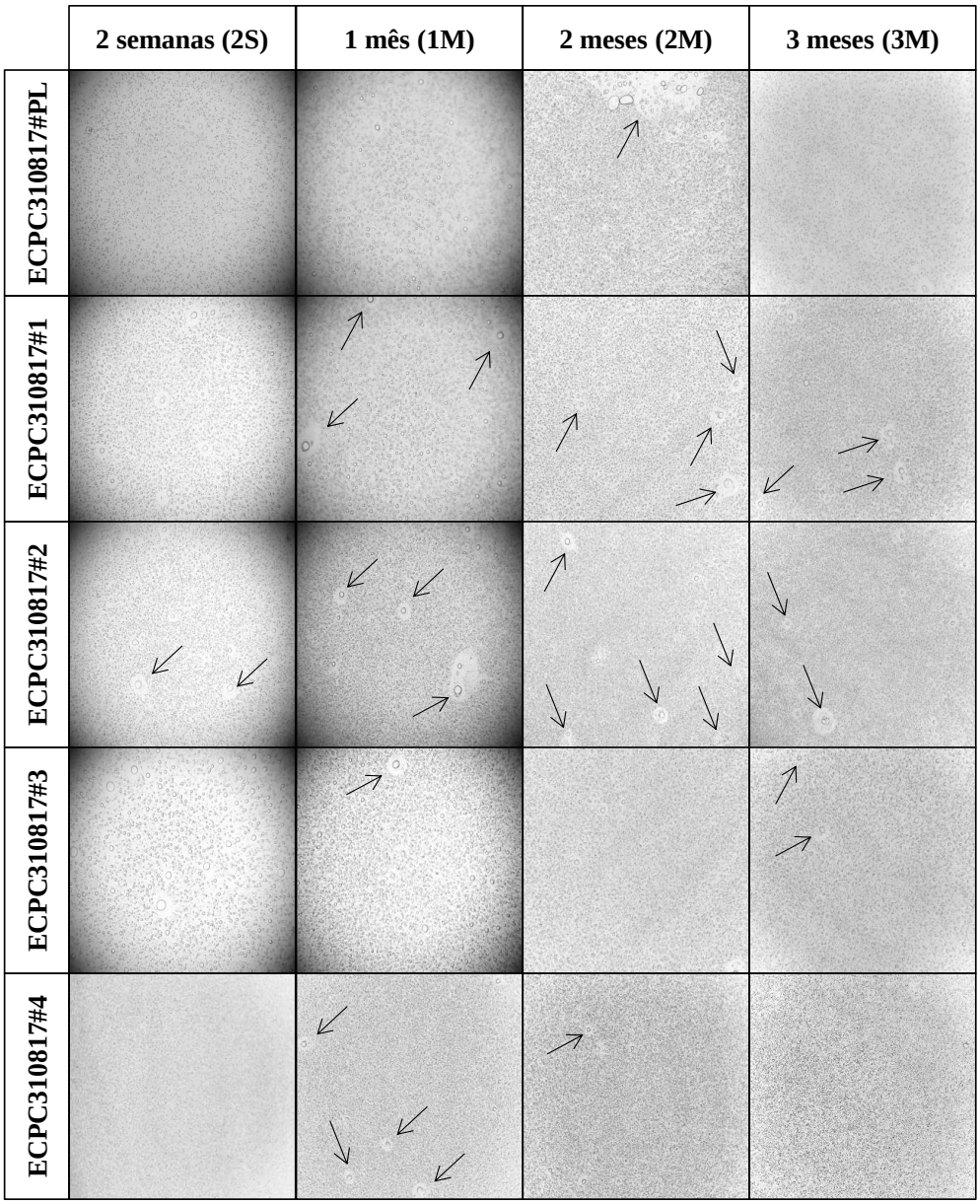
Fonte: Autor

Figura 46. Microscopia das emulsões submetidas a 5 °C por 3 meses, aumento de 100x
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)



