



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



**Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do
ácido ursólico e sua incorporação em emulsão
cosmética**

Fernanda Cardoso Colombo

Araraquara - SP
2018

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

**Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do
ácido ursólico e sua incorporação em emulsão
cosmética**

Fernanda Cardoso Colombo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de 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
2018

Ficha Catalográfica

Elaborada por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C718a

Colombo, Fernanda Cardoso

Avaliação da eficácia e da citotoxicidade *in vitro* do ácido ursólico e sua incorporação em emulsão cosmética / Fernanda Cardoso Colombo. – Araraquara, 2018.
123 f. : il.

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

Orientador: Marcos Antonio Corrêa.

1. Ácido ursólico (AU). 2. Antioxidante. 3. Despigmentante. 4. Antimicrobiana. 5. Citotóxico.
6. CLAE. I. Corrêa, Marcos Antonio, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
3. OBJETIVOS	40
3.1. Objetivo geral	40
3.2. Objetivos específicos	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAL	41
4.2. MÉTODOS	43
4.2.1. Caracterização de MPAU	44
4.2.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU	45
4.2.3. Preparo das emulsões	55
4.2.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão	56
4.2.5. Avaliação da estabilidade das emulsões	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1. Caracterização de MPAU	65
5.1.1. Identificação qualitativa do AU por espectroscopia na região IV	65
5.1.2. Avaliação da solubilidade do AU	67
5.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU	68
5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante	68
5.2.2. Avaliação da atividade despigmentante	72
5.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	75
5.2.4. Avaliação do potencial citotóxico	79
5.3. Preparo das emulsões	81

5.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão	85
5.4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE	85
5.4.2. Validação da metodologia desenvolvida.....	90
5.5. Avaliação da estabilidade das emulsões.....	100
5.5.1. Teste de centrifugação	101
5.5.2. Aspecto, cor e odor.....	102
5.5.3. Determinação de pH.....	105
5.5.4. Determinação da viscosidade.....	106
5.5.5. Determinação do teor de AU	108
6. CONCLUSÕES	110
7. REFERÊNCIAS.....	112

RESUMO

O aumento da preocupação com a estética e saúde corporal vem elevando a demanda por produtos cosméticos contendo ativos que previnam o envelhecimento e outras alterações cutâneas. O ácido ursólico (AU), ativo natural extraído de plantas como o alecrim e o manjeriço, tem se demonstrado interessante para incorporação em cosméticos por possuir potencial antioxidante, despigmentante, propriedade antimicrobiana, entre outras. Este trabalho teve como objetivo avaliar a possibilidade da utilização do AU como um ativo cosmético multifuncional através da avaliação da eficácia e citotoxicidade *in vitro* do AU, bem como o preparo e avaliação de uma emulsão contendo o ativo. O potencial antioxidante do AU foi avaliado por meio de métodos de inibição de radicais como o 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) e o 2,2 -azino bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}), tendo demonstrado atividade antioxidante, com IC₅₀ de 235,61 µg/mL para técnica com DPPH[•] e 107,17 µg/mL para técnica com ABTS^{•+}. A atividade despigmentante foi verificada através da inibição da enzima tirosinase, utilizando 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) como substrato, e apresentando como resultado um IC₅₀ de 338,00 µg/mL. Para a avaliação da atividade antimicrobiana diversas cepas foram testadas a partir da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) pela técnica de diluição em microplacas, e da concentração bactericida mínima (CBM) pela replicação em placa de Petri, seguindo suplemento M100-S16 do CLSI. O AU demonstrou atividade antimicrobiana frente a cepa *S.aureus* com CIM de 25 µg/mL e CMB de 50 µg/mL; para *S. epidermides* com CIM de 25 µg/mL e CBM de 50 µg/mL; para *E.coli*, com CIM de 50 µg/mL e CBM de 50 µg/mL; a cepa *P. aeruginosa* revelou uma CIM de 25 µg/mL e CBM= 0. O potencial citotóxico *in vitro* foi avaliado através de técnica utilizando o corante 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)- (MTT) e queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes, não tendo demonstrado citotoxicidade às células em uma concentração máxima de 50 µg/mL. Para incorporação em cosmético foi escolhida uma emulsão de alta estabilidade e como técnica de controle de qualidade do AU nessa emulsão foi desenvolvida e validada uma metodologia analítica por CLAE, utilizando os preceitos de química verde. Um estudo de estabilidade preliminar da emulsão preparada foi conduzido a fim de se avaliar a estabilidade do AU em uma emulsão estável frente a condições extremas, como temperaturas de 25, 40 e 5 °C, luz indireta e ciclos de congelamento/ descongelamento. A emulsão preparada com AU demonstrou estabilidade para as características de pH e viscosidade, e com relação ao teor, foi mais estável a temperatura de 25 e 5 °C. O AU, através dos ensaios *in vitro* realizados demonstrou caráter antioxidante, despigmentante e antimicrobiano, não sendo observada citotoxicidade às células utilizadas na faixa de concentração testada, além de ter demonstrado certa estabilidade na emulsão de escolha. Como pôde ser observado, este composto multifuncional demonstrou características *in vitro* de grande interesse para ser utilizado como ativo cosmético de uso tópico e possivelmente como um agente antimicrobiano, sendo assim necessário estudos mais aprofundados que possam garantir sua completa segurança e eficácia de uso.

Palavras-chave: ácido ursólico (AU); antioxidante; despigmentante; antimicrobiana; citotóxico; CLAE.

ABSTRACT

Increased concern with body esthetics and health has raised the demand for skin cosmetics containing actives that prevent aging and other skin changes. Ursolic acid (UA), a natural active extracted from plants as rosemary and basil, has shown an interesting compound for cosmetic incorporation, to possess antioxidant activity, depigmenting, antimicrobial property, among others. This study aimed to evaluate the possibility of using UA as a multifunctional cosmetic compound through the UA efficacy and cytotoxicity *in vitro*, and to prepare and evaluate an emulsion containing the substance. Antioxidant potential was tested using inhibition methods of radical 1,1-diphenyl-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) and radical 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}) showing antioxidant activity, with IC₅₀= 235,61 µg/mL for DPPH[•] technique and 107,17 µg/mL to ABTS^{•+} method. The depigmenting activity was given by inhibition of the enzyme tyrosinase with 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) substrate and show IC₅₀ de 338,00 µg/mL. For evaluation of antimicrobial activity, many strains were tested from the minimum inhibitory concentration (MIC) determined by dilution method on microplates, and minimum bactericidal concentration (MBC) by Petri dish replication, following M100-S16 supplement CLSI. The UA demonstrated antimicrobial activity, with a MIC to *S. aureus* strain of 25 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; to *S. epidermidis* a MIC of 25 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; to *E. coli* a MIC of 50 µg/mL and MBC of 50 µg/mL; the *P. aeruginosa* strain revealed a MIC of 25 µg/mL and MBC= 0. The cytotoxicity *in vitro* was determined for metabolically incompetent human keratinocytes ability reduce 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) and as result the UA didn't present cellular cytotoxicity in a maximum concentration of 50 µg/mL. To cosmetic incorporation, a high stability emulsion was choice and as quality control technique of UA in this emulsion, an analytical methodology for HPLC was developed and validated, using green chemistry precepts. To evaluate the emulsion, a preliminary stability study was conducted, for the purpose evaluate the stability of UA in a stable emulsion, front of extreme conditions as 25, 40 e 5 °C temperatures, indirect light and freezing/ thawing cycles. The emulsion containing UA demonstrated stability for the pH and viscosity characteristics, and about content, was more stable with 25 and 5 °C. The UA, through *in vitro* assays performed demonstrated antioxidant, depigmenting and antimicrobial character, no cytotoxicity was observed in the used cells in the concentration range tested, besides showing some stability in the emulsion of choice. As noted, this multifunctional compound demonstrated *in vitro* characteristics of great interest for use as topical cosmetic active and possibly as an antimicrobial agent, thus further studies are needed to ensure its complete safety and efficacy of use.

Keywords: ursolic acid (UA), antioxidant, tyrosinase, antimicrobial, cytotoxic, HPLC.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do AU e do AO.....	26
Figura 2. Radical DPPH [*] e sua forma reduzida.	30
Figura 3. Cascata de reações na produção dos pigmentos melânicos	32
Figura 4. Espectrofotômetro de absorção na região IV Vertex 70- Bruker	44
Figura 5. Esquema do preparo das microplacas para determinação da CIM	51
Figura 6. Preparo das amostras finais do ensaio com MTT.	53
Figura 7. Esquema da montagem das placas para o ensaio com MTT.....	54
Figura 8. Cromatógrafo Líquido Perkin Elmer Flexar	57
Figura 9. Espectro de absorção IV de PDAU	65
Figura 10. Espectro de absorção IV de MPAU	66
Figura 11. Sobreposição dos espectros IV de PDAU e MPAU.....	67
Figura 12. Tubos reacionais do AU frente ao DPPH [*]	69
Figura 13. Curva analítica do AU para a porcentagem de inibição de DPPH [*]	69
Figura 14. Curva analítica do AA para a porcentagem de inibição de DPPH [*]	70
Figura 15. Tubos reacionais do AU frente ao ABTS ⁺⁺	71
Figura 16. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição do ABTS ⁺⁺	71
Figura 17. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição do ABTS ⁺⁺	72
Figura 18. Placa reacional do ensaio com tirosinase e AU	73
Figura 19. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição da tirosinase	74
Figura 20. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição da tirosinase	74
Figura 21. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>S. aureus</i>	77
Figura 22. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>S. epidermidis</i>	77
Figura 23. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa <i>E. coli</i>	77
Figura 24. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente a cepa <i>P. aeruginosa</i>	78
Figura 25. Placa reacional do ensaio de citotoxicidade com MTT.....	80
Figura 26. Emulsões preparadas sem AU (EM-BS) e com AU (EM-AU).....	83

Figura 27. Características microscópicas de EM-BS (a) e EM-AU (b).	84
Figura 28. Estrutura química do Poliacrilato de Sódio.....	84
Figura 29. Espectro UV de MPAU.	86
Figura 30. Espectro UV de PDAU.	86
Figura 31. Teste de concentrações	87
Figura 32. Comparação dos cromatogramas das amostras de PDAU e MPAU.....	88
Figura 33. Cromatograma final de MPAU 600 µg/mL.....	89
Figura 34. Curva analítica final de linearidade.....	91
Figura 35. Gráfico de dispersão de resíduos.....	92
Figura 36. Cromatogramas sobrepostos das SPcb, SPd e SAm.....	95
Figura 37. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de HCl.....	96
Figura 38. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de NaOH	96
Figura 39. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H ₂ O ₂	97
Figura 40. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H ₂ O a 80 °C.....	97
Figura 41. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de luz UV	98
Figura 42. Emulsões submetidas à centrifugação a 3000 rpm.	101
Figura 43. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 25 °C	102
Figura 44. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 40 °C	103
Figura 45. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em luz indireta	103
Figura 46. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em 5 °C	104
Figura 47. Aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T12 no ciclo de congelamento/descongelamento.....	104
Figura 48. Valores de pH da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar	105
Figura 49. Valores de pH da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar	106
Figura 50. Valores de viscosidade da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar ..	107
Figura 51. Valores de viscosidade da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar ..	107
Figura 52. Valores de teor de EM-AU ao longo dos 15 dias de experimento	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos tubos reacionais para ensaio com o radical DPPH*.....	46
Tabela 2. Composição dos tubos reacionais para ensaio com ABTS* ⁺	47
Tabela 3. Composição dos poços reacionais do ensaio com tirosinase.	49
Tabela 4. Fórmula da emulsão utilizada	55
Tabela 5. Preparo das soluções diluídas para análise da exatidão.	62
Tabela 6. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio antimicrobiano.....	76
Tabela 7. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio com MTT.....	80
Tabela 8. Resultados obtidos para conformidade do sistema.....	90
Tabela 9. Análise de variância dos valores obtidos na linearidade.....	92
Tabela 10. Teste t homocedástico para análise da precisão entre analistas	94
Tabela 11. Resultado final para exatidão.....	99
Tabela 12. Resultados obtidos no parâmetro de robustez.....	100
Tabela 13. Média e desvio padrão das concentrações (µg/mL) de AU na EM-AU no início, meio e fim do estudo de estabilidade preliminar, frente às condições submetidas	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de estudos em diversas áreas utilizando AU.	28
Quadro 2. Estudos envolvendo metodologias por CLAE para AU.....	38
Quadro 3. Significado dos termos descritivos de solubilidade.....	45
Quadro 4. Solubilidade do AU frente a solventes diversos.....	67
Quadro 5. Análise detalhada da emulsão utilizada.....	82
Quadro 6. Características físico-químicas das emulsões obtidas	83

LISTA DE ABREVIATURAS

- AA-** Ácido ascórbico
- ABTS^{•+}**- 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
- AC-** Ácido Cafeico
- ANVISA-** Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- AO-** Ácido oleanólico
- AU-** Ácido Ursólico
- BPF-** Boas práticas de fabricação
- CG-** Cromatografia gasosa
- CIM-** Concentração Inibitória Mínima
- CLAE-** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CBM-** Concentração Bactericida Mínima
- DMSO-** dimetilsulfóxido
- DMEM-** Dulbecco's Modified Eagle's Medium
- DPPH[•]**- 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
- DPR-** Desvio padrão relativo
- EDTA-** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EM-AU-** Emulsão contendo ácido ursólico
- EM-BS-** Emulsão base
- F calc.** - Valor calculado do teste estatístico
- F tab.** - Valor tabelado do teste estatístico
- IC₅₀**- Concentração inibitória de 50%
- IV-** Infravermelho
- HaCat-** Queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes
- LD-** Limite de detecção
- L- Dopa** - 3,4- Dihydroxy-L-phenylalanine
- LQ-** Limite de quantificação
- MPAU-** Matéria-prima ácido ursólico
- MTT**- 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
- O/A-** Óleo/água

OMS- Organização Mundial da Saúde
PBS- Phosphate Buffer Saline
PDAU- Padrão ácido ursólico
RMN- Ressonância Magnética Nuclear
SAm- Solução amostra
SPcb- Solução placebo
SPd- Solução padrão
TSA- Triptona de Soja
TSB- Trypticaseína Soja
UV-VIS- Ultravioleta visível

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as pessoas que de alguma forma estiveram envolvidas para que fosse possível seu desenvolvimento e conclusão. Assim, esta dedicatória vai para Deus, para toda minha família e amigos. Sem a amizade, tantos ensinamentos, carinho e força de vocês, eu não teria conseguido. Portanto, vocês são completamente merecedores desta dedicatória.

Muito obrigada por estarem ao meu lado e fazerem parte dessa curta, porém grandiosa experiência da minha vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador, professor Doutor **Marcos Antonio Corrêa**, por ter confiado a mim o desenvolvimento de um de seus projetos e me aceitado como sua primeira orientanda de mestrado, por sempre ter me incentivado, se mostrado solícito e compreensivo, pela paciência, amizade e por ter me mostrado caminhos mais leves e tranquilos, tanto profissionais quanto pessoais, enfim por todos os enormes ensinamentos da pessoa grandiosa que é.

À colaboradora e amiga Ms. **Caroline Magnani Spagnol**, por sempre ter estado disposta a me auxiliar em todo o desenvolvimento deste trabalho de forma integral e dedicada, pela amizade nos momentos de alegria e nos momentos de dificuldades, pela paciência e compreensão.

À professora Dra. **Vera Lucia Borges Isaac**, ao professor Dr. **André Gonzaga dos Santos** e à professora Dra. **Hérída Regina Nunes Salgado** por todo o auxílio dado em partes importantes do desenvolvimento deste trabalho.

Aos **professores**: Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Prof.^a Dra. Regina Cicarelli e Prof.^a Dra. Juliana Álvares Duarte Bonini Campos por compartilharem seus conhecimentos e equipamentos no decorrer deste trabalho.

Aos **amigos** que fiz na universidade durante todo o meu tempo de mestrado, e que sempre me auxiliaram de alguma forma, seja com conhecimento, troca de experiências, auxílio nos experimentos, conversas amigas nos momentos difíceis, e que além de tudo dividiram comigo os momentos de felicidade, conquistas e anseios: Bia Leone, Carol Kogawa, Dani Marcato, Alessandra Custódio, Gabi Prado, Gabi Almeida, Wagner, Isa Freitas, Ana Carolina, Ilza, Claudia, Jussara, Mari, Mateus, Caio, Vinícius, Fátima, Bia, entre outros.

À minha **família**, por ter me dado todo suporte, apoio e incentivo, mesmo sem entender meus desejos e objetivos, e em especial à minha mãe Célia e meu pai Sérgio, que sempre acreditaram e investiram parte de seus sonhos em mim, estiveram

ao meu lado e me deram toda e a melhor base e educação para que eu me tornasse quem sou hoje, motivo pelo o qual se tornou possível o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Agradeço imensamente à Deus por ter permitido vocês como minha família.

Ao meu **companheiro de vida**, Carlos, por toda dedicação, amor e carinho, paciência, os mais sábios conselhos, apoio incondicional em todos os momentos e por estar sempre ao meu lado nos momentos difíceis de ansiedade e angústia e nos momentos de felicidade e conquista, me mostrando todo o lado mais leve e mais simples das coisas. Sou eternamente grata a você por tudo e à Deus por ter colocado você em meu caminho. Sem você não teria sido possível chegar até aqui.

À **família que a vida me deu**, meus queridos amigos que sempre estiveram ao meu lado tornando meus dias mais felizes e minha jornada mais leve, em especial aos amigos da *Casa de Fraternidade Chico Xavier* sempre presentes e dispostos a me trazerem a paz e a alegria que eu precisava para me manter firme do início ao fim, à minha sogra Neusa por todo o auxílio e apoio, e aos meus queridos amigos de longa data que sempre fizeram questão de tornar meu caminho mais alegre e divertido, além de me ensinarem a ser alguém melhor a cada dia.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas que sempre se mostraram solícitos em ajudar no que fosse necessário.

À secretaria de pós-graduação, em especial *Cláudia, Aniele, Daniela e Christiane*.

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

À **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido.

Fernanda Cardoso Colombo

*“Nascestes no lar que precisavas, vestistes o corpo
físico que merecias, moras onde melhor Deus te
proporcionou, de acordo com o teu adiantamento.
Possuis os recursos financeiros coerentes com as
tuas necessidades, nem mais, nem menos, mas o
justo para as tuas lutas terrenas.
Teu ambiente de trabalho é o que elegeste
espontaneamente para a tua realização.
Teus parentes, teus amigos são almas que
atraístes, com a tua própria afinidade.
Portanto, teu destino está constantemente sob
teu controle.
Tu escolhes, recolhes, eleges, atraís, buscas,
expulsas, modificas tudo aquilo que te rodeia a
existência.
Teus pensamentos e vontades são a chave de teus
atos e atitudes.
São as fontes de atração e repulsão na tua
jornada e vivência.
Não reclames nem te faças de vítima.
Antes de tudo, analisa e observa.
A mudança está nas tuas mãos.
Reprograma a tua meta, busca o bem e viverás
melhor.
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um
novo começo, qualquer um pode começar agora e
fazer um novo fim”.*

Francisco Cândido Xavier

Fernanda Cardoso Colombo

1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida começou a ganhar força em meados de 1950 e vem aumentando em todo o mundo, principalmente graças aos avanços na área da saúde. No entanto, para garantia da qualidade de vida, uma série de fatores deve ser levada em consideração, como o bem-estar físico, a boa saúde mental e a interação social do indivíduo. Para isso, é necessário considerar necessidades individuais, tais como autonomia, novos significados de vida e autoestima (KALACHE et al., 1987; CAMARANO et al., 2004; VERAS, 2009).

Assim, a fim de garantir um corpo saudável e autossatisfação, uma crescente preocupação com a saúde e com a estética corporal tem aumentado a demanda por produtos cosméticos capazes de prevenir o envelhecimento cutâneo e o aparecimento de patologias, uma vez que, com o aumento de idade, fatores genéticos e hormonais podem reduzir a atividade plena do sistema imunológico, causando inúmeras alterações no tecido cutâneo, podendo resultar em uma pele fina e ressecada, com manchas, rugas e possíveis carcinomas. Dentre estes produtos, tem recebido considerável atenção e interesse pelo mercado, seja por forte apelo de “marketing” ou não, os que possuem ativos de origem vegetal e que, de certa forma, reforçam a crescente preocupação atual com a sustentabilidade. Por esse motivo, a pesquisa de novos ativos para incorporação em produtos de administração tópica torna-se de grande relevância (RESENDE, 2013).

Além dos fatores intrínsecos do indivíduo, fatores externos como a radiação solar também podem acelerar o envelhecimento, ocasionando uma das mais pronunciadas alterações à pele, denominadas de fotoenvelhecimento, que ocorre principalmente pela ação dos raios UV, a partir da produção de espécies químicas altamente reativas e instáveis (formadas por um não-emparelhamento de elétrons), chamadas de radicais livres, que são capazes de ligar-se a diferentes classes de moléculas, como o DNA, promovendo assim danos a vários tipos celulares do organismo, inclusive os produtores de colágeno e elastina. Nesse contexto, os antioxidantes, que podem ser naturais, adquiridos na dieta, ou sintéticos, atuam combatendo essas espécies altamente reativas, auxiliando na prevenção de danos celulares (FERREIRA et al., 1997; BARREIROS et al., 2006; MONTAGNER et al., 2009).

Outro composto importante na proteção da pele é a melanina, um pigmento produzido por células especializadas do corpo humano, os melanócitos, que confere fotoproteção contra danos causados pela radiação UV. Sua produção ocorre a partir de organelas específicas geradas pelo retículo endoplasmático dos melanócitos, os melanosomos, em cujo interior produz-se o pigmento. Tal produção é mediada pela tirosinase, uma enzima chave responsável por iniciar a cascata de processos na produção da melanina, uma vez que transforma tirosina em L-DOPA que dará continuidade ao restante da cascata. Porém, a produção exacerbada deste pigmento pode causar certos inconvenientes, como o aparecimento de manchas na pele (ANTELO et al., 2008; SPAGNOL, 2014).

Alguns ativos naturais ainda pouco explorados comercialmente, têm sido estudados por apresentarem potencial atividade preventiva contra danos causados ao tecido cutâneo, destacando-se as atividades antioxidante, despigmentante, antineoplásica e anti-inflamatória. O AU, um composto triterpenóide pentacíclico é um deles, e pode ser encontrado em uma grande variedade de espécies vegetais, muitas delas de origem brasileira que possuem grande importância na medicina fitoterápica. Além de todas as atividades anteriormente citadas, também é reportado ao AU atividade antimicrobiana, tornando-o um ativo multifuncional de grande interesse para incorporação em produtos de administração tópica, uma vez que pode contribuir para a prevenção de danos diversos causados à pele e atuar, ao mesmo tempo, como um conservante antimicrobiano (LIU, 1995; FRIGHETTO et al., 2005; SILVA et al., 2008; ELOY et al., 2012).

Os produtos cosméticos, segundo a RDC Nº 7 da ANVISA de 2015, podem ser classificados em produtos de grau 1 e grau 2, sendo considerados os produtos de grau 2 como “*produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (...) que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso*”, ou seja, produtos cosméticos que apresentam substâncias ativas em suas formulações, e, por esse motivo, seu desenvolvimento e produção requerem altos padrões de qualidade para garantir eficácia e segurança ao consumidor. De um modo geral, um dos aspectos inerentes à segurança do consumidor, diz respeito à presença de um adequado sistema conservante (incluindo conservantes antimicrobianos), já que as

matérias primas utilizadas podem oferecer um ambiente adequado à proliferação de microrganismos que podem prejudicar a qualidade do produto, podendo ser responsáveis por sua deterioração, baixa eficácia e possíveis danos à saúde do consumidor. A atividade antimicrobiana do AU foi avaliada em alguns estudos que comprovaram um potencial antimicótico e um amplo espectro contra bactérias, principalmente as gram-positivas, podendo dessa forma, sugerir estudos mais aprofundados do AU como um possível conservante antimicrobiano (AMARAL, 2010; BRASIL, 2015; JESUS et al., 2015).

A fim de avaliar a segurança de um novo ativo em estudo, também devem ser realizados ensaios de toxicidade. O potencial citotóxico de um composto pode ser traduzido como a capacidade de gerar apoptose em uma célula. No caso do AU consiste na indução da apoptose de células tumorais sem afetar as células normais, além de prevenir a transformação de células normais em cancerígenas. O mecanismo dessa citotoxicidade ainda não foi completamente esclarecido, mas sabe-se que pode estar relacionado com a habilidade do AU em inibir a replicação do DNA, à medida que inibe suas enzimas metabólicas (DALLA VECHIA et al., 2009; RESENDE, 2013).

Para a escolha da veiculação de ativos no desenvolvimento de novos produtos cosméticos grau 2, existem atualmente no mercado os mais variados tipos de cosméticos para a pele, sendo que as emulsões são uma das formas mais antigas e utilizadas graças às vantagens que possui, como facilidade de aplicação e preparo, possibilidade de utilização de categorias diversas de matérias-primas e obtenção de produtos de baixo custo. Estes sistemas emulsionados são definidos como sistemas dispersos formados pela junção de dois líquidos imiscíveis, em que um se apresenta como disperso e outro como dispersante e, devido às suas grandes vantagens citadas e a possibilidade de veiculação de compostos ativos em suas fórmulas, são amplamente escolhidas para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente aqueles com maior estabilidade (CORRÊA et al., 2012).

Uma questão importante no que diz respeito à garantia da qualidade de produtos é o emprego de técnicas analíticas qualitativas e quantitativas. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é um dos métodos mais utilizados, e consiste em uma técnica de separação analítica que permite a realização de testes qualitativos e quantitativos de amostras de diversas naturezas. O desenvolvimento e

a validação de novas metodologias (para essa e outras técnicas) exigem diversas etapas, e uma delas é a escolha dos materiais a serem utilizados, mediante as condições adotadas. Como nos últimos tempos, as mudanças climáticas ocorridas têm gerado preocupação no mundo todo, uma mudança de postura e de pensamento neste quesito tem trazido alterações significantes, principalmente para a indústria. Assim, os conceitos de sustentabilidade e química verde vêm ganhando bastante força no desenvolvimento de novos produtos e novas metodologias analíticas, uma vez que esses conceitos incluem redução da emissão de poluentes para o meio ambiente, maior segurança ao operador e menor custo (RIBANI et al., 2004; ALVES et al., 2010; ÇELIK et al., 2017; HAO et al., 2017).

Ainda que o AU seja um composto natural e que apresente propriedades muito interessantes para incorporação em cosmético, é um ativo pouco explorado neste sentido no mercado e há poucos estudos que mostram a eficácia desse ácido incorporado a uma preparação com característica e apelo cosmético. Deste modo, este trabalho procurou avaliar a possibilidade da utilização do AU como um ativo cosmético multifuncional, explorando as possíveis atividades antioxidante, despigmentante e antimicrobiana. Além disso, propôs-se avaliar seu comportamento em relação à um dos quesitos de segurança, a partir do modelo de citotoxicidade *in vitro* realizado com cultura de células, e a avaliação de seu comportamento frente a incorporação em uma emulsão.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Bem-estar e saúde

Introduzido na sociedade em 1948 juntamente com a fundação da Organização Mundial da Saúde (OMS), o conceito de saúde humana foi definido como sendo “*o estado completo de bem-estar físico, mental e social, e não somente a ausência de enfermidade ou invalidez*”, em que era considerado que para ter um completo estado de saúde ou bem-estar, todas as necessidades do indivíduo deveriam ser perfeitamente atendidas. Além disso, cada componente (físico, mental e social) era considerado isoladamente, não existindo uma conexão entre eles. Ao longo dos anos, a interpretação deste conceito foi passando por diversas modificações, e atualmente sabe-se que ideia de saúde é bem mais complexa, e pode ser considerada como um parâmetro não estático da vida (uma vez atingida), já que sofre diversas alterações com o passar do tempo, e depende de fatores que variam de indivíduo para indivíduo, como fatores biológicos (sexo, idade, genética), socioeconômicos e ambientais (condições de moradia, alimentação e geografia), sendo assim considerado como um conceito subjetivo. Uma das possíveis interpretações, mais dinâmicas deste conceito, não considera mais cada componente separadamente, mas sim a existência de uma grande interação entre eles, capaz de gerar um estado de bem-estar individual, de acordo com as condições de vida de cada um (FERRAZ, 1997; SÁ JUNIOR, 2004; PORTAL MEC, 2017).

O bem-estar tornou-se sinônimo de saúde e em termos gerais significa a satisfação das necessidades, sentir-se bem e a ausência de queixas e sofrimento. A satisfação das necessidades inclui necessidades psicológicas, sociais e físicas, que estão profundamente ligadas umas às outras. Em resumo, se uma não vai bem, provavelmente irá afetar a qualidade da outra. Claro que a satisfação das necessidades não será plena, uma vez que o ser humano sempre cria necessidades, porém conseguindo contemplar os pontos principais de cada uma, já será possível gerar um estado de bem-estar e saúde (SÁ JUNIOR, 2004; PORTAL MEC, 2017).

O bem-estar psicológico está envolvido com a ausência de distúrbios mentais como estresse, depressão, ansiedade, insônia, crises de pânico, entre outros; e com a presença de fatores que proporcionem prazer, felicidade e relaxamento ao indivíduo.

Assim, a garantia desse bem-estar pode estar intimamente ligada ao bem-estar social, que inclui fatores socioeconômicos e relacionamento interpessoal, e também com o bem-estar físico que inclui a ausência de disfunções fisiológicas do corpo, que pode consequentemente conferir uma boa aparência física (ANTIENÈ et al., 2017; VUJCIC et al., 2017; PORTAL MEC).

A boa estética, além de poder ser um indicativo de como se encontra a saúde física, é também o resultado de como o indivíduo cuida do seu corpo, podendo ter impacto na forma como ele se enxerga. A forma de se enxergar inclui aspectos da avaliação corporal como a percepção do próprio visual, percepção de massa corpórea, e de como outros nos enxergam, podendo ter forte influência emocional. Em resumo, a boa aparência que está atrelada a aspectos físicos e sociais pode ser um dos fatores de impacto na garantia do bem-estar emocional, sendo que esse bem-estar consequentemente poderá atuar na prevenção de doenças e até mesmo no auxílio a tratamentos de doenças já existentes. Assim, para atuar nos cuidados com o corpo físico, atualmente é possível o acesso a inúmeras estratégias, como a prática de diversas modalidades de exercícios físicos, alimentação saudável, os mais variados tipos de tratamentos estéticos, além do uso de uma gama de produtos cosméticos especializados na prevenção de muitas alterações indesejadas que podem ocorrer no corpo humano (HAMERMESH et al., 2013; LIPOWSKA et al., 2016; ANTIENÈ et al., 2017; MCCOLL-KENNEDY et al., 2017).

Envelhecimento humano

O envelhecimento é um processo de deterioração natural que ocorre com todos os organismos vivos em resposta ao tempo e à exposição a fatores ambientais, e causa uma série de alterações celulares, moleculares e sistêmicas, podendo gerar danos ao organismo e até mesmo a morte. Para os seres humanos esse fenômeno, também chamado de velhice, ocorre não somente fisicamente, mas também em termos mentais e sociais, e, portanto, requer cuidados específicos para garantir bem-estar, qualidade de vida e prazer ao idoso, tornando-se dessa forma um processo a ser encarado positivamente (MONTAGNER et al., 2009; SILVA et al., 2010).

O envelhecimento populacional, conquista social que leva a um aumento da expectativa de vida, começou a ganhar força por volta da década de 1950 e vem aumentando em todo o mundo, podendo ser observado tanto em países desenvolvidos, como em países subdesenvolvidos. É um processo que ocorre graças aos avanços tecnológicos em diversas áreas, principalmente na área de pesquisa e de saúde, e que possibilita novos programas e melhoria da qualidade de vida. Dessa forma, viver por mais tempo tem se tornado um novo desejo do ser humano, acessível a todos. No entanto, uma série de fatores devem ser levados em consideração para garantia de um envelhecimento tranquilo, prazeroso e com qualidade, como o bem-estar físico, boa saúde mental e social do indivíduo, que podem ser garantidos através de políticas de saúde e de atendimento às necessidades individuais, como autonomia, participação, novos significados de vida e autoestima (KALACHE et al., 1987; VERAS, 2009; SILVA et al., 2010).

A fim de garantir uma boa integridade física e autossatisfação, observa-se uma crescente preocupação com a saúde e com a estética corporal, não somente na população mais jovem, mas também na população mais velha, o que tem aumentado a demanda por alimentação mais saudável, exercícios físicos e também por produtos capazes de conter alterações indesejáveis que ocorrem no corpo por conta de envelhecimento (reações de oxidação), ação do ambiente (luz UV e agentes infecciosos) e também por fatores intrínsecos. No tecido cutâneo, inúmeras alterações podem ser listadas, devido a uma degradação do sistema imunológico por fatores genéticos e hormonais e por ação de fatores externos, que podem resultar em uma pele fina e ressecada, com manchas, rugas e possíveis carcinomas (MONTAGNER et al., 2009).

A Pele

A pele no ser humano, o maior órgão existente e responsável por 5 % do peso corpóreo, apresenta alta complexidade estrutural e é constituída por três partes, dispostas em diferentes níveis de profundidade, chamadas de camadas (epiderme, derme e tecido subcutâneo), que se relacionam para desempenhar inúmeras funções

extremamente importantes ligadas ao funcionamento do corpo e a adaptações a estímulos, auxiliados por uma série de anexos (CORRÊA et al., 2012).

São inúmeras as funções que podem ser listadas para a pele, como proteção mecânica ao exterior, reparação contra danos, recepção de informação sensorial, manutenção de homeostase, estética, entre outras. A função estética é responsável por caracterizar o perfil do ser humano conferindo-lhe aparência que pode se relacionar com vários aspectos da saúde humana. Em resumo, a pele humana é responsável por realizar barreira química, elétrica, microbiológica, térmica e contra a luz UV (KUMAR e PHILIP, 2007).

A epiderme, camada mais externa da pele, é composta por subcamadas de células epiteliais, anexos epidérmicos e outras células importantes. A subcamada mais profunda da epiderme é a camada basal, e é responsável por gerar as outras subcamadas epiteliais, a partir da diferenciação celular. Nessa camada também estão presentes os melanócitos, células dendríticas responsáveis pela produção da melanina a ser distribuída aos queratinócitos vizinhos. A melanina é um pigmento endógeno transportado por partículas citoplasmáticas, denominadas melanosomas, dos melanócitos basais para as subcamadas mais superiores da epiderme, onde se espalham, e ao liberarem o pigmento melanina de seu interior resultam na pigmentação da pele. Dessa forma, a melanina é a responsável pela cor que a pele apresenta em cada etnia. Após a camada basal encontra-se uma subcamada intermediária, a camada espinhosa responsável por nutrir as células presentes e possui como característica mais importante a presença de desmossomos, células conectoras que realizam a ligação com células vizinhas, além de conter as células de Langerhans, responsáveis pela barreira imunológica da pele por conter linfócitos, células T epidérmicas, e as células de Merkel, células relacionadas com a recepção dos impulsos elétricos na pele. Outra subcamada intermediária da epiderme é a camada granulosa onde encontram-se presentes os precursores de queratina. Por fim, a subcamada mais externa e que consiste na primeira barreira de proteção da pele é denominada de camada córnea, e por ser uma camada mais espessa composta por células desidratadas e queratinizadas confere impermeabilidade e resistência à pele. Porém, por possuir tais características, essa camada objetiva dificultar a permeação de produtos químicos e, desta forma, pode dificultar a via tópica para a

passagem de ativos cosméticos. Existem estratégias que buscam contornar tal situação, como por exemplo, a utilização de substâncias que alteram a permeabilidade cutânea, à medida que promovem a remoção reversível desta barreira, como os promotores de permeação, tensoativos, esfoliantes, métodos elétricos, entre outros (MARTINS e VEIGA, 2002; ANTELO et al., 2008; CORRÊA et al., 2012).

Na epiderme também podem ser encontrados anexos epidérmicos, que são estruturas de origem epitelial que se invaginam para camadas mais profundas da pele diferenciando-se, como as glândulas sudoríparas e sebáceas, os pelos e as unhas, responsáveis por uma série de funções protetoras (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Após a epiderme, é possível encontrar a derme, camada intermediária da pele, composta por tecido conjuntivo formado por fibroblastos, mastócitos, histiócitos, células endoteliais e fibras de diversas naturezas (colágena e elástica). Nessa camada é possível observar a presença de terminações nervosas, vasos e glândulas. E por fim, a última camada da pele e a mais profunda é a chamada tecido subcutâneo, camada caracterizada por apresentar uma estrutura mais complexa com a presença de células de gordura. É responsável pela proteção contra impactos mais fortes e profundos e calor, além de ser a camada responsável pela formação de rugas (CORRÊA et al., 2012).

Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento cutâneo é um processo que pode ser ocasionado por dois fatores principais, que estão intimamente interligados: o envelhecimento intrínseco (genético) programado em todos os organismos, e o envelhecimento extrínseco que pode ser um fator acelerador do primeiro. No primeiro ocorrem processos genéticos como replicações menos eficientes de DNA e proliferações celulares diminuídas, o que gera como consequência perda de funções exercidas por proteínas da pele, como o colágeno, fibras elásticas e outras proteínas importantes, fazendo com que a pele tenha menos elasticidade, menor capacidade de retenção de água, entre outras alterações. Esses fatores podem mudar a estrutura das membranas, gerando flacidez à pele. Já o envelhecimento extrínseco pode ser causado por raios ultravioleta, estresse oxidativo e radicais livres, que podem causar a morte de células por oxidação

de ácidos graxos importantes às camadas lipídicas da pele e também por causar danos ao DNA (HIRATA et al., 2004, TOBIN, 2017).

Em suma, fatores intrínsecos associados a diversos fatores extrínsecos, em conjunto, apresentam forte potencial para o desenvolvimento de mecanismos de alteração celular que podem resultar em fragilização do tecido cutâneo trazendo alterações como o aparecimento de rugas (diminuição da tensão da pele com perda de firmeza e elasticidade), cicatrização menos eficiente, desordens pigmentares, diminuição da barreira de defesa e uma pele mais fina e ressecada (TOBIN, 2017).

Embora a pele possua mecanismos de defesa contra fatores externos, suas atividades tornam-se reduzidas com o aumento de idade, e, na tentativa de contornar essa redução de atividade, torna-se importante buscar externamente ao organismo um possível incremento na manutenção das atividades normais da pele, pelo emprego de compostos que possam desempenhar o papel de proteção. Existem atualmente no mercado produtos cosméticos para a pele capazes de auxiliar contra alterações indesejáveis causadas tanto por fatores extrínsecos quanto intrínsecos. Tais preparações propõem veicular substâncias ativas em suas formulações, e objetivam desempenhar um papel preventivo através da proteção desta pele. Assim, os ativos de origem vegetal têm sido cada vez mais procurados com este objetivo, por possibilitarem um tratamento cutâneo, ao mesmo tempo que podem contribuir com o desenvolvimento sustentável. Sendo assim, a pesquisa de novos produtos para administração tópica, que possam prevenir e tratar alterações causadas na pele, se tornam de grande interesse (HIRATA et al., 2004; RESENDE, 2013).

Ácido ursólico

O AU, um composto triterpenóide, pentacíclico, mono- hidroxilado é um ativo natural presente em várias espécies vegetais, muitas delas encontradas no Brasil, como espécies da classe *Ocimum* (manjeriçã), tais como *O. basilicum*, *O. micranthum*, *O. tenuiflorum*, *O. gratissimum* L e espécies da classe *Rosmarinus*, como a *R. officinalis*, popularmente conhecida como alecrim, além das espécies *Vaccinium* spp. (blueberry), *V. macrocarpon* (cranberry) e também em cascas de maçãs. Essas espécies são de grande importância na medicina fitoterápica e na culinária e podem

ser facilmente encontradas. Derivado do ácido oleanólico (AO), o ácido ursólico é um isômero estrutural, que difere apenas na posição de um radical metil, como pode ser observado na Figura 1. Esses triterpenóides podem se apresentar como ácidos livres ou como agliconas (saponinas) (LIU, 1995; SILVA et al., 2008; KIM et al., 2017).

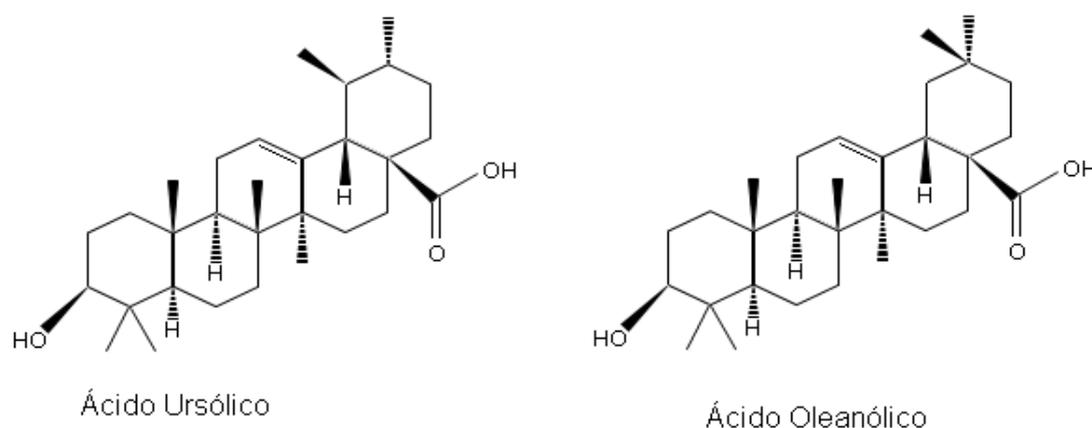


Figura 1. Estrutura do AU e do AO.

Fonte: autor

As características do AU ainda não estão totalmente relatadas, e são poucas as informações encontradas em compêndios oficiais. Os **aspectos gerais** do AU encontrados foram coletados no Merk Index, e são eles:

- Nome genérico: Ursolic acid;
- Nome químico: 3β- hidroxí- urs-12-en-28-óico;
- Outros nomes: urson, prunol, micromerol, malol;
- Fórmula molecular: $C_{30}H_{48}O_3$;
- Peso molecular: 456.71 g/mol;
- Composição percentual: C 78%, H10,59%, O10,51%;
- Solubilidade a 25°: uma parte em 88 de metanol; 178 de etanol, 140 de éter; 388 de clorofórmio; 1675 de dissulfeto de carbono. Moderadamente solúvel em acetona. Solúvel em ácido acético glacial quente e em 2% de solução alcoólica de NaOH. Insolúvel em água.

O AU começou a ser estudado há algum tempo, e atualmente estudos em diversas áreas, principalmente da saúde vem sendo conduzidos a fim de explorar as

características deste composto que tem se mostrado bastante promissor na melhoria da qualidade de vida, como pode ser observado no Quadro 1. No Brasil, seu uso vem sendo associado e prescrito em farmácias magistrais como um suplemento alimentar para ganho de massa magra.

Muitas atividades podem ser atribuídas ao AU, como efeito antioxidante, atividade despigmentante (inibição da enzima tirosinase), atividade antimicrobiana, atividade citotóxica anti-neoplásica, atividade anti-inflamatória, atividade anti-chagásica, entre outras. Muitas delas estão sendo estudadas e testadas, com a intenção de utilizar este ativo em associação com diversas classes de produtos promovendo assim o desenvolvimento de novos produtos promissores na área da saúde e a melhoria das características de produtos já existentes. Não somente o AU, mas outros compostos têm despertado interesse para novas pesquisas, por apresentarem muitas dessas características também, como é o caso do ácido cafeico e do ácido ferúlico. Diante de tantas características importantes para a área cosmética farmacêutica, o AU revela-se um ativo multifuncional extremamente atrativo para a incorporação em produtos para aplicação tópica (LIU,1995; SPAGNOL, 2014).

Quadro 1. Exemplos de estudos em diversas áreas utilizando AU.

Título do trabalho	Tema analisado	Referência
<i>“Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid”</i>	Revisão AU- onde é encontrado, estudos e atividades relacionadas.	LIU, 1995
<i>“Variation of ursolic acid content in eight Ocimum Species from Northeastern Brazil”</i>	Avaliação da quantidade de AU em diferentes espécies de plantas	SILVA et al., 2008
<i>“Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular”</i>	Investigação das ligações moleculares ocorridas entre o AU e o AO com mediadores de inflamação	MAGALHÃES et al., 2012
<i>“Aplicação de cromatografia centrífuga de contra corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de Egenia brasiliensis Lam.”</i>	Metodologia cromatográfica utilizando AU	FRIGHETTO et al., 2005
<i>“Development and evaluation of a nanoemulsion containing ursolic acid: a promising trypanocidal agent”</i>	Avalia atividade tripanocida de uma nanoemulsão desenvolvida com ácido ursólico, bem como sua citotoxicidade	OLIVEIRA et al., 2017
<i>“Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of botulin, betulinic acid and ursolic acid”</i>	Atividade antimicrobiana de 3 compostos, incluindo o AU	OLOYEDE, et al., 2017
<i>“Interference of ursolic acid treatment with glioma growth: an in vitro and in vivo study”</i>	Ação citotóxica do AU frente a células tumorais cerebrais	BERGAMIN et al., 2017
<i>“Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension</i>	Ensaio citotóxicos, hemodinâmicos e diuréticos do AU e AO	SOMOVA et al., 2003

Fonte: autor

Radicais livres e antioxidantes

Radicais livres são espécies químicas formadas ou ocasionadas por reações de óxido redução. Quando envolvidas no metabolismo de oxigênio e nitrogênio, formam espécies altamente reativas e instáveis, compostas por número ímpar de elétrons devido a um não emparelhamento dos mesmos. No corpo humano, podem ser formadas naturalmente ou por disfunções, nas reações que ocorrem a todo momento no metabolismo, principalmente para produção de energia, síntese de substâncias biológicas, fagocitose etc. Porém, a produção excessiva dessas espécies reativas pode provocar danos a tecidos e membranas, a partir da ligação a diferentes tipos de biomoléculas, causando patologias ou agravando as já existentes. Sendo assim, para auxiliar na defesa e regeneração do organismo, é necessário o combate a essas espécies químicas em excesso e/ou sua prevenção, que podem ser realizados através dos antioxidantes, substâncias capazes de bloquear a oxidação de substâncias oxidáveis ou de regenerá-las. Os antioxidantes podem ser naturais, adquiridos na dieta ou sintéticos (FERREIRA et al., 1997; HALLIWELL, 2000; BARREIROS et al., 2006).

Na literatura existem alguns métodos para avaliação da atividade antioxidante de compostos, como o método do ácido tiobarbitúrico para espécies reativas utilizado por MORAIS et al. (2006), método por redução férrica, método de absorvância pelo radical oxigênio, e os métodos utilizando os radicais 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) e o 2,2 -azinobis-(3-ethylbenzothiazoline) -6-sulfonic acid (ABTS^{•+}). Dois métodos muito utilizados são os de inibição dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, por se tratarem de métodos simples e de baixo custo. Esses métodos, ambos colorimétricos, consistem na redução dos radicais através de substâncias oxidáveis (doadoras de átomo de hidrogênio), com alteração de cor. Ambos os métodos podem ser lidos na região do ultravioleta visível (UV-VIS), que compreende comprimentos de onda que vão de 400 a 800 nm. No caso do DPPH[•] o radical apresenta-se na coloração violeta em sua forma oxidada e amarelo residual em sua forma reduzida. Já o ABTS^{•+} apresenta-se com uma coloração verde em sua forma oxidada e transparente quando é reduzido. A Equação 1 representa de forma simplificada a transformação que ocorre com os radicais (EREL, 2004; MOLYNEUX, 2004; MORAIS et al., 2006; PAVIA et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013).