Fonte: Autor

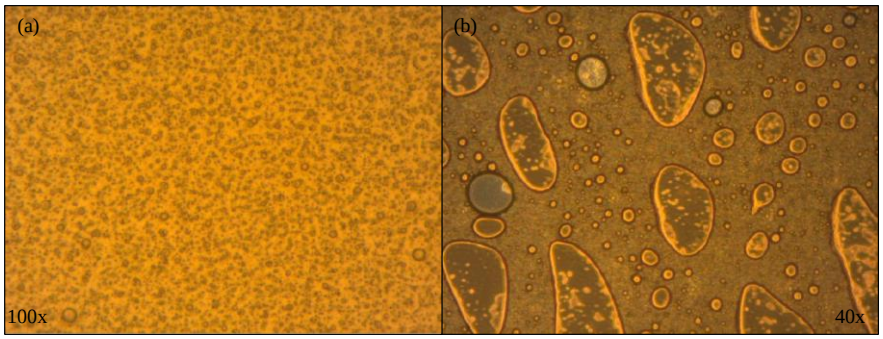
Figura 47. Microscopia das emulsões submetidas a 25 °C por 3 meses, aumento de 100x
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)



Fonte: Autor

Figura 48. Microscopia das emulsões submetidas a 40 °C por 3 meses, aumento de 100x
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

A caracterização da emulsão foi feita com uso de corantes hidro e lipofílicos. A fase dispersante (aquosa) foi evidenciada pelo corante hidrofílico (amarelo), ao passo que o corante lipofílico (marrom) formou gotículas insolúveis nessa mesma fase, o que possibilitou caracterizar a emulsão como sendo O/A (Figura 49) (CORRÊA, 2012).