Em que:
 R[•] = radical
 SH = substância oxidável
 S[•] = radical livre gerado

A estrutura molecular do radical DPPH[•] e sua forma reduzida estão representados na Figura 2.

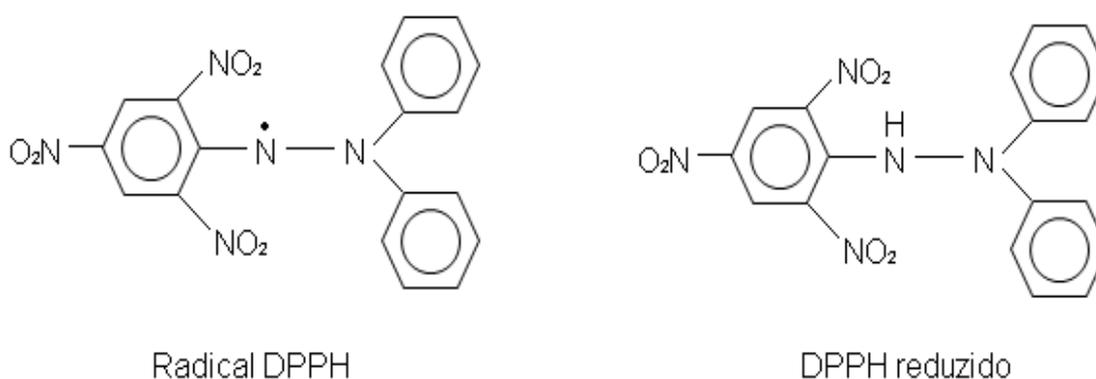


Figura 2. Radical DPPH[•] e sua forma reduzida.

Fonte: autor

Hiperpigmentação

A melanina, pigmento natural da pele, é um biopolímero responsável por, além de conferir fotoproteção, fornecer a cor da pele juntamente com outros fatores intrínsecos do organismo. Esse composto é produzido nos melanócitos através da malânogênese, em que ocorre uma série de reações catalisadas pela enzima tirosinase. A primeira reação que ocorre é a transformação de tirosina em L-dopa, seguida da transformação de L-dopa em dopaquinona. Em ambas as reações há a participação da tirosinase e, sendo assim, essa enzima pode ser considerada uma enzima chave na produção da melanina no corpo humano. No final do processo, são produzidos tipos diferentes de melanina, cada uma com um tipo de pigmento diferente.

Um esquema representativo da produção da melanina pode ser observado na Figura 3 (GONCHOROSKI et al., 2005; VIEIRA et al., 2015).

O sistema pigmentar, porém, pode sofrer algumas desordens de coloração, as discromias, que podem ser classificadas como acromias (falta de pigmentação), hipocromias (pouca pigmentação) e hipercromias (excesso de pigmentação). As hiperpigmentações acometem um número elevado de indivíduos e podem causar vários transtornos que afetam o bem-estar, uma vez que muitas dessas manchas aparecem na face. Ela pode ocorrer através da hiperestimulação dos melanócitos por fatores como: hormônios, radiação solar, radicais livres, inflamações, entre outros, que levam a um acúmulo de pigmentos na epiderme que se apresentam como manchas acastanhadas. Essas manchas podem se manifestar de diversas formas, como cloasmas, melasmas, hiperpigmentação periorbital, lentigens, entre outras (NICOLETTI et al., 2002; GONCHOROSKI et al., 2005; SATO et al., 2007).

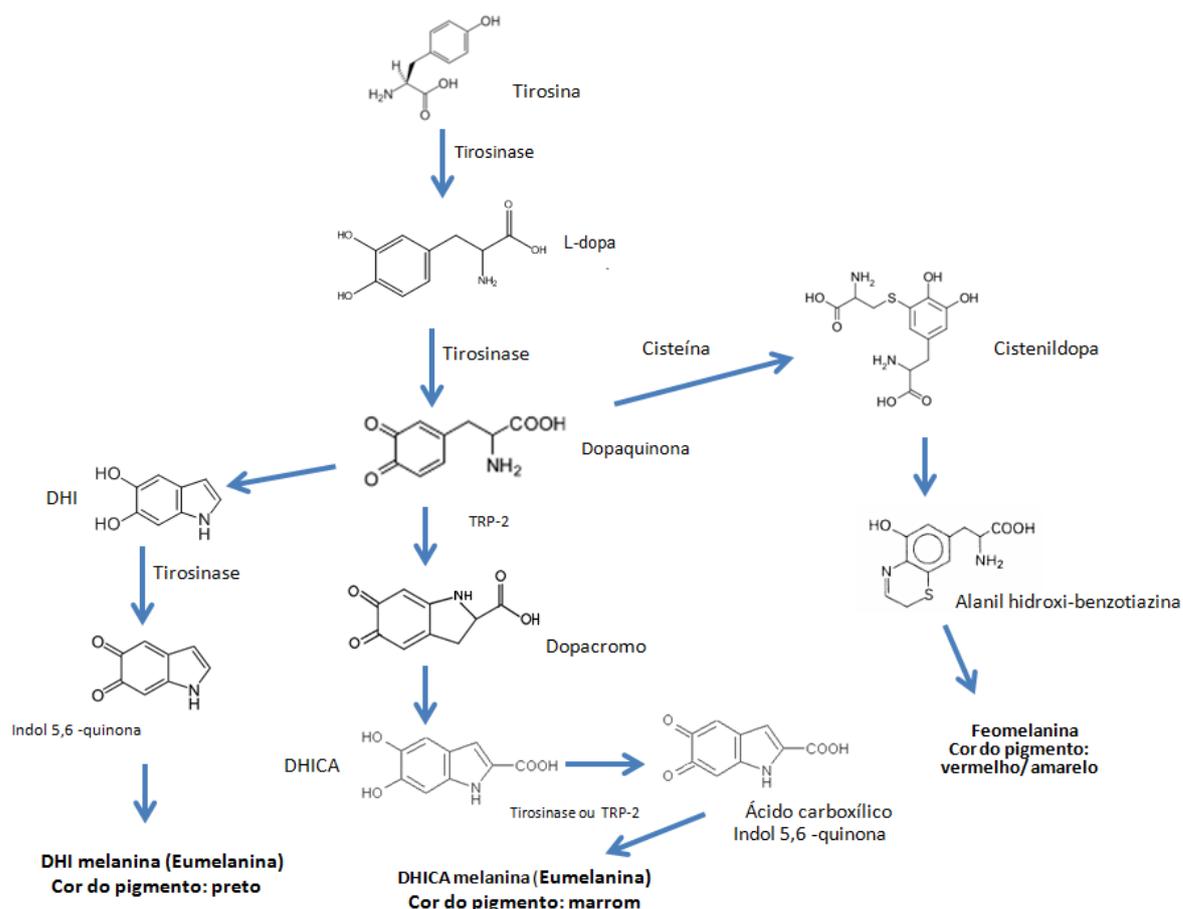


Figura 3. Cascata de reações na produção dos pigmentos melânicos

Fonte: SPAGNOL, 2014, adaptado de PROTA, 1980; ALMEIDA, 2013

Sendo assim, o desenvolvimento de novos tratamentos preventivos para as hiperpigmentações, é de extrema importância na manutenção do bem-estar físico, principalmente para a população idosa que têm aumentado nos últimos anos (NICOLETTI et al, 2002).

A inibição da atividade da tirosinase tem se demonstrado uma técnica bastante interessante em terapias para tratamento dermatológico de manchas causadas pela hiperprodução dos melanócitos, por diminuir a produção de melanina e conseqüentemente clarear a pele. A principal substância, muito utilizada no Brasil para esse tipo de terapia, é a hidroquinona, porém apresenta uma série de efeitos adversos indesejados como dermatite de contato, irritação local, acromias secundárias,

catarata, entre outras, e que inclusive indicaram sua proibição de uso em alguns países. Tal situação sugere, em termos globais, a busca por alternativas eficazes e seguras para suprir ou atender a necessidade de ativos que contemplem a terapia pigmentar (COSTA et al., 2010).

Antimicrobianos

Atualmente o mercado de produtos e serviços encontra-se em um contexto em que a qualidade se tornou um item indispensável e extremamente criterioso para garantia de aceitação do produto ou serviço pelos consumidores. A segurança de um produto é um item indispensável à sua qualidade, principalmente quando se refere à sua segurança microbiológica. Tem se tornado crescente a busca por produtos naturais para utilização e substituição de antimicrobianos clássicos (sintéticos), optando-se por materiais que sejam eficazes e menos agressivos tanto para o homem quanto para a natureza. Compostos naturais que apresentam atividade antimicrobiana tem se demonstrado bastante interessantes para a substituição ou redução de conservantes sintéticos, e como novas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento de patologias causadas por bactérias (ANTUNES et al., 2006; PACKER et al., 2007; SOUZA et al., 2007).

Como representantes da classe de produtos naturais podemos citar os flavonoides, taninos, triterpenóides, entre outros. Os triterpenóides podem ser considerados como a subclasse que apresenta o maior número de representantes da classe. O AU, pertencente aos triterpenóides, é um composto apresentado na literatura como detentor de atividade antimicrobiana (KOZAI et al., 1987; JESUS et al., 2015; OLOYEDE et al., 2017).

Ensaio de toxicidade

Para a garantia de segurança e eficácia de um novo produto cosmético em desenvolvimento, principalmente aqueles que levam substâncias ativas em suas fórmulas devem ser realizados ensaios de toxicidade e irritabilidade, de acordo com a aplicabilidade do produto, a fim de prever os possíveis efeitos tóxicos no consumidor final. Atualmente, a utilização de animais para esses tipos de ensaios tem sido alvo

de muitas críticas e rigoroso controle, sendo necessário a utilização de métodos alternativos em substituição aos modelos animais. Diante deste fato, os testes *in vitro* tem se demonstrado muito promissores na detecção de toxicidade para seres humanos. Como exemplo destes testes *in vitro*, é possível citar os ensaios com artemia salina, atividade hemolítica e ensaios com cultura de células, amplamente utilizados por conta das vantagens que oferecem de serem reprodutíveis, sensíveis e rápidos. Entre os ensaios de citotoxicidade é possível citar o modelo de difusão em ágar, método do corante vermelho neutro e o método utilizando o corante 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), que possuem como princípio avaliar a viabilidade e morte celular (ROGERO et al., 2003; BEDNARCZUK et al., 2010).

O potencial citotóxico de um composto pode ser traduzido como a capacidade de gerar apoptose em uma célula. No caso do AU consiste na indução da apoptose de células tumorais sem afetar as células normais, além de prevenir a transformação de células normais em cancerígenas. O mecanismo dessa citotoxicidade ainda não foi completamente esclarecido, mas sabe-se que pode estar relacionado com a habilidade do AU em inibir a replicação do DNA, à medida que inibe suas enzimas metabólicas (DALLA VECHIA et al., 2009; RESENDE, 2013).

Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas e os preceitos de química verde

Para que a qualidade de um produto cosmético possa ser assegurada, a indústria se utiliza de inúmeras estratégias e ferramentas da qualidade a fim de garantir a padronização e confiabilidade do mesmo. O controle de qualidade, bem como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e a garantia da qualidade, estão inseridas dentro do gerenciamento farmacêutico, compondo assim um sistema eficiente, capaz de conferir qualidade ao produto final (BRASIL, 2010).

O setor de controle de qualidade é responsável por realizar uma série de procedimentos e ensaios tanto em produtos acabados como em matérias primas, garantindo assim sua qualidade e padronização. Para isso, diversos métodos de identificação, caracterização e quantificação de compostos podem ser empregados,

como titulações de natureza diversa, análise de solubilidade, pH, densidade, reologia, espectroscopias variadas (região do ultravioleta (UV), região do infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de absorção atômica, de massas), entre outras. Acopladas a algumas dessas técnicas encontram-se técnicas de separação de compostos, como a cromatografia e a eletroforese, constituindo assim sistemas eficientes para identificação e quantificação de amostras diversas, como farmacêuticas, biológicas e de alimentos (RIBANI et al., 2004; BRASIL, 2010; DE MARIA e MOREIRA, 2007; SPAGNOL, 2014).

A cromatografia é uma técnica de separação de compostos que tem como princípio a interação de moléculas através de suas polaridades, e que permite o reconhecimento de uma substância pela comparação com padrões de referência, bem como a separação de compostos de interesse presentes em amostras compostas (misturas). Existem vários tipos de cromatografias, como a cromatografia gasosa (CG), cromatografia em camada delgada e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A CLAE é amplamente utilizada em laboratórios de controle de qualidade pelas vantagens de fornecer dados qualitativos e quantitativos de amostras quando associada a outras técnicas; por ser possível utilizar amostras de diferentes naturezas e pela possibilidade de analisar mais de um composto por ensaio (DE MARIA e MOREIRA, 2007; ELOY et al., 2012).

Diversas metodologias utilizando CLAE e outras técnicas são empregadas para a análise de compostos, porém para se fazer o uso de uma já existente que não esteja presente em compêndios oficiais, ou para o desenvolvimento de uma nova é necessário cumprir certas exigências e critérios, geralmente determinados por órgãos responsáveis, para que os dados gerados pela metodologia em questão sejam seguros e confiáveis. A essas exigências e critérios é dado o nome de validação, e, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a responsável por definir e fiscalizar (RIBANI et al., 2004).

Segundo a RDC 166 de 24 de julho de 2017, que *“dispõe da validação de métodos analíticos para insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos, a validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e adequados à finalidade a que se destina”*. Dessa forma, tal legislação define alguns

parâmetros para a validação de metodologias, como exatidão, precisão, seletividade, limite de detecção e quantificação, linearidade e robustez (BRASIL, 2017).

- ✓ **Exatidão:** avalia o grau de recuperação de um método, a partir da concordância entre os resultados individuais de cada concentração escolhida (alta, média e baixa), sempre contemplando o intervalo linear do método.
- ✓ **Precisão:** a precisão irá avaliar a proximidade de resultados obtidos quando a amostra for submetida a diferentes condições, como por exemplo diferentes analistas, ou através de ensaios repetidos. Pode ser avaliada através da repetibilidade (intradia) precisão intermediária (entre analistas) e reprodutibilidade.
- ✓ **Seletividade:** Analisa a capacidade de componentes de matriz e/ou impurezas interferirem no sinal do analito em questão. Deve ser testada submetendo o analito a soluções estresse e frente a matriz da amostra.
- ✓ **Limite de detecção e quantificação:** demonstram as menores quantidades detectáveis do analito, e a menor quantidade quantificável de forma precisa e exata.
- ✓ **Linearidade:** demonstra o quanto um método é linear, ou seja, se a respostas analítica é proporcional à concentração analisada do composto.
- ✓ **Robustez:** por fim a robustez de um método irá avaliar se pequenas mudanças inseridas no método são ainda capazes de produzir resultados com baixo desvio.

Durante centenas de anos o homem explorou os recursos da Terra de forma excessiva e irresponsável, sem que existisse uma preocupação do que essa ação poderia gerar a longo prazo. Provavelmente acreditava-se que os recursos da natureza eram inesgotáveis e poderiam ser utilizados sem moderação. Com o avanço intelectual e tecnológico o ser humano começou a perceber o desequilíbrio físico-químico que a Terra estava iniciando, graças à irresponsabilidade com a utilização dos recursos naturais. Foi assim que se iniciou uma conscientização em relação aos assuntos ambientais, e em 1972 ocorreu a primeira conferência de discussão

ambiental, a Conferência de Estocolmo. Desde então, o ser humano vem se preocupando cada vez mais em se desenvolver de forma sustentável, pesquisando e investindo em tecnologias que possam auxiliar neste desenvolvimento, de forma a gerar menos resíduos, substituir recursos esgotáveis e preservar a natureza (SILVA et al., 2005).

Assim, no início dos anos 90 um novo conceito surgiu, o da *Química Verde*, tendo como proposta principal a redução e eliminação de resíduos tóxicos, a partir do desenvolvimento de produtos, processos e metodologias analíticas sustentáveis. Esse novo preceito baseia-se em doze princípios, e alguns deles são: prevenção da geração de resíduos, substituição para substâncias menos tóxicas, redução do uso de solventes, reutilização (reciclagem) de compostos, processos mais eficientes energeticamente, minimização de acidentes, entre outros. Uma sugestão para a substituição de solventes tóxicos seria a utilização de água como solvente. Outras substâncias também poderiam ser utilizadas na metodologia por serem menos poluentes, como o etanol e o ácido acético (PRADO et al., 2003; SILVA et al., 2005; ÇELIK e YIDIZ, 2017).

Atualmente não existem métodos analíticos descritos nos compêndios oficiais para identificação e quantificação de AU em formulações. No entanto, é possível encontrar na literatura estudos de desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para o AU envolvendo CLAE, como pode ser observado no Quadro 2.

Quadro 2. Estudos envolvendo metodologias por CLAE para AU.

Comprimento de onda (nm)	Fase móvel	Tempo de retenção (min)	Vazão (mL/min)	Tipo de coluna	Referência
203	Acetonitrila: água (88:12)	11	1,0	C18- 250 mm	Eloy et al., 2012
210	Metanol: tampão fosfato (88:12)	-	1,0	C18- 250 mm	Zhou et al., 2007
215	Metanol: água (95:5)	21,57	0,4	C18- 250 mm	Xu et al., 2012
210	Acetonitrila: água (85:15)	-	1,0	C18- 250 mm	Alvarado et al., 2015
210	Acetonitrila: metanol (80:20)	12,36	0,5	C18- 250 mm	Taralkar e Chattopadhyay, 2012

Fonte: autor

Como é possível observar, as metodologias encontradas em literatura para o AU não apresentam preceitos de química verde, demonstrando assim a importância relevante para o desenvolvimento de metodologias menos poluentes, mais seguras e mais baratas para análise qualitativa e quantitativa de AU em formulações.

Emulsões e produtos cosméticos

As emulsões podem ser definidas como sistemas bifásicos dispersos, termodinamicamente instáveis, formados pela união de dois líquidos imiscíveis, em que um se apresenta como disperso (fase descontínua/ interna) e outro como dispersante (fase contínua/ externa), através da estabilização por agentes emulsificantes na interface óleo/água. Esses sistemas emulsionados podem ser classificados de acordo com a natureza da fase dispersa (lipo ou hidrossolúvel), como óleo/água (O/A), isto é, quando a fase dispersa é a fase oleosa, ou água/ óleo (A/O), quando a fase dispersa é do tipo aquosa, sendo que as emulsões do tipo O/A são as

mais utilizadas; e também podem ser classificadas quanto à consistência, segundo sua aplicabilidade, natureza química ou quanto às propriedades/finalidades (FRANGE e GARCIA, 2009; CORRÊA, 2012; FRANZOL e REZENDE, 2015).

A aplicabilidade das emulsões é possível ser observada em várias áreas, como na alimentícia, agroquímica, de revestimentos, cosmética e farmacêutica, sendo que as duas últimas são consideradas como as mais complexas, devido a possibilidade de utilização de matérias-primas das mais variadas categorias e natureza química, bem como a veiculação de uma gama de compostos ativos em suas fórmulas. Na área cosmética, as emulsões são amplamente escolhidas para o desenvolvimento de novos produtos, principalmente para administração tópica, por se tratarem de uma das formas mais antigas utilizadas que apresentam como outras vantagens a facilidade de aplicação, preparo e a obtenção de produtos de baixo custo (PIANOVSKI, 2008; CORRÊA, 2012; FRANZOL e REZENDE, 2015).

Os produtos cosméticos, segundo a RDC Nº 7 da ANVISA, podem ser classificados em produtos de grau 1 e grau 2, sendo considerados os produtos de grau 2 como “*produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes (...) que possuem indicações específicas, cujas características exigem comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso*”. Assim, são encontrados diversos produtos cosméticos que carregam em suas fórmulas substâncias ativas, principalmente produtos para a pele. Atualmente, a demanda por esses produtos, cujo desenvolvimento e produção requerem altos padrões de qualidade para garantir eficácia e segurança ao consumidor, vem aumentando graças ao aumento da expectativa de vida associada ao bem-estar, uma vez que são capazes de tratar e prevenir alterações indesejadas na pele. Sendo assim, a pesquisa por novos ativos para incorporação em cosmético, principalmente os de caráter multifuncional demonstram-se muito atrativos para o mercado (AMARAL, 2010; RESENDE, 2013; BRASIL, 2015).

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Este trabalho teve como objetivo a investigação da eficácia do ácido ursólico através de avaliação *in vitro* de seu potencial antioxidante, despigmentante e antimicrobiano, a fim de explorá-lo como um ativo cosmético multifuncional que pudesse ser utilizado na prevenção de efeitos indesejáveis na pele, e que ao mesmo tempo pudesse atuar como um conservante antimicrobiano; a avaliação de seu potencial citotóxico *in vitro*; e o estudo de uma emulsão contendo o ativo.

3.2. *Objetivos específicos*

Caracterização de matéria-prima (MP) contendo AU

- Identificação qualitativa do AU por espectroscopia na região de infravermelho (IV);
- Avaliação da solubilidade do AU frente a solventes variados;

Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU

- Avaliação da atividade antioxidante;
- Avaliação da atividade despigmentante;
- Avaliação da atividade antimicrobiana;
- Avaliação do potencial citotóxico.

Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão

- Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE;
- Validação da metodologia analítica desenvolvida.

Incorporação do AU em emulsão

- Preparo e avaliação de características físico-químicas das emulsões preparadas;
- Avaliação da estabilidade das emulsões preparadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

Equipamentos

- ✓ Espectrofotômetro Spectrostar Nano, BMG LABTECH, com leitor de microplaca;
- ✓ Ultrassom Ultrasonic Cleaner, Unique®;
- ✓ Cromatógrafo líquido PDA analítico- Perkin Elmer Flexar, com desgaseificador, sistema quaternário de bombeamento, injetor manual de 6 vias Rheodyne, forno de coluna, detector PDA com cela analítica (190-700 nm) e detector UV-VIS com cela preparativa
- ✓ Coluna cromatográfica RP18 Waters® (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm)
- ✓ Coluna cromatográfica Phenomenex® C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm; 110A)
- ✓ Espectrofotômetro de absorção na região de infravermelho médio com transformada de Fourier-BRUKER, modelo VERTEX 70, com detector DLaTGS, faixa de leitura 400 a 4000 cm⁻¹
- ✓ Estufa para cultura bacteriológica ECB 1.2 digital Odontobrás
- ✓ Balança analítica Shimadzu modelo AY220
- ✓ Micropipetadores Eppendorf de 5000 (500 a 5000), 1000 (100 a 1000) e 100 (10 a 100) µL
- ✓ Cromatógrafo líquido Perkin Elmer Flexar, com desgaseificador, sistema de bombeamento, injetor manual e detector UV-VIS
- ✓ Estufa de CO₂ para crescimento celular- Shel Lab
- ✓ Centrífuga BOECO modelo U-32 R
- ✓ pHmetro digital- Gehaka PG 1800
- ✓ Viscosímetro digital programável- Brookfield modelo RV-III
- ✓ Centrífuga Centribio.