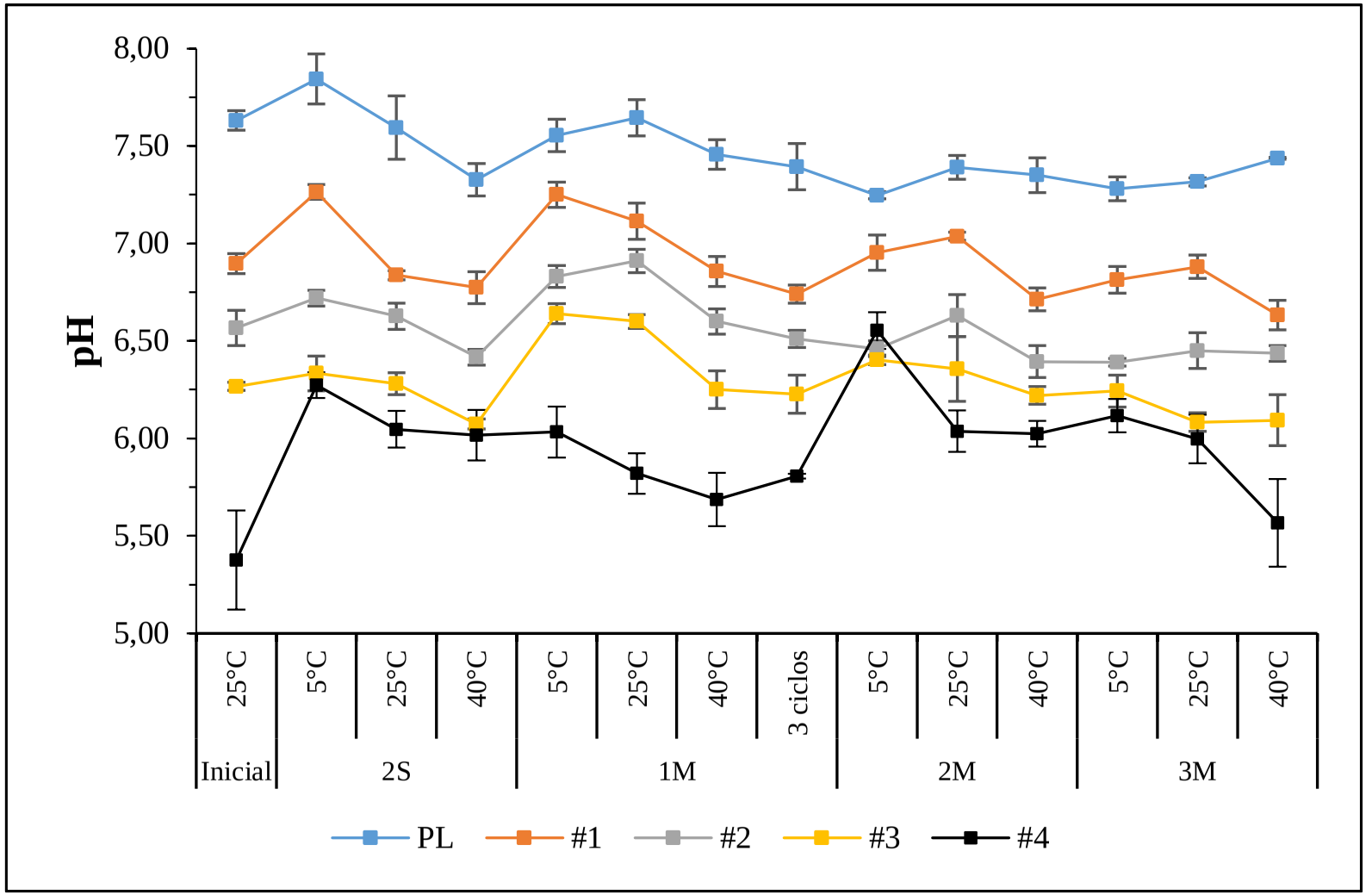


Fonte: Autor

Figura 49. Caracterização da emulsão O/A com uso de corantes (a) Amarelo Tartrazina 1%, aumento de 100x e (b) F. Brown 1%, aumento de 40x

5.4.2.5 Avaliação do pH das emulsões

Considerando os 3 meses de estabilidade e não fazendo distinção das temperaturas de estocagem, as amostras ECPC310817#PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC) e #4 (0,10% de APC) apresentaram valores de pH iguais a 7,47 ± 0,18, 6,92 ± 0,20, 6,57 ± 0,17, 6,30 ± 0,19 e 5,97 ± 0,32, respectivamente (Tabela 26). Esses valores de pH eram esperados, uma vez que o APC tem caráter ácido e está em concentrações crescentes nas formulações. Por outro a amostra placebo teve o maior valor de pH. O valor de pH da amostra ECPC310817#4 mantida a 5 °C por 2 meses (6,55 ± 0,12) não teve diferença estatisticamente significativa das amostras ECPC310817#3 (6,40 ± 0,03) e ECPC310817#2 (6,46 ± 0,05) mantidas sob a mesma temperatura e mesmo período de tempo. Como essas formulações apresentam diferentes concentrações de APC, era esperado diferença entre os valores de pH. Isso pode ter acontecido pela recristalização do APC que foi evidenciada na microscopia dessa amostra (Figura 46). As amostras submetidas a 3 ciclos de congelamento e descongelamento não apresentaram variações estatisticamente significativas nos valores de pH (Figura 50) (ANVISA, 2008).



Fonte: Autor

Figura 50. Gráfico de pH das emulsões durante estudo de Estabilidade Acelerada

2S (2 semanas), 1M (1 mês), 2M (2 meses), 3M (3 meses), PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

Tabela 26. Valores de pH das emulsões ECPC310817#PL, #1, #2, #3 e #4 durante estudo de Estabilidade Acelerada (*M* ± *DP*)

Temperatura	Tempo	PL	#1	#2	#3	#4
5 °C	2S	7,84 ± 0,13	7,26 ± 0,04	6,72 ± 0,04	6,33 ± 0,09	6,27 ± 0,07
	1M	7,55 ± 0,08	7,25 ± 0,07	6,82 ± 0,06	6,64 ± 0,05	6,03 ± 0,13
	2M	7,25 ± 0,02	6,95 ± 0,11	6,46 ± 0,05	6,40 ± 0,03	6,55 ± 0,12
	3M	7,28 ± 0,06	6,81 ± 0,07	6,39 ± 0,02	6,24 ± 0,08	6,12 ± 0,09
	Média	*7,48 ± 0,28*	*7,07 ± 0,22*	*6,60 ± 0,21*	*6,41 ± 0,17*	*6,24 ± 0,23*
	DPR	*0,0374*	*0,0311*	*0,0318*	*0,265*	*0,0368*
25 °C	T0	7,63 ± 0,05	6,90 ± 0,05	6,57 ± 0,09	6,27 ± 0,02	5,38 ± 0,25
	2S	7,59 ± 0,16	6,84 ± 0,02	6,63 ± 0,07	6,28 ± 0,06	6,05 ± 0,09
	1M	7,64 ± 0,09	7,11 ± 0,09	6,91 ± 0,06	6,60 ± 0,04	5,82 ± 0,10
	2M	7,39 ± 0,08	7,04 ± 0,03	6,63 ± 0,13	6,36 ± 0,20	6,04 ± 0,13
	3M	7,32 ± 0,02	6,88 ± 0,06	6,45 ± 0,09	6,08 ± 0,05	6,00 ± 0,13
	Média	*7,51 ± 0,15*	*6,95 ± 0,12*	*6,64 ± 0,17*	*6,32 ± 0,19*	*5,86 ± 0,28*
	DPR	*0,0200*	*0,0173*	*0,0256*	*0,0301*	*0,0478*
40 °C	2S	7,33 ± 0,08	6,77 ± 0,08	6,42 ± 0,04	6,07 ± 0,03	6,02 ± 0,13
	1M	7,46 ± 0,08	6,86 ± 0,08	6,60 ± 0,07	6,25 ± 0,10	5,69 ± 0,14
	2M	7,35 ± 0,11	6,71 ± 0,07	6,39 ± 0,10	6,22 ± 0,06	6,02 ± 008
	3M	7,44 ± 0,01	6,63 ± 0,08	6,44 ± 0,04	6,09 ± 0,13	5,57 ± 0,23
	Média	*7,39 ± 0,06*	*6,74 ± 0,09*	*6,46 ± 0,09*	*6,16 ± 0,09*	*5,82 ± 0,23*
	DPR	*0,0081*	*0,0133*	*0,0139*	*0,0146*	*0,0395*
	FT	7,39 ± 0,12	6,74 ± 0,05	6,51 ± 0,04	6,23 ± 0,10	5,81 ± 0,01
	DPR	*0,0162*	*0,0074*	*0,0061*	*0,0160*	*0,0017*

Fonte: Autor

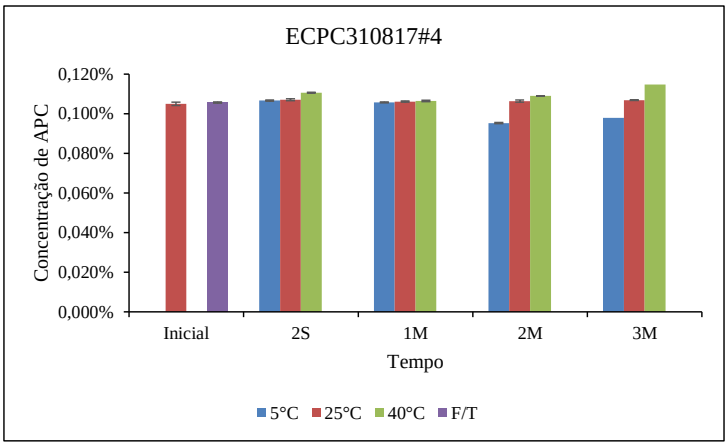
PL (sem APC), #1 (0,04% de APC), #2 (0,06% de APC), #3 (0,08% de APC), #4 (0,10% de APC)

5.4.2.6 Avaliação do teor de APC das emulsões

As amostras foram analisadas de acordo com as condições preestabelecidas no estudo de Estabilidade Acelerada.

A amostra mantida a 40 °C por 3 meses apresentou perda de água e as amostras mantidas a 5 °C por 2 e 3 meses apresentaram indícios de recristalização do APC. Dessa forma foi possível inferir que o aumento na concentração do APC na emulsão mantida a

40°C por 3 meses pode estar relacionado a essa perda de água. Por outro lado pode-se inferir, também, que as diminuições nas concentrações do APC nas emulsões mantidas a 5°C por 2 e 3 meses, podem estar relacionadas a esse indício de recristalização (Figura 51) (ANVISA, 2008).



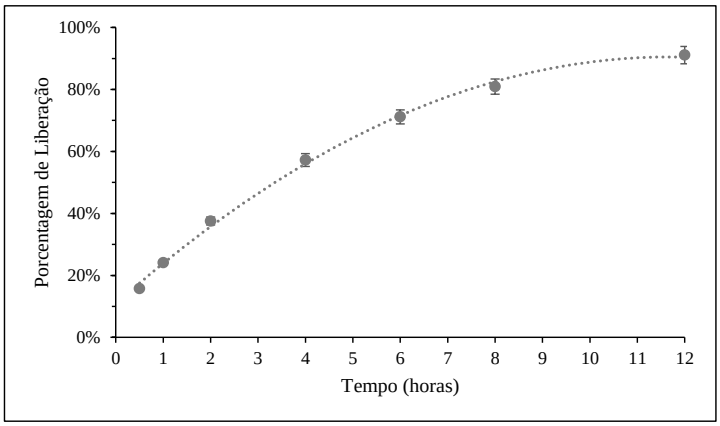
Fonte: Autor

Figura 51. Concentração de APC em porcentagem durante 3 meses de estudo de Estabilidade Acelerada