Reagentes, soluções e outros materiais

- ✓ Rosemary Extract 90% (AU) - Sabinsa Corporation;
- ✓ Ursolic Acid 99,2%- Sigma Aldrich®;
- ✓ Água destilada
- ✓ Água ultrapura obtida pelo sistema Mili-Q®
- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) grau analítico- Synth
- ✓ Metanol grau analítico- Synth
- ✓ Etanol grau analítico- Dinâmica
- ✓ Tirosinase (80 unidades/mL) Sigma Aldrich®
- ✓ Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH·)- Sigma Aldrich®
- ✓ Radical 2,2 -azinobis-(3-ethylbenzothiazoline) -6-sulfonic acid (ABTS^{•+})- Sigma Aldrich®
- ✓ Ácido ascórbico- Sigma Aldrich®
- ✓ Persulfato de potássio- Synth
- ✓ Tampão fosfato pH 6,8
- ✓ 3,4- Dihydroxy-L-phenylalanine (L- Dopa)- Sigma Aldrich®
- ✓ Placas de 96 poços- Falcom®
- ✓ Cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.
- ✓ Caldo tripticaseína de soja (TSB)- Prolab
- ✓ Placa de Petri 9 cm de diâmetro- Pyrex
- ✓ Meio de cultura ágar triptona de soja (TSA)- Prolab
- ✓ Antibióticos: cefazolina sódica e aztreonam- ABL
- ✓ Revelador 7-hidroxi-3H-phonoxazin-3-ona10-óxido (resazurina)- Sigma Aldrich®
- ✓ Cetearyl Alcohol
- ✓ Ceteareth-20
- ✓ Ethylhexyl Stearate
- ✓ Glyceryl Stearate
- ✓ Propylene Glycol
- ✓ Disodium EDTA

- ✓ Methylparaben
- ✓ Propylparaben
- ✓ Sodium Polyacrylate (Rapithix™ A-100)
- ✓ Filtro hidrofóbico de PTFE 0,22 µm
- ✓ Água ultrapura Mili-Q®
- ✓ HCl - Qhemis
- ✓ NaOH - Qhemis
- ✓ Solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes- Impex
- ✓ Ácido acético glacial grau HPLC- J.T.Baker
- ✓ Etanol grau HPLC- Applichem®
- ✓ Etanol grau HPLC- J.T Baker®
- ✓ Frascos para crescimento celular de 25 e 75 cm² de área de crescimento- TPP
- ✓ Meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) alta glicose- Cultilab
- ✓ Soro fetal bovino- Cultilab
- ✓ Solução antibiótica e antimicótica (100x- penicilina- 10000 U/mL, streptomina- 10 mg/mL e anfotericina B- 25 µg/mL - SLBB2618) - Sigma Aldrich®
- ✓ Phosphate Buffer Saline (PBS)
- ✓ Tripsina estéril 10x (Gamma Irradiated)- SAFC Biosciences™
- ✓ Tubos Falcon de 15 e 50 mL
- ✓ Filtro de seringa de 0,22 µm- KASV
- ✓ 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide MTT- Sigma Aldrich®

4.2. MÉTODOS

A fim de simplificar a terminologia, a matéria prima utilizada nos experimentos fornecida pela Sabinsa Corporatio® (Rosemary Extract- AU 90%) foi denominada por matéria-prima ácido ursólico (MPAU), e o padrão utilizado, comprado da Sigma Aldrich® foi denominado por padrão ácido ursólico (PDAU).

4.2.1. Caracterização de MPAU

4.2.1.1. Identificação qualitativa do AU por espectroscopia na região de IV

A identificação qualitativa do AU por espectroscopia de absorção na região de infravermelho foi realizada em espectrofotômetro de absorção na região de infravermelho médio com transformada de Fourier, na faixa de leitura de 400 a 4000 cm^{-1} . O equipamento utilizado está representado na Figura 4. Pequenas quantidades de amostra em pó de PDAU e de MPAU foram colocadas sobre o cristal de diamante presente no centro do equipamento, e dessa forma as amostras foram lidas diretamente com auxílio do software Opus 7,5 (LABORATÓRIO I MULTIUSUÁRIOS DE ANÁLISES QUÍMICAS).

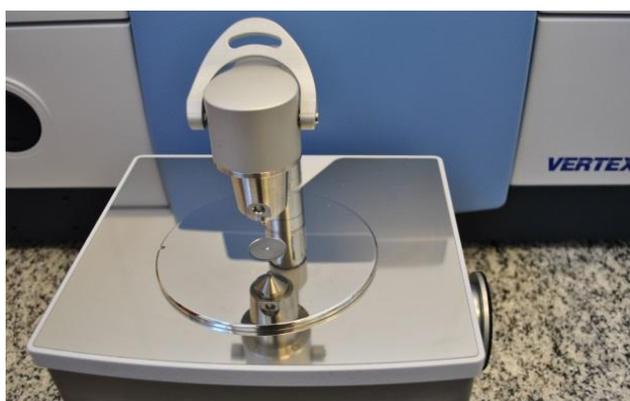


Figura 4. Espectrofotômetro de absorção na região IV Vertex 70- Bruker

Fonte: Laboratório I Multiusuário de Análises Químicas

4.2.1.2. Avaliação da solubilidade do AU

Os termos descritivos de solubilidade utilizados nas farmacopeias são expressos como “partes”, definidas pela dissolução de 1g da substancia em mililitros (partes) do solvente, sendo que cada termo tem um significado específico para os solventes, como pode ser observado no Quadro 3 (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

A avaliação da solubilidade do AU foi realizada utilizando tubos de ensaio de vidro, com 25 mm de diâmetro x 150 mm de altura, adicionando-se a 10 mg de MPAU alíquotas crescentes de diferentes solventes (de 10 em 10 μL), com o auxílio de

micropipetas, até total solubilização. Para otimização da solubilização, foi utilizado agitador de tubos Phoenix modelo AT 56, em velocidade média. Os solventes utilizados foram: água purificada, etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, clorofórmio e acetonitrila, todos com grau analítico.

Quadro 3. Significado dos termos descritivos de solubilidade

Solvente	Termo descritivo
Muito solúvel	Menos de 1 parte
Facilmente solúvel	De 1 a 10 partes
Solúvel	De 10 a 30 partes
Ligeiramente solúvel	De 30 a 100 partes
Pouco solúvel	De 100 a 1000 partes
Muito pouco solúvel	De 1000 a 10.000 partes
Praticamente insolúvel ou insolúvel	Mais de 10.000 partes

Fonte: Farmacopeia Brasileira

4.2.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU

4.2.2.1. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante do AU foi avaliada através de dois métodos amplamente utilizados em diferentes estudos da atividade antioxidante de ativos: método de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) e método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbensothiazoline) -6-sulfonic acid (ABTS^{•+}).

4.2.2.1.1. Método de inibição do radical DPPH[•]

O potencial de inibição do radical DPPH[•] pelo AU foi analisado segundo metodologias propostas por Mensor et al. (2001) e Chiari et al. (2012), com adaptações.

Para realização do ensaio, previamente foram preparados 50 mL de uma solução estoque de MPAU com concentração de 1,75 mg/mL em metanol (concentração escolhida a partir de ensaios prévios para definição de faixa máxima e mínima da curva analítica). Alíquotas da solução estoque foram adicionadas a 10

tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução metanólica de DPPH[•] a 0,004%, e volumes decrescentes de água destilada, obtendo um volume final de 3,5 mL para cada tubo, como pode ser observado na Tabela 1. Os tubos foram então mantidos ao abrigo da luz, e 30 minutos após o preparo, as absorvâncias das soluções finais foram determinadas em espectrofotômetro a 515 nm por espectroscopia na região UV. O experimento foi realizado em triplicata.

Tabela 1. Composição dos tubos reacionais para ensaio com o radical DPPH[•]

	TUBO										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[AU] (µg/mL)	0	50	100	150	200	250	300	350	400	450	500
V _{AU} (µL)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
V _{água} (µL)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

Obs.: tubo 0 = controle/ Fonte: autor

Para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH[•] pelo AU, foi utilizado a Equação 2 (MOLINEUX, 2004).

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

Em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$ = absorvância do DPPH[•] a 515 nm (controle);

$Abs_{amostra}$ = absorvância da amostra a 515 nm.

A fim de realizar estudo comparativo, o ensaio também foi realizado com um padrão de referência, no caso o ácido ascórbico (em faixa de concentração adequada a este ativo), potente antioxidante natural de baixo custo muito utilizado em preparações cosméticas (SCOTTI et al., 2007).

A análise dos resultados foi realizada utilizando as concentrações inibitórias de 50% do radical (IC₅₀) de cada ativo, obtidas através das curvas analíticas construídas, de % de inibição *versus* concentração do ativo.

4.2.2.1.2. Método de inibição do radical ABTS^{•+}

A inibição do radical ABTS^{•+} pelo AU foi verificada segundo metodologia proposta por Almeida et al. (2013), com adaptações.

Foi preparada previamente uma solução estoque de ABTS^{•+} com concentração de 7 mM (192 mg em 50 mL de água destilada), e uma solução estoque de persulfato de potássio com concentração de 140 mM (378,4 mg em 10 mL de água destilada), uma vez que a formação do radical é dependente da presença do persulfato. Assim, 5 mL da solução estoque de ABTS^{•+} foram misturados com 88 µL da solução estoque de persulfato de potássio, e a solução resultante foi mantida em repouso por aproximadamente 16 h, ao abrigo da luz. A fim de se obter uma absorbância de $0,7 \pm 0,05$, a 734 nm, uma alíquota dessa solução final foi diluída em etanol.

Também foi preparada uma solução estoque de MPAU em etanol com concentração de 523,63 µg/mL (concentração escolhida a partir de ensaios prévios para definição de faixa máxima e mínima da curva analítica).

Para a realização do teste, alíquotas da solução estoque de MPAU foram adicionadas a 10 tubos de ensaio contendo 2,0 mL da solução final de radical ABTS^{•+}, e volumes decrescentes de etanol, obtendo-se um volume final de 3,03 mL para cada tubo, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Composição dos tubos reacionais para ensaio com ABTS^{•+}

	TUBO										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
[AU] (µg/mL)	0	22,47	39,75	57,03	74,31	91,59	108,87	126,16	143,44	160,72	178
V _{AU} (µL)	0	130	230	330	430	530	630	730	830	930	1030
V _{etanol} (µL)	1030	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0

Obs.: tubo 0 = controle/ Fonte: autor

Em seguida as absorbâncias das soluções amostras dos tubos foram determinadas em espectrofotômetro a 734 nm, e a porcentagem de inibição do radical foi calculada através da Equação 3 (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ inibição do radical ABTS} = \frac{Abs_{m\acute{a}x} - Abs_{amostra}}{Abs_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad (3)$$

Em que:

$Abs_{m\acute{a}x}$ = absorv\~ancia do ABTS^{•+} a 734 nm (controle);

$Abs_{amostra}$ = absorv\~ancia da amostra a 734 nm.

O ensaio tamb\~em foi realizado com um padr\~ao de refer\~encia, o \~acido asc\~orbico, para estudo comparativo, em faixa de concentra\~ao adequada a este ativo.

A an\~alise dos resultados foi realizada utilizando as IC₅₀ do radical, de cada ativo, obtidas atrav\~es das curvas anal\~iticas constru\~idas, de % de inibi\~ao *versus* concentra\~ao do ativo.

4.2.2.2. Avalia\~ao da atividade despigmentante

A atividade despigmentante do AU foi determinada atrav\~es da atividade inibidora de tirosinase, em placa de 96 po\~cos, segundo metodologia proposta por Khazaeli et al. (2009), com adapta\~oes.

Foram preparadas previamente solu\~ao de tamp\~ao fosfato pH 6,8, solu\~ao de L-dopa a 4,5 mM em tamp\~ao, solu\~ao de tirosinase a 80 unidades/mL em tamp\~ao, e solu\~ao estoque de MPAU a 1000 μg/mL em DMSO (concentra\~ao escolhida a partir de ensaios pr\~evios para defini\~ao de faixa m\~axima e m\~inima da curva anal\~itica). Para montagem das placas de 96 po\~cos foram adicionados, a cada po\~co, volumes constantes de solu\~ao de L- dopa (45 μL) e de solu\~ao de tirosinase (25 μL), volumes decrescentes de solu\~ao tamp\~ao e al\~iquotas da solu\~ao estoque de AU, obtendo-se um volume final de 150 μL, como pode ser observado na Tabela 3. Cada po\~co foi preparado em triplicata na mesma placa.

A placa foi mantida em repouso por aproximadamente 10 minutos, e ap\~os esse tempo foi realizada leitura das absorv\~ancias a 490 nm em espectrof\~ot\~metro com leitor de placas.

Para o c\~alculo da porcentagem de inibi\~ao da tirosinase foi utilizada a Equa\~ao 4.

$$\%inibição = \left(1 - \frac{Abs\ amostra}{Abs\ controle}\right) \times 100 \quad (4)$$

Em que:

% Inibição = porcentagem de inibição da tirosinase;

$Abs_{amostra}$ = absorvância da amostra;

$Abs_{controle}$ = absorvância na ausência de amostra (controle).

Tabela 3. Composição dos poços reacionais do ensaio com tirosinase.

Poço	$V_{tampão}$ (μL)	V_{AU} (μL)	[AU] μg/mL
A ₁₋₃	80	0	0
B ₁₋₃	75	5	33,00
C ₁₋₃	70	10	66,00
D ₁₋₃	65	15	100,00
E ₁₋₃	60	20	133,00
F ₁₋₃	55	25	166,00
G ₁₋₃	50	30	200,00
H ₁₋₃	45	35	233,00
A ₄₋₆	40	40	266,00
B ₄₋₆	35	45	300,00
C ₄₋₆	30	50	333,00
D ₄₋₆	25	55	366,00
E ₄₋₆	20	60	400,00
F ₄₋₆	15	65	433,00
G ₄₋₆	10	70	466,00
H ₄₋₆	5	75	500,00
A ₇₋₉	0	80	533,00

Obs.: poços A₁₋₃= controle/ Fonte: autor

Também foi realizado experimento com o padrão de referência ácido ascórbico para estudo comparativo (em faixa de concentração adequada a este ativo), por se tratar de um ativo natural de baixo custo que apresenta alto poder despigmentante (efeito clássico).

A análise dos resultados foi realizada utilizando as IC₅₀ de tirosinase, de cada ativo, obtidas através das curvas analíticas construídas, de % de inibição *versus* concentração do ativo.

4.2.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana do AU foi realizada seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006b), com adaptações. As cepas utilizadas no experimento foram: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228; *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. O ensaio foi dividido em duas etapas: determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e determinação da concentração bactericida mínima (CBM).

Preparo dos inóculos

O inóculo para realização dos ensaios foi feito em caldo tripticaseína de soja (TSB), preparado a partir da dissolução em água, sob aquecimento e posteriormente esterilizado em autoclave (121 °C, 1 atm) durante 15 minutos.

O repique das culturas foi realizado com alça de platina, e após esse procedimento, as culturas foram mantidas por 24 horas em estufa de cultura bacteriológica (35°C ± 2°C) para crescimento. O inóculo foi então padronizado em espectrofotômetro a 580 nm, com uma concentração de aproximadamente 1,0 x 10⁸ UFC/mL (transmitância de 25% ± 2%). A suspensão foi então novamente diluída em TSB (1:100), obtendo-se uma suspensão final de 1,0 x 10⁶ UFC/mL, utilizada no experimento (CLSI, 2006b).

Preparo das amostras contendo MPAU

Foram preparados 5 ml de uma solução metanólica de MPAU a 400 µg/ml, solubilizando-se o ativo em metanol com auxílio do ultrassom durante aproximadamente 5 minutos.

Determinação da CIM

A determinação da CIM foi realizada através de diluição em microplacas de 96 poços de acordo com a metodologia descrita para bactérias aeróbicas da norma M7-A6 do Manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006a).

As microplacas foram preparadas adicionando-se a todos os poços 100 µL de água destilada estéril. Nos poços designados por A foi realizado controle de meio (água), e os designados por B foi realizado controle de crescimento bacteriano (controle negativo), e, portanto, nesses poços foram adicionados 100 µL de caldo TSB. Nos

poços determinados pela letra C foram adicionados 100 µL de solvente (controle de solvente). Nos designados por D, foram adicionados 100 µL de solução de antibiótico (400 µg/ml- controle positivo): cefazolina para *S. aureus* e *S. epidermidis* e aztreonam para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Nos poços determinados pelas letras E, F, G e H foram adicionados 100 µL da solução estoque de AU. Assim, todos os poços passaram por diluições sucessivas seguidas da adição de 100 µL de inóculo, com exceção dos poços designados por A.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata para cada cepa.

O esquema do preparo das microplacas pode ser observado na Figura 5.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Controle do meio (água)	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controle cresc. bacteriano (negativo)	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Controle solvente	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Antibiótico (controle positivo)	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Amostra	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 5. Esquema do preparo das microplacas para determinação da CIM

Fonte: autor

Para avaliação dos resultados, em todos os poços foram adicionados 30 µL de solução de resazurina (100 µg/ml), revelador colorimétrico amplamente utilizado em ensaios antimicrobianos. Em aproximadamente 2 horas as placas foram sendo reveladas, exibindo coloração azul onde houve inibição de crescimento bacteriano e coloração rosa onde houve crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002).

Determinação da CBM

A CBM foi determinada através do crescimento bacteriano em meio ágar TSA em placa de Petri. O conteúdo dos poços das linhas contendo solução amostra (em

diferentes concentrações) das microplacas foram replicadas em placas de Petri contendo ágar TSA, com auxílio de hastes de madeira estéreis. As placas de Petri foram então incubadas a 35°C por 24 horas, para verificação ou não de crescimento bacteriano. Os resultados de morte bacteriana foram então confirmados através da análise conjunta com as placas de 96 poços.

4.2.2.4. Avaliação do potencial citotóxico

O potencial citotóxico do AU foi avaliado através do método colorimétrico com o 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), proposto por Mosmann (1983) e por Chiari et al. (2014), com adaptações, utilizando queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (Hacat).

Cultivo celular

O cultivo das células foi realizado em frascos para crescimento celular de 25 e 75 cm² com meio DMEM estéril enriquecido com soro fetal bovino a 10% e antibiótico (meio completo), por aproximadamente quatro semanas. A cada troca de meio as garrafas foram lavadas com solução de Phosphate Buffer Saline (PBS) 1x. As garrafas contendo as células foram mantidas em estufa apropriada para crescimento celular a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

Ensaio com MTT

Para o plaqueamento em microplacas de 96 poços, as células com confluência entre 80-90% foram previamente lavadas com PBS, tripsinizadas e centrifugadas com meio de cultura DMEM completo a 1300 rpm durante 3 minutos. A seguir, foi realizada uma diluição e suspensão das células em meio completo, seguida de uma contagem em câmara de Neubauer com padronização (concentração requerida de 5x10⁵ células/mL). Dessa forma, 100 µL desta suspensão padronizada foram pipetados em cada poço da microplaca, que foi incubada em estufa por 24 horas para adesão das células.

As amostras contendo MPAU foram preparadas em tubo Falcon a partir de uma solução estoque de MPAU a 100 µg/mL (em DMSO), em que uma alíquota foi diluída em 3 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino, resultando em uma solução a 2% de DMSO e concentração de 50 µg/mL de MPAU. Para o controle de solvente foram

preparadas amostras contendo somente DMSO a 2% em meio de cultura sem soro fetal. As amostras foram então filtradas com filtro de seringa de 0,22 μm em tubos estéreis.

As amostras finais, a serem adicionadas nas placas de 96 poços (somente metade da placa foi utilizada) foram preparadas em tubos de 2 mL através de diluição seriada, como é possível observar na Figura 6. 100 μL de cada solução diluída foram então adicionados em triplicata nas linhas que vão de B a G (1 a 3 para AU e 4 a 6 para controle de solvente), do menos concentrado para o mais concentrado. Na linha A foi realizado o controle negativo (somente meio), e na linha H foi realizado o controle positivo (meio a 10% de DMSO). O esquema de montagem das placas pode ser observado na Figura 7.

As placas foram então tampadas e levadas para estufa por 24 horas.

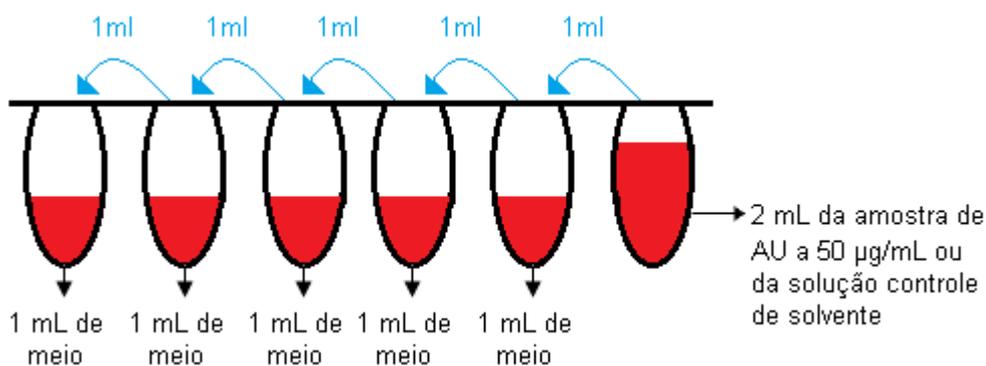


Figura 6. Preparo das amostras finais do ensaio com MTT.

Fonte: autor

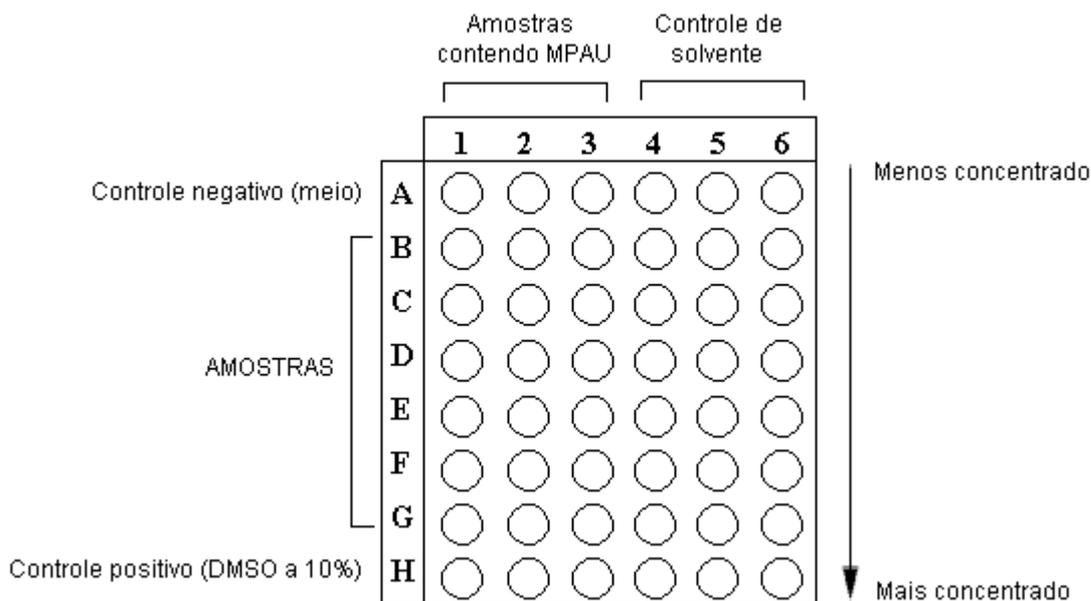


Figura 7. Esquema da montagem das placas para o ensaio com MTT

Fonte: autor

Após 24 horas o tratamento foi então removido da placa, que foi lavada com PBS (100 μ L em cada poço). 100 μ L de solução de MTT (1 mg/mL) foram adicionados a todos os poços, e a placa foi incubada em estufa por 3 horas. O MTT foi então removido da placa e foram adicionados 100 μ L de álcool isopropílico em cada poço para solubilização dos cristais de formazana.

O conteúdo dos poços da placa foi então lido em espectrofotômetro em 595 nm, e os valores de absorvâncias obtidos foram utilizados para o cálculo da % de células vivas, através das Equações 5 e 6 (ZHANG et al., 2004).

$$\% \text{ células mortas} = \frac{(Abs_{Cn} - Abs_{Am})}{Abs_{Cn}} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ células vivas} = 100 - \% \text{ células mortas} \quad (6)$$

Em que:

Abs_{Cn} = absorvância do controle negativo

Abs_{Am} = absorvância da amostra

Para análise dos resultados foi então construída uma curva de analítica, em que foi possível a obtenção do IC₅₀, a partir da equação da reta.

Foram realizados 3 ensaios independentes.

4.2.3. Preparo das emulsões

A preparação de escolha para o estudo foi uma emulsão do tipo O/A utilizada por Spagnol (2014), cuja fórmula encontra-se descrita na Tabela 4. Para o preparo, em escala laboratorial, os constituintes tanto da fase oleosa quanto da fase aquosa foram pesados em balança semianalítica, em béqueres distintos. A fase aquosa foi então submetida à agitação mecânica manual para dispersão dos constituintes e formação de um gel, uma vez que sua composição apresenta um espessante hidrofílico sintético, o Sodium Polyacrylate. Ambas as fases foram então aquecidas em torno de 60-70°C para completa solubilização dos componentes, e, por mistura direta, a fase oleosa foi vertida na fase aquosa (uma vez que o contrário não seria viável devido a formação do gel), sob agitação, para total homogeneização. Para a emulsão contendo AU (EM-AU), a MPAU foi adicionada à fase oleosa, na concentração de 1,5 %. Também foi preparada uma emulsão base (EM-BS), sem AU, para fins comparativos.

Tabela 4. Fórmula da emulsão utilizada

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

Fonte: Spagnol, 2014.

As emulsões obtidas foram analisadas a partir de suas características físico-químicas a 25 °C, como pH (solução a 10% em pHmetro digital), viscosidade (medição direta com viscosímetro, spindle TE (#95) a 25 rpm) e características microscópicas.

4.2.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão

4.2.4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE

A utilização de metodologias analíticas é uma ferramenta de grande importância tanto no controle de qualidade, como no desenvolvimento de novos produtos. Sendo assim, foi desenvolvida uma metodologia analítica para identificação e quantificação do AU na preparação cosmética utilizada (emulsão dermocosmética), a fim de auxiliar no desenvolvimento do projeto.

Para o desenvolvimento da metodologia analítica por CLAE, previamente foi realizada uma varredura na região UV em espectrofotômetro, de soluções de MPAU e PDAU, na concentração de 600 µg/mL, para a escolha do comprimento de onda a ser utilizado no cromatógrafo líquido.

O desenvolvimento da metodologia por CLAE foi realizada em cromatógrafo líquido PDA analítico- Perkin Elmer Flexar, constituído por desgaseificador, sistema quaternário de bombeamento, injetor manual de 6 vias Rheodyne, forno de coluna, detector PDA com cela analítica (190-700 nm) e detector UV-VIS com cela preparativa, representado na Figura 8, utilizando coluna RP18 (XDB, 4,6 x 250 mm, 5 µm, Waters), $\lambda=210$ nm, e volume de injeção de 20 µL (Laboratório de Pesquisa Multiusuário).

Foram preparadas duas soluções estoque de concentração 1200 µg/ml cada uma, a partir da dissolução de 0,12 g de MPAU e PDAU em 100 mL de etanol grau HPLC. As amostras finais, injetadas no equipamento foram preparadas diluindo-se alíquotas da solução estoque em balão de 5 ml com etanol, e filtrando-as com filtro hidrofóbico de PTFE 0,22 µm. As concentrações finais obtidas foram de 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL para MPAU, e 600 µg/mL para PDAU.

Como fase móvel foi utilizada água ultrapura Mili- Q[®] acidificada com ácido acético glacial grau HPLC, e etanol grau HPLC.

Para obtenção da condição que exibisse menor tempo de análise, diminuição de danos à coluna cromatográfica e melhor perfil cromatográfico (ótima separação de compostos e pico e linha de base com boa resolução), diferentes parâmetros foram sendo modificados, tais como preparo da amostra, concentração da amostra, vazão, proporção da fase móvel e acidificação da água.



Figura 8. Cromatógrafo Líquido Perkin Elmer Flexar

Fonte: Laboratório de pesquisa multiusuário

O processo de validação de amostras, metodologias, equipamentos entre outros requer diferentes tipos de ensaios e parâmetros a serem seguidos a fim de garantir a qualidade e confiabilidade do sistema, para que assim possam fornecer dados com alto grau de precisão e exatidão. O teste de conformidade do sistema é parte integrante do processo de validação e pode variar de acordo com o sistema que desejasse trabalhar, sendo fundamental o uso de farmacopeias para auxiliar da definição dos parâmetros a serem utilizados (RIBANI et al.,2004; ICH, 2005;).

Para a qualificação de um sistema de CLAE, diversos parâmetros podem ser utilizados para verificar a conformidade do sistema, como fator de retenção (k), fator de alargamento (T_F), número de pratos (N), entre outros. Dessa forma, para análise do sistema cromatográfico foram selecionados os seguintes parâmetros: volume vazio (V_V), tempo de retenção (T_R), área do pico, fator de retenção (K), fator de alargamento

(T_F), fator de assimetria (A_S) e número de pratos (N), calculados com base na média dos valores obtidos em três cromatogramas de soluções com concentração 600 $\mu\text{g/mL}$.

Para o cálculo dos parâmetros selecionados foram utilizadas as Equações 7, 8, 9, 10 e 11 (USP).

$$V_V = T_V \times F \quad (7)$$

$$K = \frac{(T_R - T_V)}{T_V} \quad (8)$$

Em que:

T_V = tempo do volume vazio

F = vazão (mL/min)

$$T_F = \frac{W_{0,05}}{2f} \quad (9)$$

$$A_S = \frac{(W_{0,1} - f_{0,1})}{f_{0,1}} \quad (10)$$

Em que:

$W_{0,05}$ = largura do pico a 5 % da altura;

$W_{0,1}$ = largura do pico a 10% da altura;

f = largura medida do início do pico até o meio dele (parte frontal do pico).

$$N = 5,54 \left(\frac{T_R}{W_{50}} \right)^2 \quad (11)$$

Em que:

W_{50} = largura do pico na metade da altura

4.2.4.2. Validação da metodologia desenvolvida

A metodologia desenvolvida foi validada em cromatógrafo líquido Perkin Elmer Flexar, com desgaseificador, sistema de bombeamento, injetor manual e detector UV-VIS, utilizando software Chromera® versão 3.4.0.5712.

Os parâmetros adotados para validação da metodologia desenvolvida foram: linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão,

seletividade e robustez, segundo legislação vigente do ICH e ANVISA (ICH, 2005; BRASIL, 2017).

4.2.4.2.1. Linearidade

A partir de uma solução estoque de concentração 1200 µg/mL, foram preparadas 5 soluções diluídas de MPAU: 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL, em triplicata cada uma, em três ensaios independentes. Todas as soluções foram preparadas com os mesmos constituintes e proporção da fase móvel, isto é, etanol: água acidificada com ácido acético a 1% - 85:15 (inclusive as soluções dos outros parâmetros adotados). A relação linear foi demonstrada através da resposta analítica proporcional individualizada de cada concentração utilizada, com limite de desvio padrão relativo de 5%. Os dados utilizados foram resultado da média dos três ensaios, demonstrados através de gráficos da área de pico *versus* concentração do AU, gráfico de resíduos com análise estatística, equação de regressão de y em x, coeficiente de determinação e significância do coeficiente angular.

4.2.4.2.2. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) representa a menor quantidade detectável de um analito em determinada amostra. Para o cálculo do LD do AU na amostra foi utilizada a Equação 12, a partir da média dos resultados das três curvas analíticas obtidas na linearidade (ICH, 2005).

$$LD = \frac{DPa \times 3,3}{IC} \quad (12)$$

Em que:

DPa = desvio padrão da média das intersecções com o eixo y;
IC = inclinação média das curvas analíticas.

4.2.4.2.3. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) pode ser definido como a concentração mais baixa do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis em condições experimentais. Para o cálculo do LQ do AU na amostra foi utilizada a

Equação 13, a partir da média dos resultados das três curvas analíticas obtidas na linearidade (ICH, 2005).

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC} \quad (13)$$

Em que:

DPa = desvio padrão da média das intersecções com o eixo y;
IC = inclinação média das curvas analíticas.

4.2.4.2.4. Precisão

Para estudo da precisão foram preparadas sete soluções de AU com concentração de 600 µg/mL (escolhida por ser o meio da curva analítica obtida no estudo de linearidade), a partir de uma solução estoque de 1200 µg/mL. Dessa forma, o parâmetro foi avaliado através da repetibilidade intradia (próprio analista), em que as sete replicatas foram analisadas sob as mesmas condições experimentais e no mesmo dia; e da precisão intermediária (entre analistas), em que cada analista preparou e analisou sete replicatas em dias diferentes, sob as mesmas condições experimentais.

Os resultados foram verificados por meio do desvio padrão relativo (DPR), com valor máximo fixado em 5%, definido de acordo com a finalidade da metodologia, tipo de amostra e concentração do analito. Além disso, foi realizada análise estatística para os resultados obtidos entre analistas a fim de verificar possíveis diferenças. O cálculo do DPR está demonstrado na Equação 14 (ICH, 2005).

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (14)$$

Em que:

DP = desvio padrão das amostras;
CMD = concentração média das amostras.

4.2.4.2.5. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da identificação qualitativa de interferentes de matriz e de produtos de degradação presentes nos cromatogramas obtidos a partir da submissão das amostras ao método desenvolvido.

Para avaliar a presença de componentes da matriz, três soluções foram submetidas ao método: a) solução placebo (SPcb), preparada a partir da diluição em fase móvel de uma solução estoque de emulsão; b) solução padrão de AU (SPd) a 600 µg/mL, preparada a partir da diluição em fase móvel de uma solução estoque de MPAU a 1200 µg/mL; c) solução amostra (SAm) a 600 µg/mL de AU, preparada a partir da diluição em fase móvel da solução estoque contendo emulsão e da solução estoque de AU a 1200 µg/mL. Obs.: antes da diluição das soluções estoque contendo emulsão foi realizada filtração com papel de filtro. Antes de serem injetadas no equipamento as soluções finais foram filtradas em filtro de seringa de 0,22 µm.

Na avaliação da presença de produtos de degradação, uma alíquota de uma solução estoque de MPAU a 1200 µg/mL foi diluída para 600 µg/mL e submetida a condições estresse, a fim de forçar a obtenção de subprodutos de degradação que pudessem causar interferência nas análises. As condições estresse utilizadas, submetidas a uma temperatura de 80 °C, foram solução ácida de HCl 0,01 mol/L (pH= 3,0), solução básica de NaOH 0,1 mol/L (pH= 10,0), solução de peróxido de hidrogênio a 3%, luz UV e água a 80 °C, por um período total de 48 horas, em que foram feitas coletas nos tempos 0, 2, 4, 8, 24 e 48 horas. As soluções coletadas foram filtradas em filtro de seringa e injetadas no cromatógrafo.

Os cromatogramas obtidos foram avaliados através de sobreposição dos cromatogramas dos tempos 0, 8, 24 e 48 horas.

4.2.4.2.6. Exatidão

Por se tratar de uma metodologia proposta para um analito em uma matriz complexa (emulsão), a exatidão foi avaliada por meio de ensaio de recuperação, seguindo método de adição de quantidades conhecidas de “padrão” à amostra (no caso, a emulsão). Para realização do ensaio, três concentrações relativas à curva analítica de linearidade da metodologia foram escolhidas como concentrações finais à adição de padrão: 480 µg/mL (R1- 80%), 600 µg/mL (R2- 100%) e 720 µg/mL (R3-

120%), contemplando assim o que se pede nos compêndios oficiais (concentração baixa, média, alta).

Para realização do experimento, duas soluções estoque foram preparadas: a) 50 mL de solução padrão (Pd), contendo MPAU a 1200 µg/mL; b) 50 mL de solução amostra (Am) contendo 1,2 g de emulsão (correspondente a uma quantidade de emulsão preparada com AU a 1200 µg/mL). O preparo de 10 mL das soluções diluídas seguiu-se adicionando volumes crescentes de solução estoque Pd a um volume constante de solução estoque Am (completos com fase móvel quando necessário), como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5. Preparo das soluções diluídas para análise da exatidão.

	Volume de solução estoque Am (mL)	Volume de solução estoque Pd (mL)	Concentração final de AU no balão (µg/mL)
Pd	-	5	600
R₁	4	4	480
R₂	4	5	600
R₃	4	6	720

Fonte: autor

As soluções foram preparadas em triplicata e após preparo foram filtradas em filtro de seringa. Para cada concentração foram calculados os DPR, com máximo de 5% e a porcentagem de recuperação, podendo variar de 95 a 105%. Foram realizados 3 ensaios em dias diferentes, e as recuperações finais R1, R2 e R3 foram obtidas pelas recuperações médias de cada dia. Essas recuperações finais foram utilizadas no cálculo do DPR final, com máximo fixado em 5%.

A recuperação média foi obtida através da Equação 15.

$$Rec. (\%) = \frac{CME}{CT} \times 100 \quad (15)$$

Em que:

CME= concentração média experimental

CT= concentração teórica

4.2.4.2.7. Robustez

A robustez da metodologia desenvolvida foi avaliada realizando-se modificações nas condições cromatográficas estabelecidas no método. Para isso, foram preparadas soluções com concentração de 600 µg/mL as quais foram testadas para cada nova condição, em triplicata. As condições alteradas foram:

- Vazão da fase móvel: 0,58 mL/min; 0,60 mL/min; 0,62mL/min;
- Proporção de fase móvel: etanol: água acidificada 87: 13; 85:15; 83:17;
- Marca do etanol: J.T Baker® e Applichem®;
- Comprimento de onda: 208 nm; 210 nm; 212 nm;
- Marca da coluna: Waters® e Phenomenex®.

Para análise dos resultados obtidos foi calculado o DPR entre amostras submetidas à mesma condição, o DPR da média de cada condição (relativo à concentração de 600 µg/mL) e o DPR da porcentagem relativa à concentração teórica obtida em cada condição. Para todos os DPR foi estabelecido o valor máximo de 5%.

4.2.5. Avaliação da estabilidade das emulsões

A estabilidade das emulsões preparadas foi avaliada através da estabilidade preliminar, segundo sugestões do Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos da ANVISA de 2004 e ISAAC et al. (2008), com adaptações.

Após o preparo, a EM- BS e a EM- AU foram acondicionadas em 5 frascos de vidro de 30 mL cada um, para que fossem expostas a condições extremas, como temperatura elevada (estufa a 40 °C), temperatura baixa (geladeira a 5 °C), radiação luminosa indireta e ciclos de congelamento e descongelamento. Uma amostra de cada emulsão foi deixada em temperatura ambiente, ao abrigo de luz, para comparação.

Para a análise das amostras foram avaliadas características organolépticas, como aspecto, cor e odor e características físico-químicas, tais como pH, viscosidade e teor, em triplicata.

O ensaio de estabilidade teve início 24 horas após o preparo das amostras (T0), ou seja, em T1, e teve duração de 15 dias, sendo que as amostras foram analisadas a cada 3 dias (T1, T3, T6, T9, T12, T15), com exceção das amostras do ciclo de congelamento e descongelamento que foram submetidas a ciclos de 24 horas,

durante 12 dias (6 ciclos), tendo sido analisadas no T1 e no T12 . Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Para análise dos resultados foram construídos gráficos para cada característica avaliada, em função dos tempos de análise, para uma melhor visualização dos resultados. Também foi realizado estudo comparativo dos resultados obtidos na análise de teor da amostra por estatística ANOVA. As comparações foram embasadas entre o teor dos tempos analisados da EM-AU, a fim de avaliar se houve estabilidade do ativo na formulação. A referência para as análises foi com relação a T1.

4.2.5.1. Teste de centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado em T1, antes do início das análises da estabilidade, para avaliação de sinais de instabilidade, tais como separação de fase, coalescência, precipitação, entre outros. Para tanto, aproximadamente 5 g de cada amostra foram colocados em tubos Falcon de 15 mL, e submetidas à centrifugação a 3000 rpm, por 30 minutos (BRASIL, 2004; ISAAC et al., 2008).

4.2.5.2. Determinação de pH

Para a determinação do pH das amostras, foram preparadas dispersões a aquosas com as emulsões a 10%. O pH foi determinado em pHmetro, pela inserção do eletrodo nas dispersões por aproximadamente 1 min (ISAAC et al., 2008).

4.2.5.3. Determinação da viscosidade

A viscosidade das amostras foi determinada em viscosímetro digital, com rotação de 25 rpm, utilizando spindle TE (#95), durante 1 min. O spindle foi escolhido devido ao seu tamanho ser compatível com o diâmetro dos frascos utilizados e, sendo assim, a rotação empregada baseou-se na resistência do spindle de escolha. As triplicatas foram realizadas em 3 pontos distintos da amostra.

4.2.5.4. Determinação do teor de AU

O teor de AU nas amostras de EM-AU foi determinado no início, meio e fim da estabilidade, ou seja, em T1, T9 e T15, através do método desenvolvido por CLAE. Para o preparo das amostras a serem injetadas no cromatógrafo, previamente foi preparada uma solução estoque com a emulsão, em que 1g da emulsão foi diluída em 10 mL de solvente (mesmos constituintes e proporção da fase móvel), obtendo-se

dessa forma, uma solução com concentração de AU de 1500 µg/mL. Esta solução foi então filtrada em papel de filtro, e uma alíquota foi diluída em 5 mL de solvente, obtendo-se assim uma solução com concentração de 600 µg/mL, que foi filtrada em filtro de seringa de 0,22 µm e injetada no equipamento. A análise dos resultados foi realizada utilizando a equação da curva analítica de linearidade do método.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização de MPAU

5.1.1. Identificação qualitativa do AU por espectroscopia na região IV

Os espectros de infravermelho obtidos para o PDAU e para a MPAU foram dados através da transmitância (%) versus número de onda (cm^{-1}) e podem ser observados nas Figura 9 e Figura 10, respectivamente.

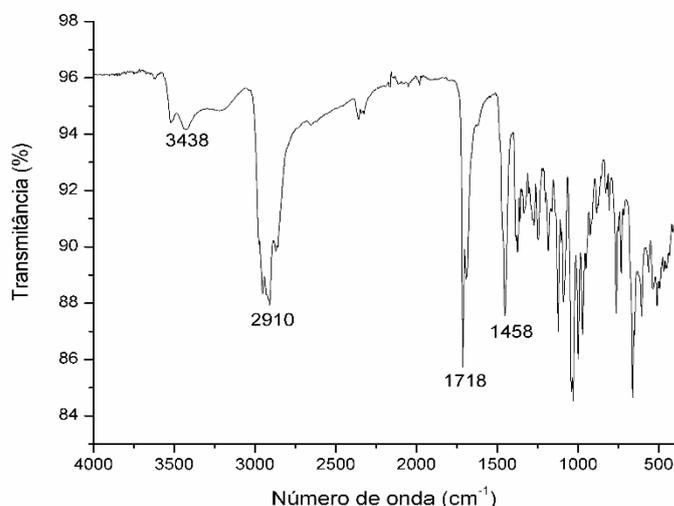


Figura 9. Espectro de absorção IV de PDAU

Fonte: autor

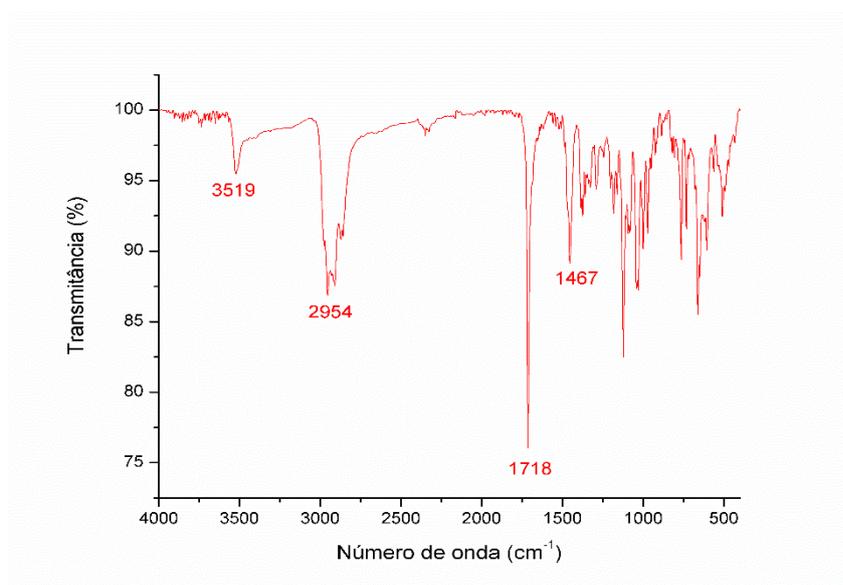


Figura 10. Espectro de absorção IV de MPAU

Fonte: autor

Observando os espectros de IV obtidos tanto para PDAU quanto para MPAU, é possível notar características marcantes dos tipos de vibrações presente dos grupos funcionais da molécula de AU. A banda forte presente em torno de 1718 cm^{-1} é representativa da ligação C=O de ácidos carboxílicos, que pode ser observada da faixa de 1730 a 1700 cm^{-1} . Já o estiramento O-H também de ácidos carboxílicos é representado por uma banda larga que vai aproximadamente de 3400 a 2400 cm^{-1} e é centrada por volta de 3000 cm^{-1} , sendo que esse tipo de vibração se sobrepõe às vibrações C-H, o que pôde ser observado nas amostras testadas. Os estiramentos C-H (sp^3) estão presentes na maioria dos espectros de compostos orgânicos e aparecem na região que compreende 3000 a 2850 cm^{-1} , como também pode ser observado. Já os dobramentos CH_2 que ocorrem por volta de 1465 cm^{-1} também se mostraram presentes nos espectros analisados (PAVIA et al., 2010; ANTONIO et al., 2017).

A fim de comprovar a pureza da amostra utilizada nos ensaios seguintes (MPAU) os espectros foram sobrepostos para comparação dos resultados, como pode ser observado na Figura 11. A sobreposição demonstrou que as amostras são equivalentes.

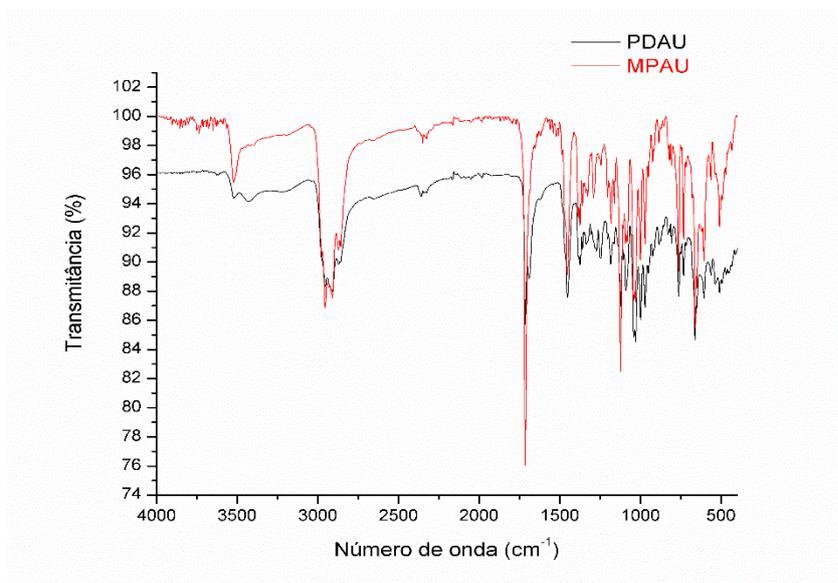


Figura 11. Sobreposição dos espectros IV de PDAU e MPAU

Fonte: autor

5.1.2. Avaliação da solubilidade do AU

A fim de diminuir o gasto tanto de soluto, quanto de solvente, as quantidades foram ajustadas proporcionalmente, utilizando 10 mg de AU como referência, ao invés de 1g. Os resultados obtidos foram embasados nos termos descritivos da Farmacopeia Brasileira (2010) e podem ser observados no Quadro 4.