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

5.5.1 Avaliação do perfil de liberação do APC

Os resultados mostram que após 12 horas, foram liberados 91,08 ± 0,03% do APC contido na emulsão, que corresponde à 154,37 ± 4,73 µg/cm^2 ou 273,24 ± 8,37 µg/mL (OECD, 2011); (ANVISA, 2012). O resultado esperado foi adequado, uma vez que esperávamos uma liberação acima de 90%.

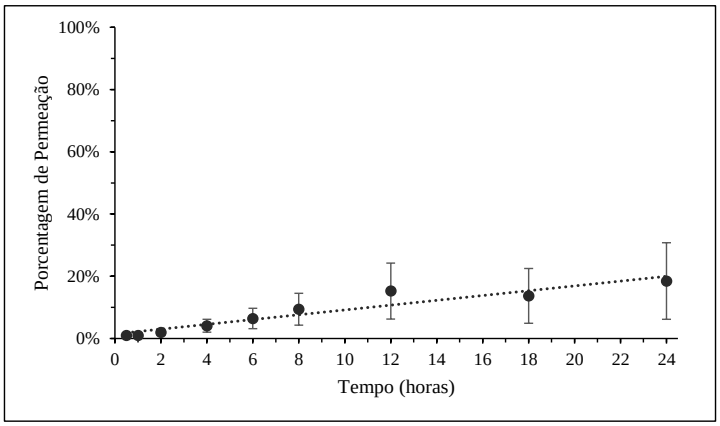


Fonte: Autor

Figura 52. Perfil de liberação do APC, emulsão ECPC310817#4, lote 130318

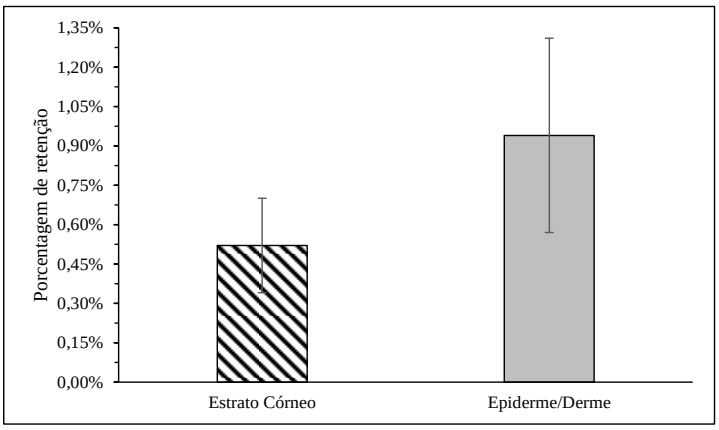
5.5.2 Avaliação da permeação e retenção do APC

Os resultados mostram que após 24 horas, foram permeados 18,47 ± 12,30% de APC e que o APC contido na emulsão foi capaz de penetrar em camadas mais profundas da pele, pois após 24 horas 0,52 ± 0,18% e 0,94 ± 0,37% estavam disponíveis no estrato córneo e na epiderme/derme, respectivamente (OECD, 2011); (ANVISA, 2012). Esses resultados sugerem que a técnica escolhida pode ter influenciado na extração do ativo da pele. Outra sugestão possível está no fato da emulsão conter propilenoglicol como solvente (CORRÊA, 2012) que pode ter facilitado a difusão do ativo pela modificação dos parâmetros de permeabilidade da pele relativamente ao APC (MARTINS; VEIGA, 2002), pois era esperado que a quantidade de APC retida no estrato córneo, epiderme/derme fosse maior que a quantidade permeada.



Fonte: Autor

Figura 53. Porcentagem de permeação cutânea do APC



Fonte: Autor

Figura 54. Porcentagem de retenção cutânea do APC no Estrato Córneo e na Epiderme/Derme

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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