Quadro 4. Solubilidade do AU frente a solventes diversos

Solvente	Solubilidade (termo descritivo)
Água	Praticamente insolúvel (acima de 100 ml)
Etanol	Pouco solúvel (até 10 ml)
Metanol	Ligeiramente solúvel (até 1ml)
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Ligeiramente solúvel (até 1 ml)
Acetato de etila	Pouco solúvel (até 10 ml)
Clorofórmio	Pouco solúvel (até 10 ml)
Acetonitrila	Muito pouco solúvel (até 100 ml)

Fonte: autor

A solubilidade de uma substância pode ser definida como a quantidade máxima capaz de ser solubilizada em determinado solvente, segundo sua polaridade. A solubilidade reportada nas monografias oficiais de fármacos (farmacopeias) geralmente indica a solubilidade do fármaco a 25 °C, utilizando a água como solvente de referência. Para o controle de qualidade de fármacos, esse parâmetro qualitativo deve ser utilizado como complemento de outras análises. Dessa forma, a solubilidade do AU foi investigada a fim de auxiliar na identificação qualitativa da MP utilizada, e na escolha dos solventes a serem utilizados nos ensaios realizados (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; ATKINS et al., 2012; SPAGNOL, 2014).

Segundo o Merk Index (2001), o AU é ligeiramente solúvel em metanol (1 parte em 88 partes), pouco solúvel em etanol (1 parte em 178 partes), pouco solúvel em clorofórmio (1 parte em 388 partes) e insolúvel em água, confirmando assim a solubilidade testada do AU. Além disso, também foi observado nos testes realizados, que o AU se demonstrou ligeiramente solúvel em DMSO, pouco solúvel em acetato de etila e muito pouco solúvel em acetonitrila.

Assim, a água foi considerada como o solvente menos indicado para ser utilizado nas metodologias analíticas utilizadas, uma vez que o ativo em estudo é praticamente insolúvel nesse solvente, podendo comprometer a eficiência do teste. Por esse motivo, os solventes de escolha foram o metanol, DMSO e preferencialmente o etanol, por ser considerado um solvente menos tóxico.

5.2. Avaliação da eficácia e da citotoxicidade “in vitro” do AU

5.2.1. Avaliação da atividade antioxidante

5.2.1.1. Método de inibição do radical DPPH

Na literatura existem diversos métodos para avaliação da atividade antioxidante de ativos. O método de inibição do radical livre DPPH[•] é um deles e baseia-se redução do radical (evitando assim sua oxidação) através de moléculas doadoras de hidrogênio, passando da cor violeta para uma cor residual amarelo-claro. Essa alteração de cor produzida também gera decréscimo na absorbância da amostra. Assim, com a finalidade de comprovar dados da literatura referentes à capacidade

antioxidante do AU, o método em questão foi escolhido por se tratar de um método relativamente simples e eficaz, facilmente reproduzível e de baixo custo. Os tubos reacionais do ensaio realizado com AU estão representados na Figura 12 (MOLYNEUX, 2004).



Figura 12. Tubos reacionais do AU frente ao DPPH·

Fonte: autor

Para análise dos resultados obtidos, foram construídas curvas de analíticas tanto para o AU, como para o padrão de referência utilizado (AA), contendo a equação e o R^2 de cada reta correspondente, sendo possível, desta forma, o cálculo da IC_{50} de DPPH· para os dois ativos, como pode ser observado nas Figura 13 e Figura 14.

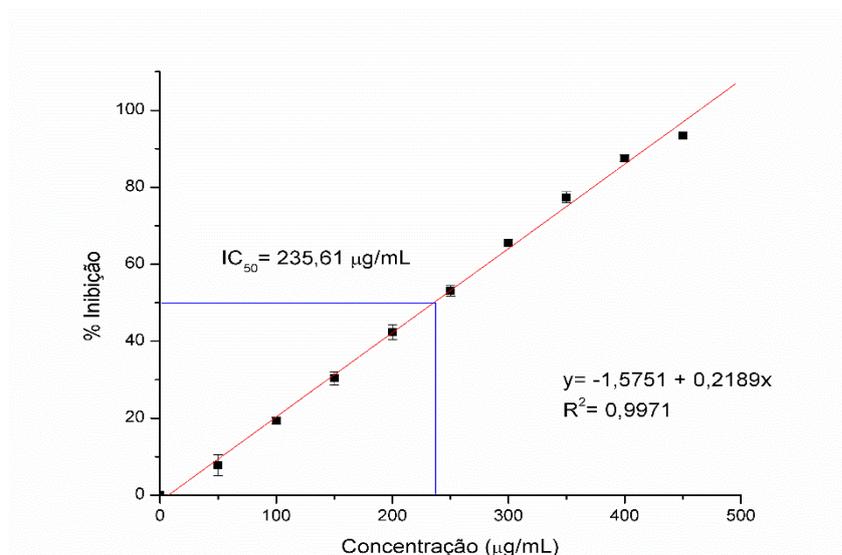


Figura 13. Curva analítica do AU para a porcentagem de inibição de DPPH·

Fonte: autor

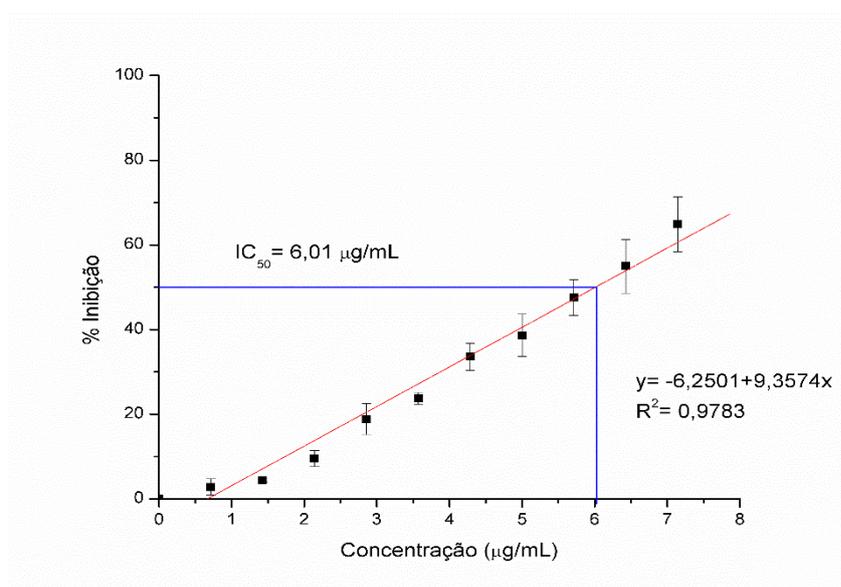


Figura 14. Curva analítica do AA para a porcentagem de inibição de DPPH•

Fonte: autor

5.2.1.2. Método de inibição do radical ABTS^{•+}

Outro método colorimétrico bastante utilizado na avaliação da atividade antioxidante de compostos, por ser simples e de baixo custo, é o método de inibição do radical ABTS^{•+}. O princípio do método baseia-se na redução do radical a partir de uma molécula com forte potencial oxidativo (antioxidante), produzindo alteração de cor e diminuição de absorvância. Assim, o ABTS^{•+} na ausência de antioxidante apresenta uma coloração azul esverdeado, e à medida que é submetido a um antioxidante, ele se reduz, tornando-se mais claro, até chegar a incolor. Na Figura 15 é possível observar a alteração de cor do ABTS^{•+} frente a diferentes concentrações de AU na amostra (EREL, 2004).

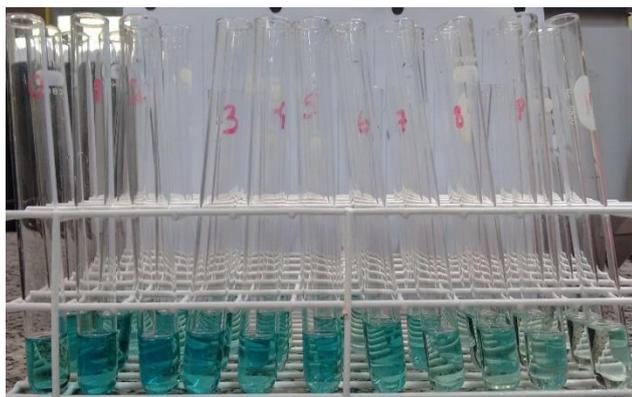


Figura 15. Tubos reacionais do AU frente ao ABTS^{•+}

Fonte: autor

As curvas analíticas para análise dos resultados do AU e do padrão de referência (AA) frente ao ABTS^{•+} foram construídas a partir da porcentagem de inibição do radical *versus* concentração do ativo, e estão demonstradas nas Figura 16 e Figura 17. Para o cálculo da IC₅₀ de radical foram utilizadas as equações referentes a cada curva analítica.

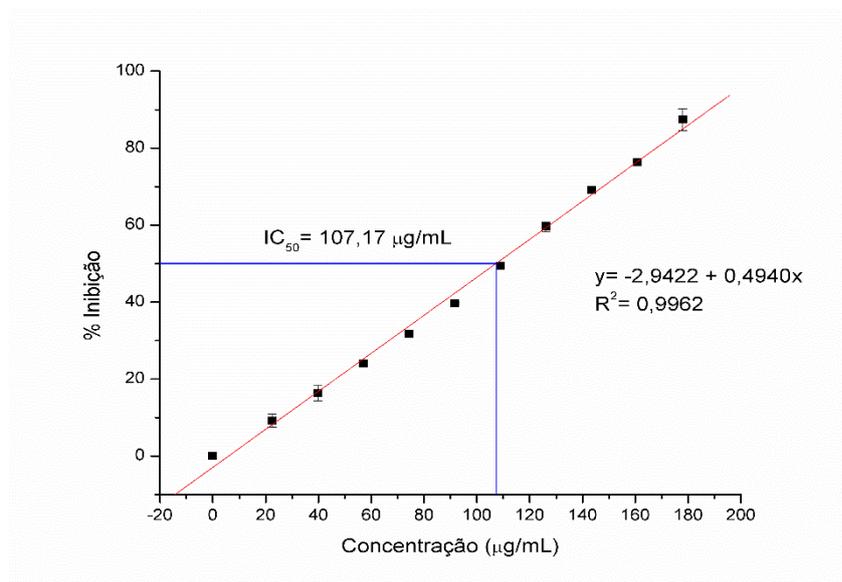


Figura 16. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição do ABTS^{•+}

Fonte: autor

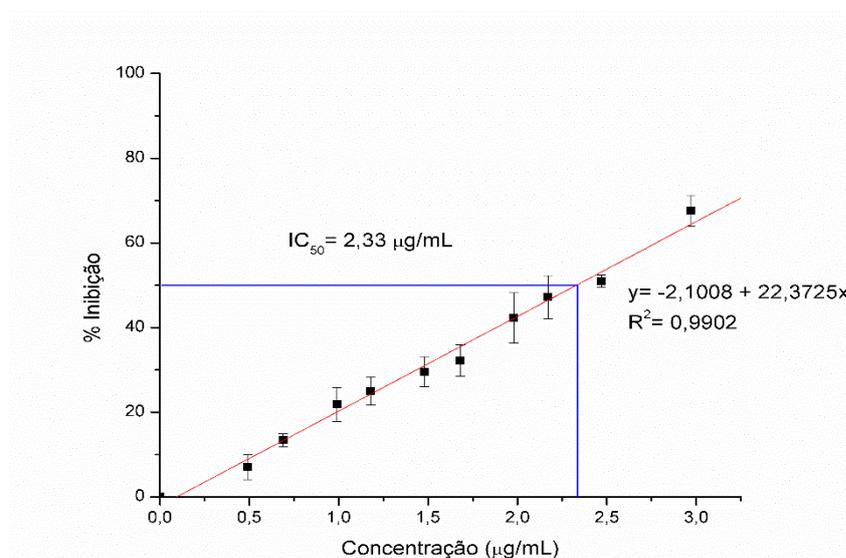


Figura 17. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição do ABTS^{•+}

Fonte: autor

Através dos ensaios realizados para atividade antioxidante empregando os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, foi possível comprovar o potencial antioxidante do AU, em uma faixa de concentração que variou de 22,47 µg/mL a 500 µg/mL. Comparando os resultados obtidos entre AU e AA, foi possível observar que para inibir 50% do radical DPPH[•] foi necessária uma concentração de 235,61 µg/mL de AU e 6,01 µg/mL de AA; para inibir 50% do radical ABTS^{•+} foi necessária uma concentração de 107,17 µg/mL de AU e 2,33 µg/mL de AA, ou seja, o AA foi capaz de inibir a mesma porcentagem de DPPH[•] e ABTS^{•+} em concentrações mais baixas que o AU, o que representa uma potência de aproximadamente 40 vezes mais, tanto para o ensaio com DPPH[•], quanto para o ensaio com ABTS. Além disso, também foi possível observar que os resultados obtidos para o ensaio com DPPH[•] foram proporcionalmente maiores do que os resultados obtidos com o ensaio com ABTS^{•+} tanto para o AU, como para o AA (em aproximadamente 2,5 vezes), devido às diferenças estruturais entre as moléculas dos radicais, demonstrando assim coerência entre os resultados obtidos.

5.2.2. Avaliação da atividade despigmentante

O processo de síntese e deposição de melanina no corpo humano apresenta várias etapas, em algumas das quais se utiliza a enzima tirosinase como catalisador. Uma delas é a reação de oxidação da L-dopa a dopaquinona que gera pigmentos de cor castanho. O método utilizado apresenta como princípio avaliar a capacidade de um composto em inibir a tirosinase na reação de oxidação da L-dopa catalisada pela enzima, fazendo com que o meio reacional deixe de apresentar a cor castanho (KHAZAELI et al., 2009).

Na Figura 18 está demonstrada a microplaca reacional do ensaio com tirosinase e L-DOPA frente ao AU. É possível observar que conforme a concentração de AU nos poços aumenta, a cor castanho vai se tornando proporcionalmente menos intensa, até se tornar incolor, evidenciando dessa forma, o potencial despigmentante do AU na inibição da enzima tirosinase, em uma ampla faixa de concentração que variou de 0,033 a 0,533 mg/mL.

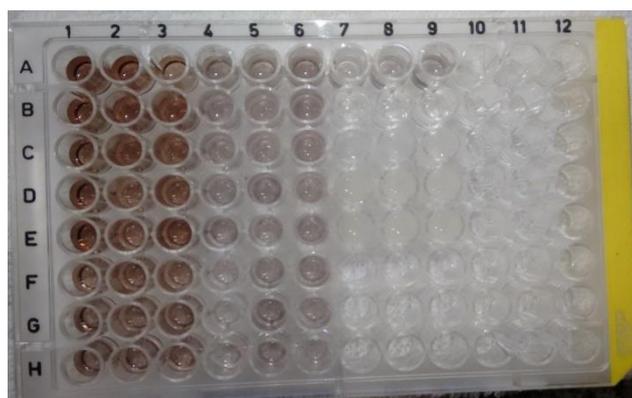


Figura 18. Placa reacional do ensaio com tirosinase e AU

Fonte: autor

As curvas analíticas do AU e do padrão de referência, AA, para análise dos resultados foram construídas a partir da porcentagem de inibição da tirosinase *versus* concentração do AU, e estão demonstradas nas Figura 19 e Figura 20. Para calcular a IC_{50} de AU e de AA para tirosinase foram utilizadas as equações referentes a cada curva analítica. As IC_{50} obtidas para o AU e para o AA demonstraram que a quantidade necessária para inibir 50% da tirosinase é aproximadamente 4,5 vezes maior para o AU em comparação com o AA.

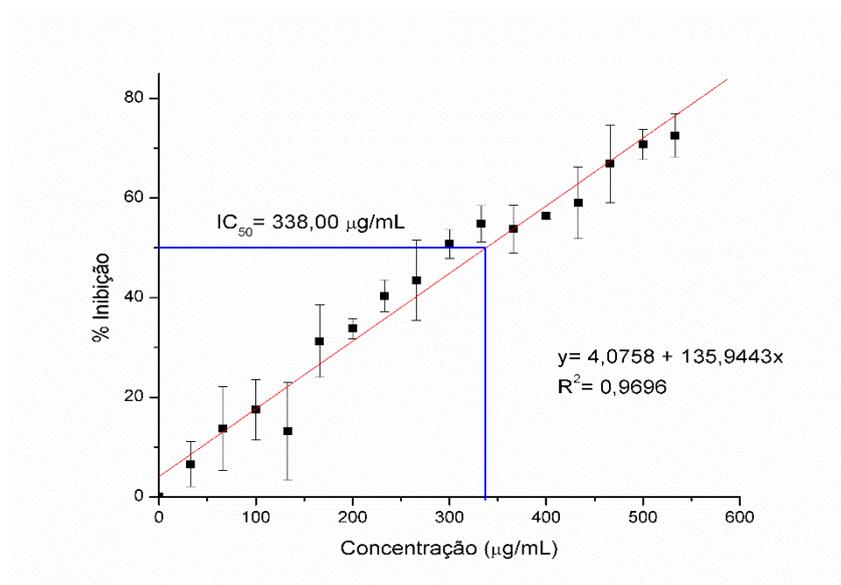


Figura 19. Curva analítica do AU para porcentagem de inibição da tirosinase

Fonte: autor

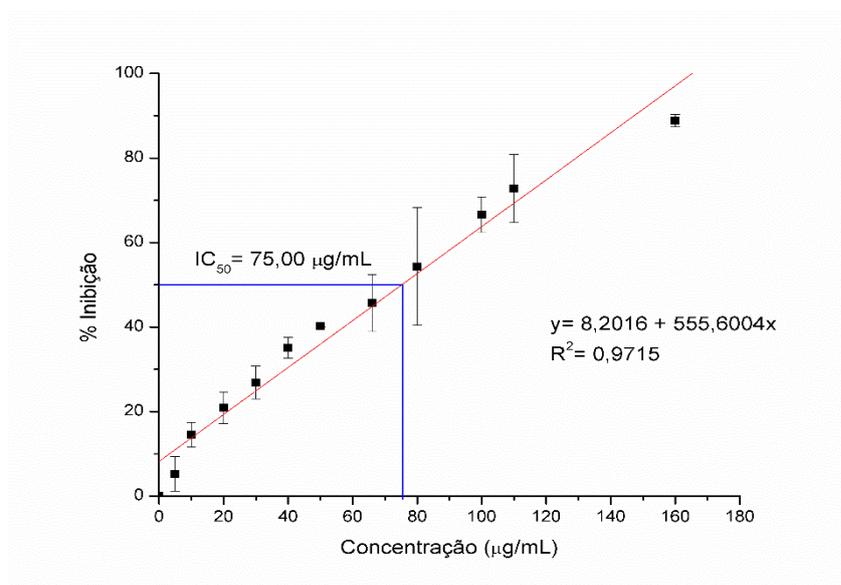


Figura 20. Curva analítica do AA para porcentagem de inibição da tirosinase

Fonte: autor

Apesar da diferença verificada tanto nos ensaios para atividade antioxidante, quanto para o ensaio de atividade despigmentante, o AA apresenta desvantagem quando incorporado em preparações cosméticas, em razão de sua baixa estabilidade, principalmente em emulsões. A grande vantagem do AU com relação ao AA reside no

fato de, além de potencial antioxidante e despigmentante comprovados, serem reportadas outras atividades a ele, tais como atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antineoplásica, entre outras (como exemplificado no Quadro 1), o que o torna um ativo interessante para o desenvolvimento de cosméticos grau 2 multifuncionais. Além disso, o uso do AU em formulações cosméticas é pouco explorado, e em associação com outros ativos antioxidantes poderia proporcionar um aumento da potência antioxidante, resultando em um produto com característica antioxidante maior do que a existente atualmente no mercado.

5.2.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana de compostos pode fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novos produtos capazes de proporcionar maior segurança microbiológica, bem como produtos mais eficazes no combate a determinadas patologias causadas por bactérias. Assim, as cepas utilizadas foram escolhidas com base na legislação vigente para controle microbiológico de produtos cosméticos (BRASIL, 1999).

Para realização do ensaio, diversas concentrações foram previamente testadas, a fim de se encontrar concentrações efetivas na inibição do crescimento microbiano. Assim, depois de definidas as concentrações, todos os poços contendo solução amostra de MPAU de todas as placas foram preparadas igualmente, a partir da diluição da solução estoque de MPAU (400 µg/mL) nos poços. As concentrações finais obtidas a partir da diluição seriada, dos poços E, F, G e H das placas estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio antimicrobiano

Identificação poço	Concentração AU ($\mu\text{g/mL}$)
1	100,00
2	50,00
3	25,00
4	12,50
5	6,25
6	3,13
7	1,56
8	0,78
9	0,39
10	0,19
11	0,10
12	0,05

Fonte: autor

Para revelação das microplacas foi escolhido o revelador resazurina, um indicador de viabilidade celular muito utilizado em estudos de crescimento celular por se tratar de um corante que proporciona revelação dos resultados de forma mais rápida se comparado com outros reveladores que possuem a mesma finalidade, ser mais sensível a microrganismos pouco redutores e pela facilidade na sua utilização. A resazurina é um corante óxido- redutor de coloração azul que atua como aceptora de elétrons na cadeia respiratória da mitocôndria de células viáveis, tornando-se rosa com certa fluorescência ao ser reduzida a resorufina devido à presença das desidrogenases (mitocondriais) que geram um ambiente redutor, indicando assim a viabilidade celular (BUENO et al., 2002; RIBEIRO et al., 2004).

Para uma análise mais completa, os resultados foram analisados através de um *screening* das CIM e CBM do AU, ou seja, as concentrações mínimas necessárias para inibição de crescimento e para morte celular, respectivamente. Os resultados obtidos no ensaio com as microplacas de 96 poços (CIM), juntamente com os resultados observados nas placas de Petri (CBM) estão demonstrados nas Figura 21 a Figura 24.

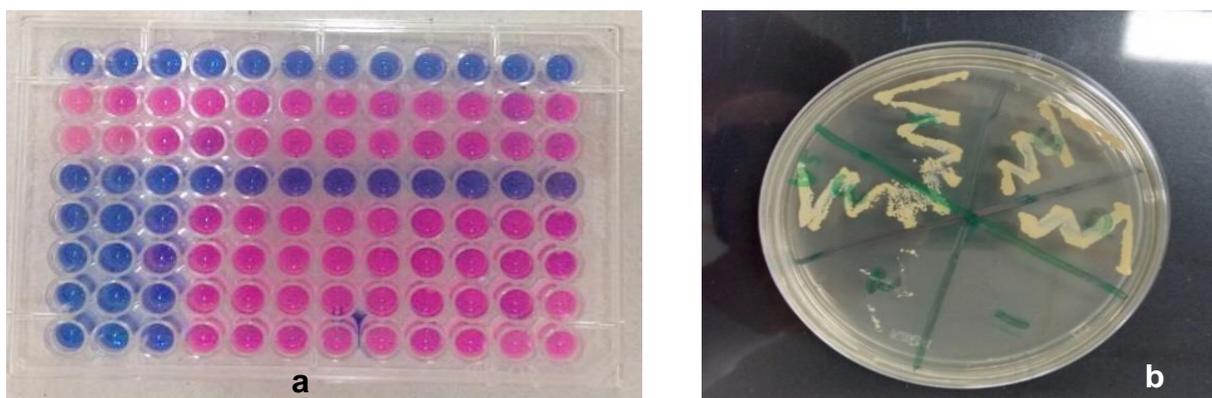


Figura 21. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa *S. aureus*.

Fonte: autor

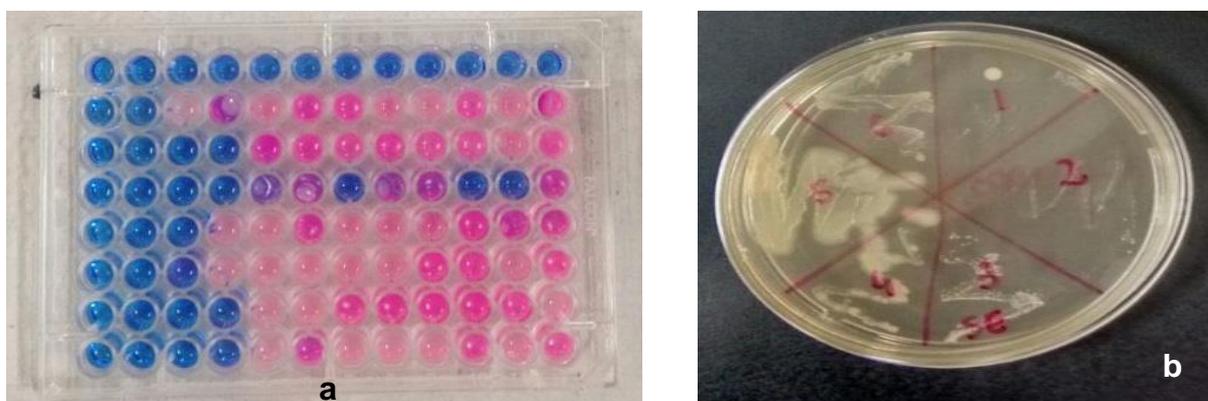


Figura 22. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa *S. epidermidis*.

Fonte: autor

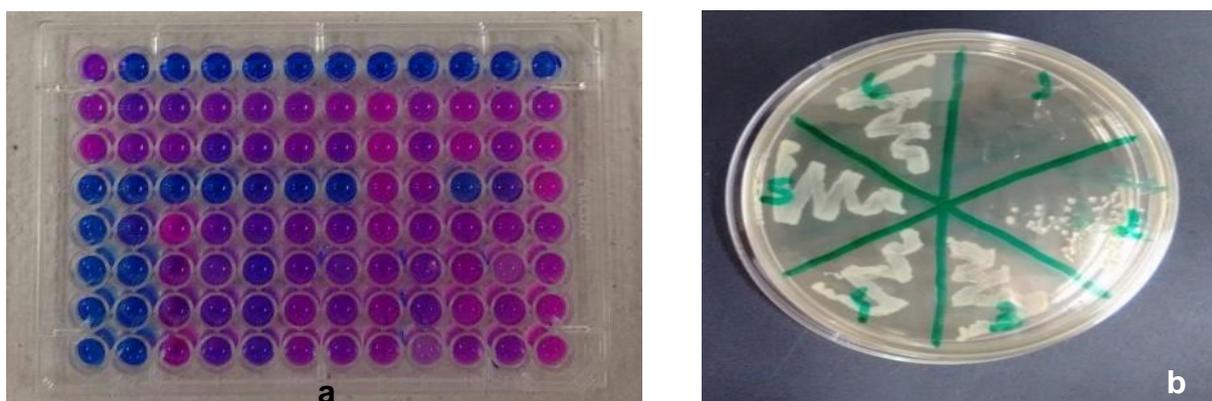


Figura 23. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente à cepa *E. coli*.

Fonte: autor

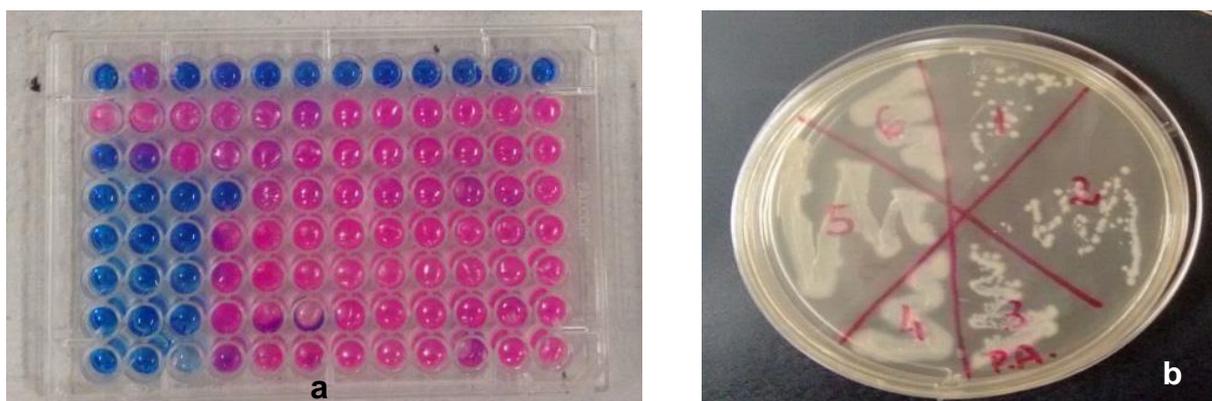


Figura 24. Ensaio de CIM em microplaca (a) e CBM em placa de Petri (b) do AU frente a cepa *P. aeruginosa*.

Fonte: autor

Para a cepa *S. aureus* a inibição do crescimento microbiano em microplaca pôde ser observada até o terceiro poço, indicando para o AU uma CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21a); já para placa de Petri, o crescimento bacteriano pôde ser observado a partir do terceiro quadrante, indicando uma CBM de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 21b).

No caso de *S. epidermidis* a inibição do crescimento em microplaca ocorreu até o terceiro poço, indicando para o AU uma CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22a); para placa de Petri o crescimento bacteriano ocorreu a partir do terceiro quadrante, demonstrando uma CBM de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22b). Porém nessa placa houve inibição de dois poços da linha B (controle de crescimento bacteriano), podendo indicar uma possível contaminação cruzada; também houve inibição de crescimento de quatro poços da linha C (controle de solvente), podendo o resultado final dos poços contendo amostra ter sido influenciado por este fator.

Para a cepa de *E. coli* a inibição do crescimento microbiano em microplaca ocorreu até o segundo poço, indicando para o AU uma CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 23a); para ensaio em placa de Petri o crescimento bacteriano foi observado a partir do terceiro quadrante (Figura 23b), indicando assim uma CBM de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Na microplaca da cepa *P. aeruginosa* a inibição do crescimento microbiano foi observada até o terceiro poço, indicando para o AU uma CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 24a); para placa de Petri o crescimento bacteriano foi observado em todos os quadrantes (Figura 24b), não sendo possível obter, dessa forma, um valor de CBM para o AU nesse experimento. Nas microplacas desta cepa também ocorreu a inibição

de dois poços do controle de solvente, podendo ter influenciado no resultado final dos poços teste.

A investigação da atividade antimicrobiana do AU revelou que este ativo apresenta forte potencial tanto para diminuição de crescimento bacteriano, como para morte celular bacteriana, para todas as cepas testadas. Aligiannis et al. (2001) em seu estudo com base em CIM de compostos vegetais propuseram uma classificação de força inibitória, em que CIM até 500 µg/mL são consideradas fortes; entre 600 e 1500 µg/mL são consideradas moderadas; e acima de 1500 µg/mL fracas. Além disso, os estudos realizados por Duarte et al. (2014), Almeida et al. (2014), Santos et al. (2012) e Rotava et al. (2009), em que foi investigada a atividade antimicrobiana de diversos compostos naturais através de ensaios de CIM e CBM, revelou que em todos eles a concentração requerida para inibição das cepas utilizadas (na maioria destes estudos as cepas utilizadas foram as mesas deste trabalho) é bem maior do que as obtidas com o AU, revelando assim a vantagem do forte potencial antimicrobiano do AU em comparação com outros compostos naturais. Desta forma, essa característica observada sugere, possivelmente, o uso do AU como um conservante cosmético, isoladamente ou em associação com outros antimicrobianos, a partir de ensaios mais aprofundados para atividade antimicrobiana, como por exemplo, o teste desafio, podendo permitir assim, uma possível redução quantitativa ou qualitativa dos conservantes sintéticos tradicionalmente empregados.

5.2.4. Avaliação do potencial citotóxico

A avaliação do potencial citotóxico proposto por Mosmann (1983) é um ensaio colorimétrico que se baseia na redução do corante MTT (de coloração amarela) por células vivas, formando cristais insolúveis de coloração violeta (MOSMANN, 1983).

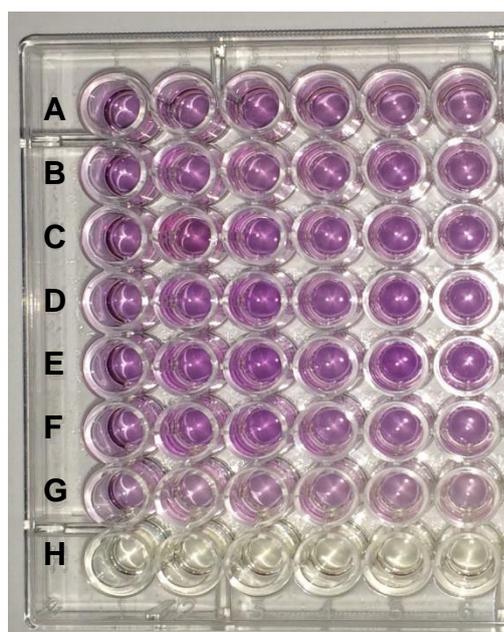
Após diluição seriada da solução estoque de MPAU (100 µg/mL) em meio de cultura, foram obtidas as concentrações de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Concentração de AU nos poços reacionais do ensaio com MTT

Identificação poço	Concentração AU ($\mu\text{g/mL}$)
B ₁₋₃	50,00
C ₁₋₃	25,00
D ₁₋₃	12,50
E ₁₋₃	6,25
F ₁₋₃	3,12
G ₁₋₃	1,56

Fonte: autor

O resultado colorimétrico obtido para o ensaio com o corante MTT pode ser observado na Figura 25.

**Figura 25.** Placa reacional do ensaio de citotoxicidade com MTT

Fonte: autor

Através dos cálculos realizados e da visualização colorimétrica da placa reacional, representada pela Figura 25, não foi observada morte celular significativa para as concentrações testadas. Como a concentração máxima testada (50 $\mu\text{g/mL}$) não promoveu morte celular, não foi possível a construção de uma curva analítica para cálculo da concentração necessária para manter 50% de viabilidade celular (IC_{50}).

Uma proposta seria aumentar a concentração de AU para observar até qual concentração ele seria considerado não citotóxico, no entanto, a concentração de 50 µg/mL foi a máxima permitida para solubilização do AU, já que em concentrações mais elevadas ocorre precipitação do ativo na presença de água. Dessa forma, o resultado foi avaliado qualitativamente e segundo a porcentagem de viabilidade celular observada na máxima concentração utilizada.

Apesar do ensaio não ter abrangido os valores de IC₅₀ obtidos no estudo de eficácia do AU (235,61 µg/mL para DPPH[•]; 107,17 µg/mL para ABTS^{•+}; 338,00 µg/MI para tirosinase), foi observado que a máxima concentração testada faz parte da faixa de concentração efetiva do AU para os ensaios de atividade antioxidante e despigmentante, além de abranger todas as concentrações antimicrobianas efetivas obtidas (50 e 25 µg/mL). Como a máxima concentração testada não demonstrou toxicidade alguma, é possível que as concentrações de IC₅₀ obtidas na eficácia do AU também não sejam, por não serem tão maiores. Porém, é necessária uma nova investigação a partir de algum mecanismo que melhore a solubilidade do AU em água.

5.3. Preparo das emulsões

Como um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o comportamento de uma formulação emulsionada O/A contendo AU, decidiu-se trabalhar com uma fórmula já estabelecida e estudada, descrita na Tabela 4, e que apresenta como características uma viscosidade suficiente para ser classificada como uma preparação denominada “creme” e sensorial leve ao toque. Tal escolha baseou-se no fato de se tratar de uma emulsão estável, segundo Spagnol (2014) e Spagnol et al. (2017), e uma formulação relativamente simples, com sensorial muito agradável e concentração reduzida de componentes oleosos (intenção de uso facial), como é possível observar no Quadro 5, construída com base na função e composição percentual de cada componente da fórmula. Além disso, é uma formulação que apresenta número reduzido de matérias-primas, o que contribui para a minimização de possíveis interferentes às análises a serem realizadas.

Quadro 5. Análise detalhada da emulsão utilizada

INCI NAME	Função	Composição (%)
Cetearyl Alcohol	Agente de consistência	4,0
Ceteareth- 20	Tensoativo não- iônico	2,0
Ethylhexyl Stearate	Emoliente	1,5
Glyceryl Stearate	Agente de consistência	1,0
Propylene Glycol	Umectante e solubilizante	3,0
Dissodium EDTA	Sequestrante/ antioxidante	0,05
Methylparaben	Conservante antimicrobiano	0,18
Propylparaben	Conservante antimicrobiano	0,02
Sodium Polyacrylate	Espessante hidrofílico	1,5
Aqua q.s.p.	Veículo	100

Fonte: autor

Para a composição da fase graxa da emulsão empregou-se álcool cetosteárilico, um componente graxo não tóxico, muito utilizado em preparações cosméticas e farmacêuticas emulsionadas de uso tópico, como agente de consistência; o álcool cetosteárilico etoxilado 20 OE, um tensoativo não iônico, amplamente empregado em sistemas emulsionados; o estearato de octila, um éster de ácido graxo (ácido esteárico) com álcool graxo (álcool octílico) utilizado em emulsões como um emoliente capaz de proporcionar alta espalhabilidade e sensação não oleosa; e o monoestearato de glicerila, agente de consistência, considerado atóxico e não irritante, e que auxilia na estabilidade da emulsão (JUNGINGER, 1997; ROWE et al., 2009; CORRÊA, 2012; SPAGNOL, 2014).

Já a fase aquosa foi preparada com propilenoglicol, um agente umectante e solubilizante e que no caso, foi utilizado para solubilizar os parabenos; poliacrilato de sódio (Rapithix™ A-100), um polímero espessante hidrofílico, utilizado para garantir a viscosidade sem a necessidade de incrementar a fórmula com materiais graxos que possam comprometer o sensorial necessário para uso facial. Além disso, a presença deste material contribuiu para a estabilização do sistema proposto; metilparabeno e propilparabeno como conservantes antimicrobianos; e EDTA dissódico, um sequestrante de metais e também antimicrobiano quando empregado em

concentrações iguais ou superiores a 0,1% (ROWE et al., 2009; SANFELICE et al., 2010; CORRÊA, 2012; SPAGNOL, 2014).

A concentração proposta para o preparo da emulsão contendo AU foi de 1,5 % de AU, baseando-se nos estudos de eficácia realizados e em concentrações de ativos normalmente propostas em formulações cosméticas (ANCHISI et al., 2001; SPAGNOL et al., 2017; SINGH et al., 2018).

A emulsão base (EM-BS) e a emulsão contendo AU (EM-AU), bem como suas características físico-químicas podem ser observadas nas Figura 26 e Figura 27 e Quadro 6, respectivamente.



Figura 26. Emulsões preparadas sem AU (EM-BS) e com AU (EM-AU)
Fonte: autor

Quadro 6. Características físico-químicas das emulsões obtidas

Características a 25 °C	EM-BS	EM-AU
Aspecto	Emulsão viscosa, homogênea, opaca, leitosa	Emulsão viscosa, homogênea, opaca, leitosa
Cor	Branco leitoso	Levemente palha
Odor	Inodora	Inodora
Viscosidade (mPa ou Cp)	7800	5700
pH (solução a 10%)	6,9	6,6

Fonte: autor

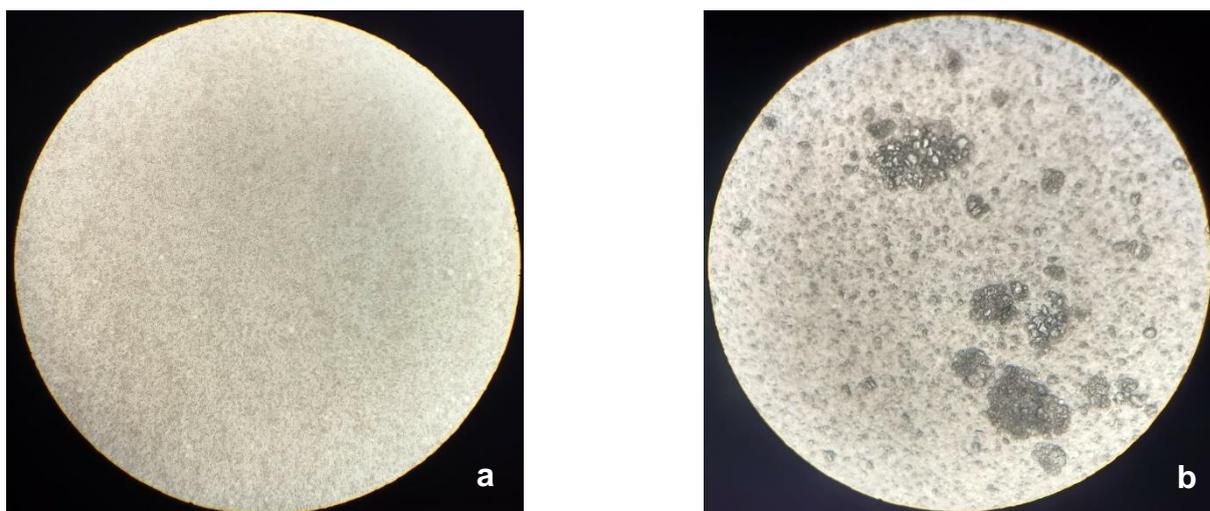
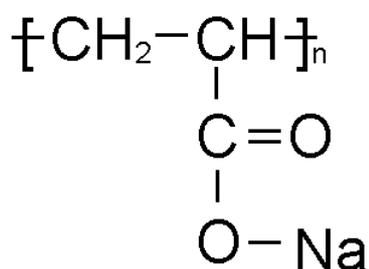


Figura 27. Características microscópicas de EM-BS (a) e EM-AU (b).

Através dos resultados apresentados, é possível observar uma leve mudança de coloração da emulsão preparada com AU e uma solubilização incompleta do ativo na formulação, uma vez que a presença de água causa precipitação do mesmo. Além disso, tal preparação apresentou menor viscosidade se comparada com EM-BS, porém não perceptível a olho nu, o que pode ser justificado por uma possível interação do AU com o agente espessante Sodium Polyacrylate. O AU, por ser uma substância com caráter ácido pode interagir com o grupamento carboxilato de sódio presente no espessante hidrofílico (estrutura representada pela Figura 28), mesmo considerando sua baixa solubilidade em água que não garante sua completa dissociação ácida.



Poliacrilato de sódio

Figura 28. Estrutura química do Poliacrilato de Sódio.

Com relação ao pH, foi observado um leve decréscimo comparado com a EM-BS, o que pode ser explicado pela pouca solubilidade do AU na emulsão e ao fato de ter característica levemente ácida por se tratar de um ácido orgânico.

5.4. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para quantificação de AU em emulsão

5.4.1. Desenvolvimento de metodologia analítica por CLAE

A fim de definir o comprimento de onda mais adequado a ser utilizado para quantificação do AU por CLAE, foi realizada uma varredura em espectrofotômetro na região do UV com uma amostra de MPAU, como pode ser observado na Figura 29. O espectro demonstrou 3 comprimentos de onda com absorção máxima, porém em literatura só havia registros do comprimento de onda a 210 nm (a concentração utilizada foi definida utilizando o comprimento de onda de 329 nm a fim de abranger toda a faixa de absorvidade da molécula, com base na lei de Lambert-Beer, em que a absorção é proporcional à concentração do analito e dessa forma, necessita estar em uma faixa que vai de 0,2 a 1, para identificar e quantificar o analito com segurança). Para confirmação do resultado obtido com a amostra de MPAU, foi realizada uma varredura com PDAU (na mesma concentração utilizada), como pode ser observado na Figura 30. O espectro resultante demonstrou apenas um comprimento de onda máximo, em uma faixa de absorção de aproximadamente 220 nm. Dessa forma, ficou definido o comprimento de onda de 210 nm, observado em literatura, uma vez que o comprimento obtido a 329 nm poderia ser de alguma impureza. Como o solvente orgânico utilizado (etanol) apresenta absorvidade máxima em região UV a 205 nm, não iria interferir em uma análise por CLAE.

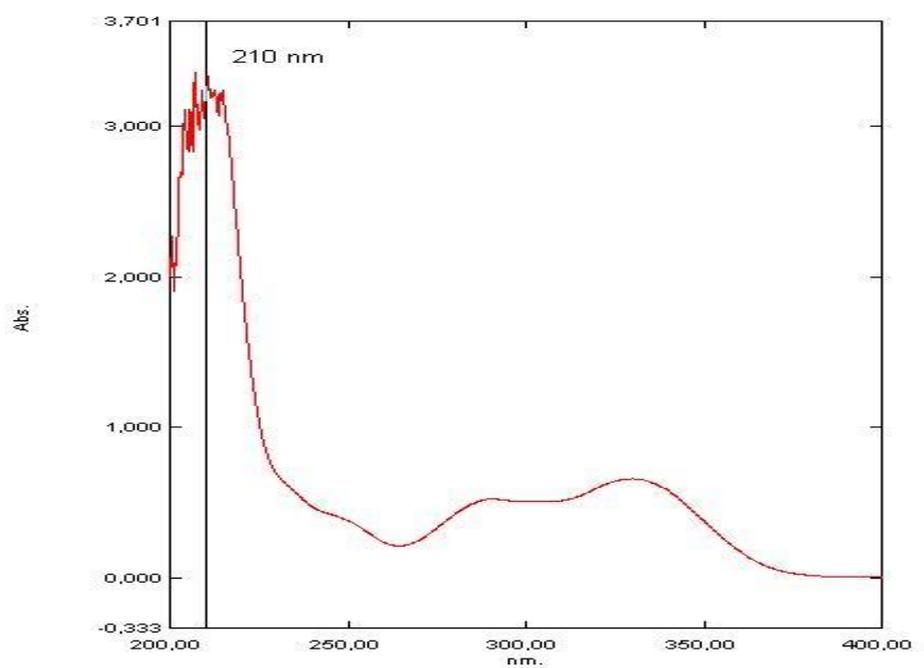


Figura 29. Espectro UV de MPAU.

Fonte: autor

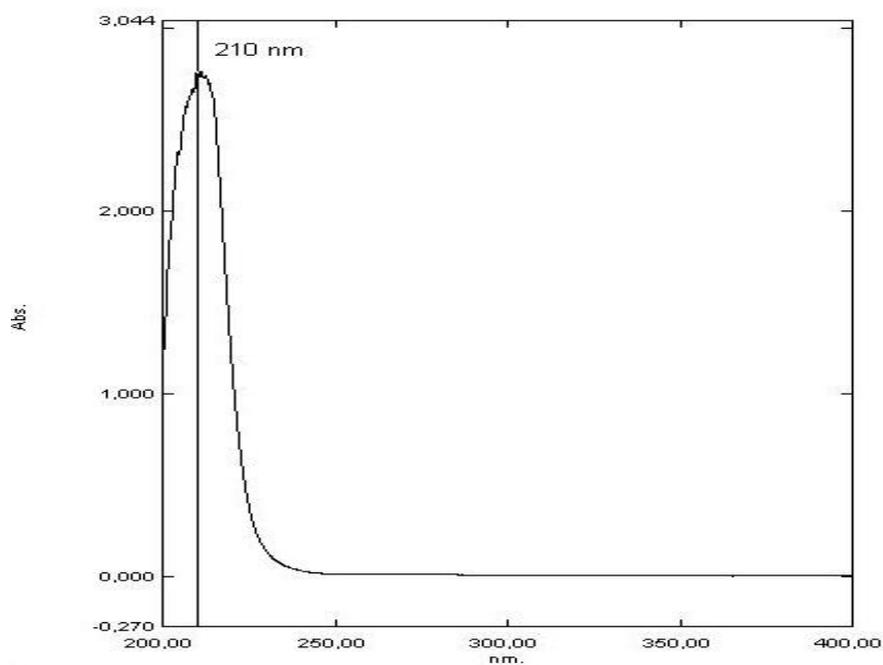


Figura 30. Espectro UV de PDAU.

Fonte: autor

Após definição do comprimento de onda, as proporções foram sendo testadas, até a obtenção de um cromatograma com melhor resolução, sendo que 85:15 (etanol: água acidificada a 1%) foi a que exibiu melhor perfil. O uso de ácido acético na fase móvel foi devido ao fato de manter o AU em sua fórmula molecular e assim melhorar os resultados e evitar danos à coluna. Posteriormente, para definir a faixa de concentração a ser utilizada para a validação do método, algumas concentrações foram testadas em CLAE, como pode ser observado na Figura 31. A concentração de 200 µg/mL foi a que obteve um cromatograma com melhor resolução, sendo definida então como a menor concentração de trabalho.

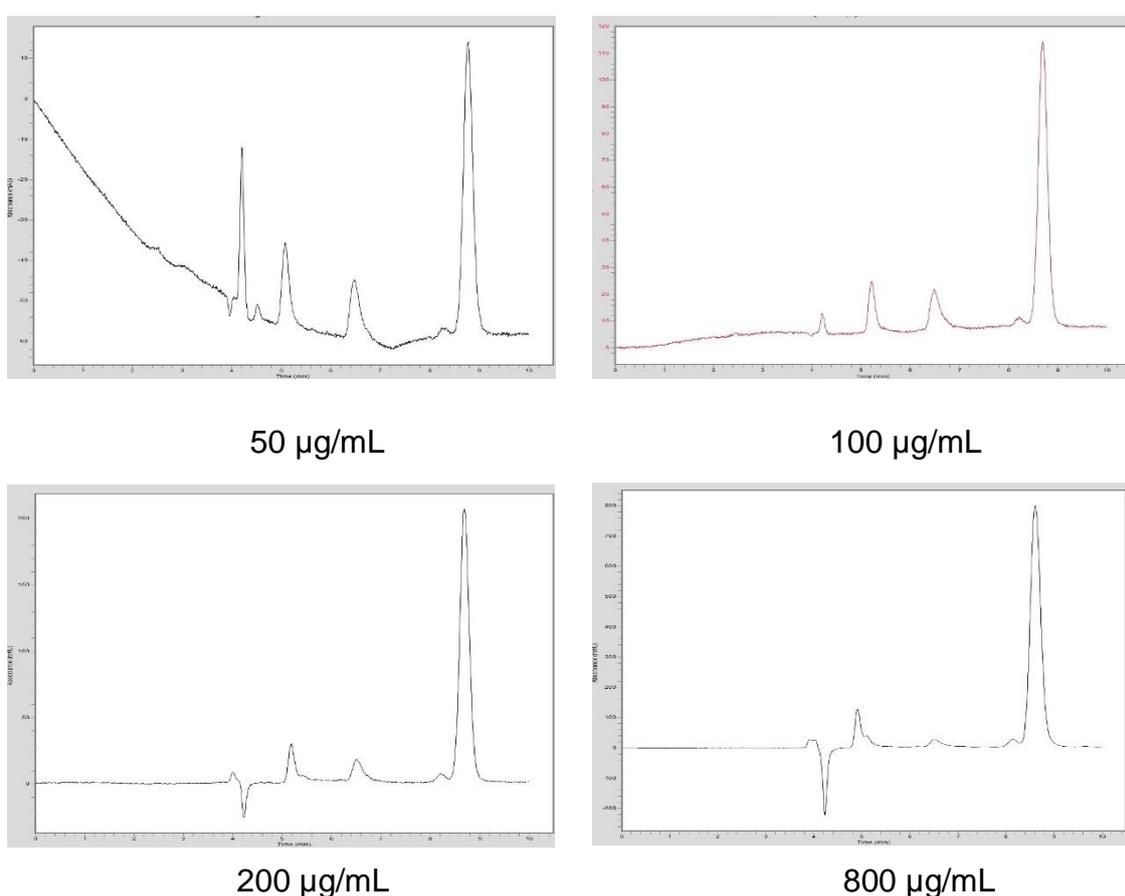


Figura 31. Teste de concentrações

Fonte: autor

A fim de confirmar o cromatograma obtido para MPAU e conferir maior confiabilidade à MP utilizada, foi realizado um estudo por CLAE com PDAU em

comparação com MPAU, demonstrado na Figura 32. É possível observar que os cromatogramas ficaram sobrepostos, conferindo assim confiabilidade à MP utilizada.

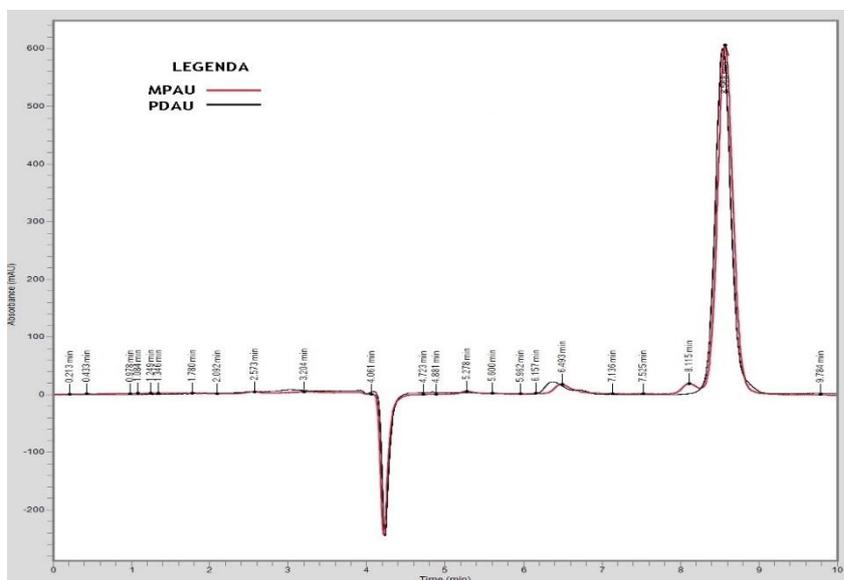


Figura 32. Comparação dos cromatogramas das amostras de PDAU e MPAU

Fonte: autor

Como é possível notar, os cromatogramas estavam apresentando uma inflexão em aproximadamente 4 min. Então a forma de preparo das amostras foi alterada, e elas passaram a ser preparadas com a mesma proporção e constituintes da fase móvel. O cromatograma final de uma amostra a 600 $\mu\text{g/mL}$ está representado na Figura 33. O fluxo foi mantido a 0,6 mL/min uma vez que fluxos maiores causavam aumento de pressão no sistema, podendo afetar a coluna.

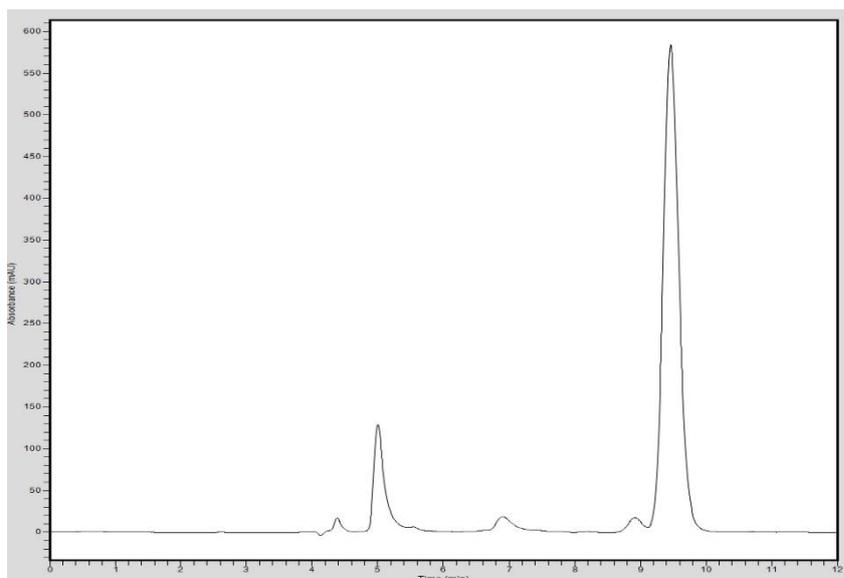


Figura 33. Cromatograma final de MPAU 600 µg/mL

Fonte: autor

As condições cromatográficas que forneceram melhor adequabilidade do sistema foram:

- ✓ Vazão: 0,6 mL/min;
- ✓ Proporção da fase móvel: 85:15 (etanol: água acidificada a 1%);
- ✓ Concentração mínima para boa resolução: 200 µg/mL;
- ✓ Comprimento de onda: 210 nm;
- ✓ Tempo de retenção: 9,5 min
- ✓ Preparo de amostra: com mesmos constituintes e proporção de fase móvel.

Para verificar a conformidade do sistema, foi realizado teste de conformidade do sistema através de diversos parâmetros, e o resultado pode ser observado Tabela 8. Os resultados obtidos estão de acordo com os valores de referência preconizados pelo ICH, uma vez que $K > 2$, $T_F \leq 2$, $A_S \leq 2$ e $N > 2000$.

Tabela 8. Resultados obtidos para conformidade do sistema

	T _R (min)	Área pico	K	T _F	V _v (mL)	A _s	N
Média	9,50	9591414,84	2,62	1	1,56	1	3105,26
DRR (%)	0,54	2,49	0,87	0	0,43	0	1,09

Fonte: autor

Em comparação com as metodologias analisadas na literatura (Quadro 2), a metodologia proposta neste trabalho apresenta a grande vantagem de utilizar os preceitos de química verde, uma vez que faz uso de solventes considerados verdes (etanol, água e ácido acético), com um baixo volume de vazão e tempo reduzido de análise. Sendo assim, gera menos poluentes e confere maior segurança ao analista, além de ser mais barato. Além disso, o menor tempo de retenção comparado com as metodologias disponíveis em literatura, o torna interessante para uso.

5.4.2. Validação da metodologia desenvolvida

5.4.2.1. Linearidade

A linearidade foi obtida por meio de curva analítica de concentração *versus* área do pico, sendo avaliada a partir de 5 pontos compreendidos entre a concentração de 200 µg/mL e 1000 µg/mL como preconizado na legislação vigente, e a representação gráfica pode ser observada na Figura 34. Os dados foram apresentados com desvio padrão e demonstraram-se lineares e homocedásticos, com $r^2 = 0,9996$ e $r = 0,9997$. O valor de significância do coeficiente angular (15092,10) foi de $1,41853E-18$ ($\lll 0,05$).

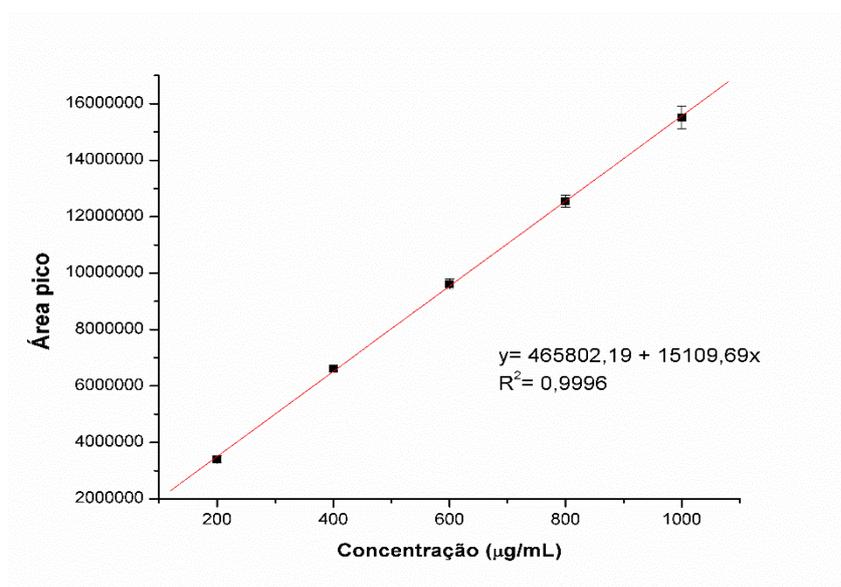


Figura 34. Curva analítica final de linearidade

Fonte: autor

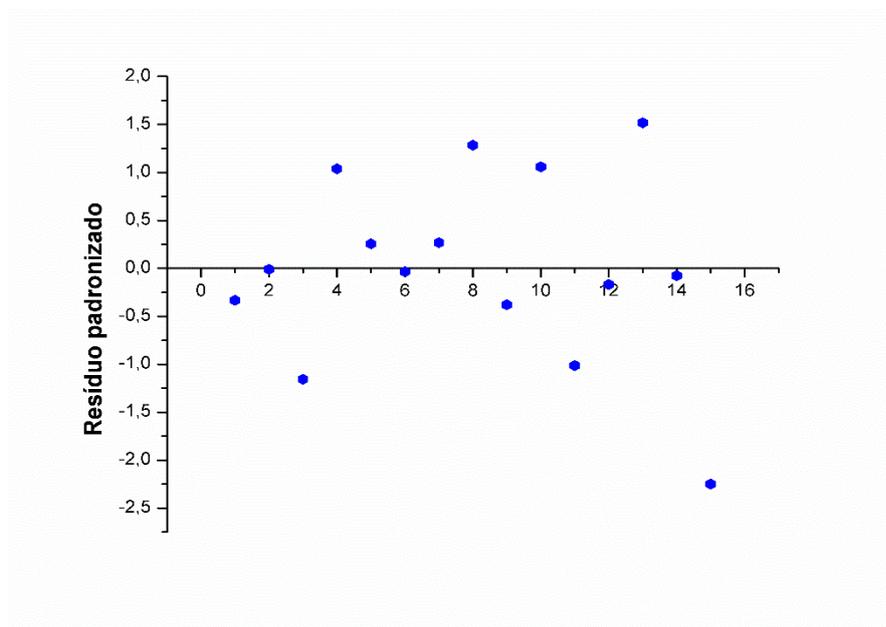
Além disso, os valores obtidos na curva analítica final foram analisados através de estatística ANOVA (Tabela 9) que demonstrou que entre as concentrações houve diferença estatística significativa para o valor de área, uma vez que F calc. (1277,66) foi maior do que o F tab. (3,48). A análise da regressão linear também demonstrou diferença estatística significativa, uma vez que F calc. (5107,94) foi maior do que F tab. (4,96). Já o desvio de linearidade não apresentou diferença estatística significativa, visto que F calc. (0,90) foi menor que F tab. (3,71).

Tabela 9. Análise de variância dos valores obtidos na linearidade

Fontes de variação	Graus de liberdade	Soma de quadrados	Variância	F calculado	F tabelado (0,05)
Entre concentrações	4	273412868540298	68353217135075	1277,66	3,48
Regressão linear	1	273267849991082	273267849991082	5107,94	4,96
Desvio de linearidade	3	145018549217	48339516406	0,90	3,71
Resíduo	10	534986737232	53498673723	-	-
Total	14	273947855277530	-	-	-

Fonte: autor

O gráfico de dispersão dos resíduos (Figura 35) apresentou praticamente 100% dos resíduos dentro do limite vertical analisado (-2 e 2), considerando o limite de confiança de 95%.

**Figura 35.** Gráfico de dispersão de resíduos

Fonte: autor

5.4.2.2. Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base em resultados obtidos na curva analítica do método e segundo cálculos da legislação vigente (RDC 166), e foram:

LD= 21,5 µg/mL

LQ= 65,14 µg/mL

Os valores obtidos apresentaram-se de acordo, uma vez que são menores do que as concentrações presentes na curva analítica.

5.4.2.3. Precisão

Foi obtida através da precisão intermediária (entre analistas) e pela repetibilidade (próprio analista), e os resultados foram avaliados segundo o DPR (%) e, no caso da precisão intermediária, também foi avaliada a proximidade dos resultados através de análise estatística (teste t- variâncias equivalentes). Todos os valores de DPR apresentaram-se dentro da faixa estabelecida de 5% (95 % de confiança).

A precisão intradia (repetibilidade) avaliada por meio de DPR obteve valor de média igual a 8364150,17 e DPR(%)= 2,38.

A precisão entre analistas, além do DPR, também foi avaliada através do teste t para variâncias equivalentes (homocedásticas), a fim de verificar diferenças significativas entres os resultados obtidos entre os analistas. O resultado do teste pode ser observado na Tabela 10.

Tabela 10. Teste t homocedástico para análise da precisão entre analistas

	Analista 1	Analista 2
Média	8364150,173	8161463,433
Variância	39515951739	1,18804E+11
Observações	7	7
GL	12	
Stat-t	1,348	
P(T<=t) bi-caudal	0,203	
t crítico bi-caudal	2,179	

Fonte: autor

O DPR (%) obtido para o analista 1 foi de 2,38 % e para o analista 2 foi de 4,22%.

A análise estatística demonstrou que não houve diferenças estatísticas significantes entre os resultados obtidos pelos dois analistas, uma vez que o t calc. (-1,35) foi menor do que o t tab. (1,78) e o valor de P foi de 0,1 (maior que o nível de significância 0,05).

5.4.2.4. Seletividade

Os cromatogramas obtidos na análise de interferentes de matriz da seletividade para as amostras de SPcb, SPd e SAm foram sobrepostos para comparação e podem ser observados na Figura 36. É possível observar que os componentes da emulsão não interferem significativamente no pico cromatográfico do AU, uma vez que nenhum componente aparece no mesmo tempo de retenção do AU ou próximo a ele.

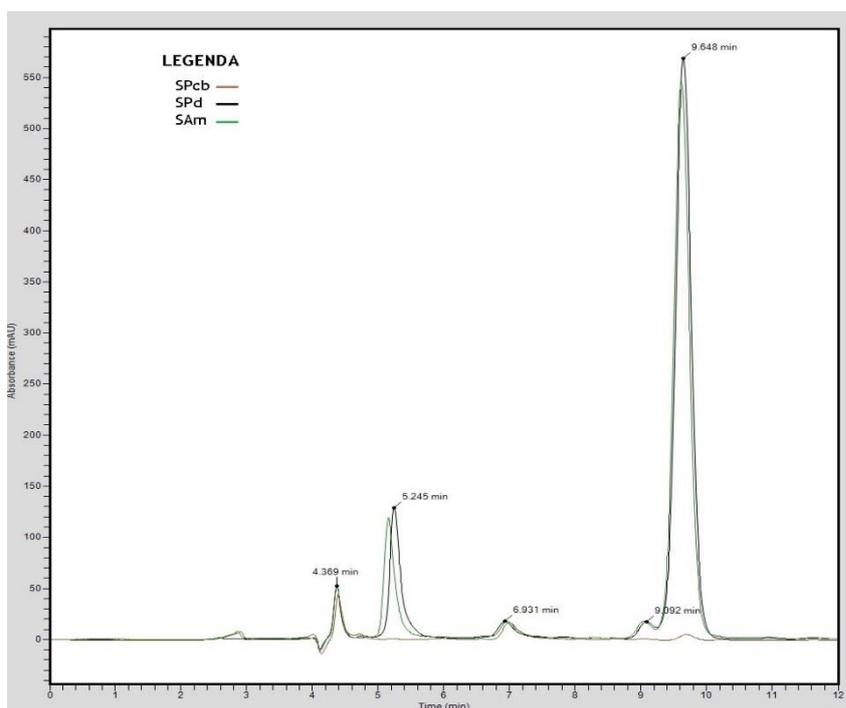


Figura 36. Cromatogramas sobrepostos das SPcb, SPd e SAm

Fonte: autor

Os cromatogramas obtidos no estudo de degradação da seletividade, referentes aos tempos 0, 8, 24 e 48 horas de cada solução estresse podem ser observados nas Figura 37 a Figura 41.

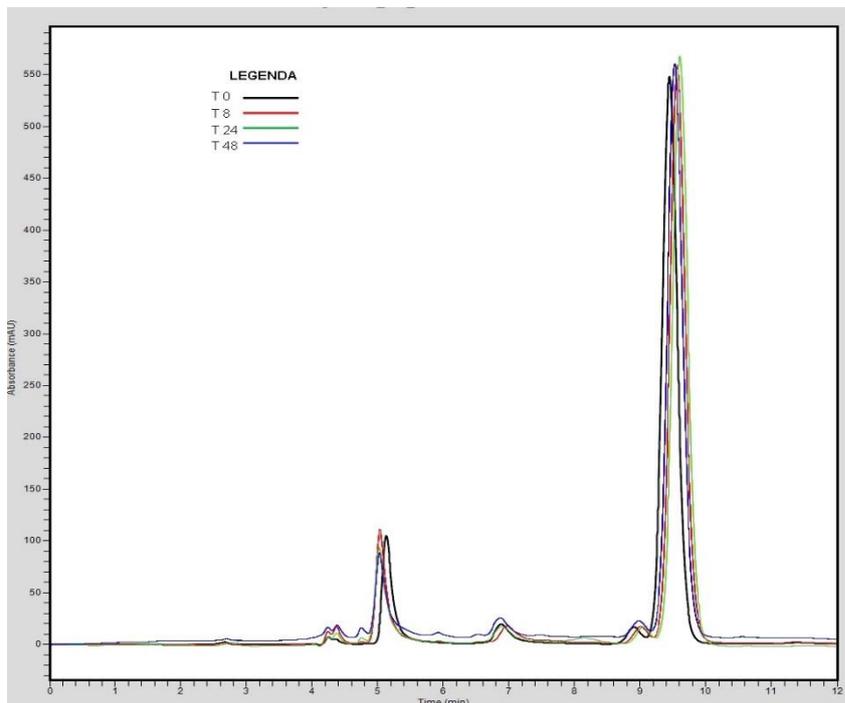


Figura 37. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de HCl

Fonte: autor

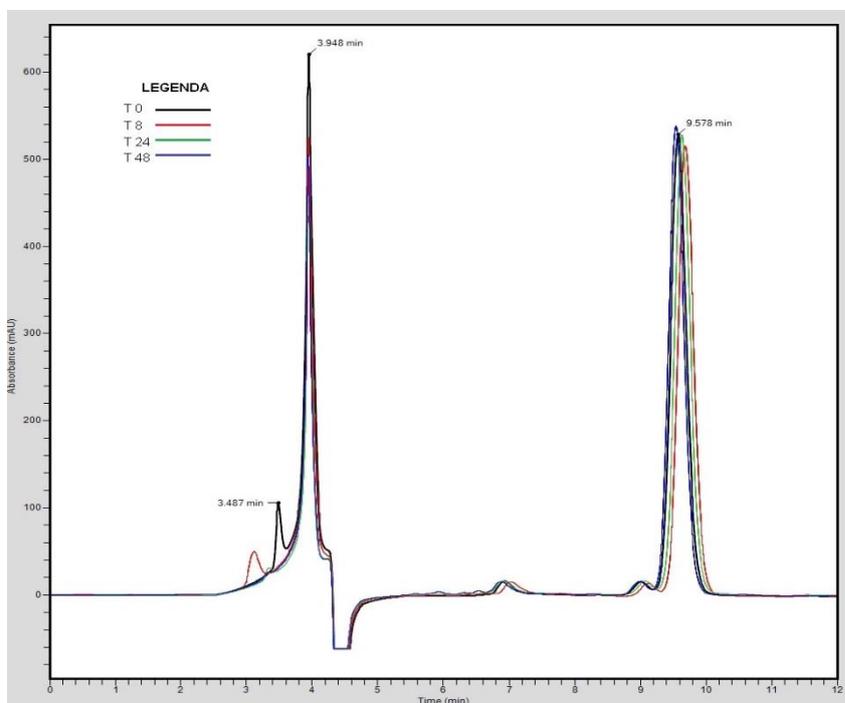


Figura 38. Cromatogramass da solução de MPAU frente à solução de NaOH

Fonte: autor

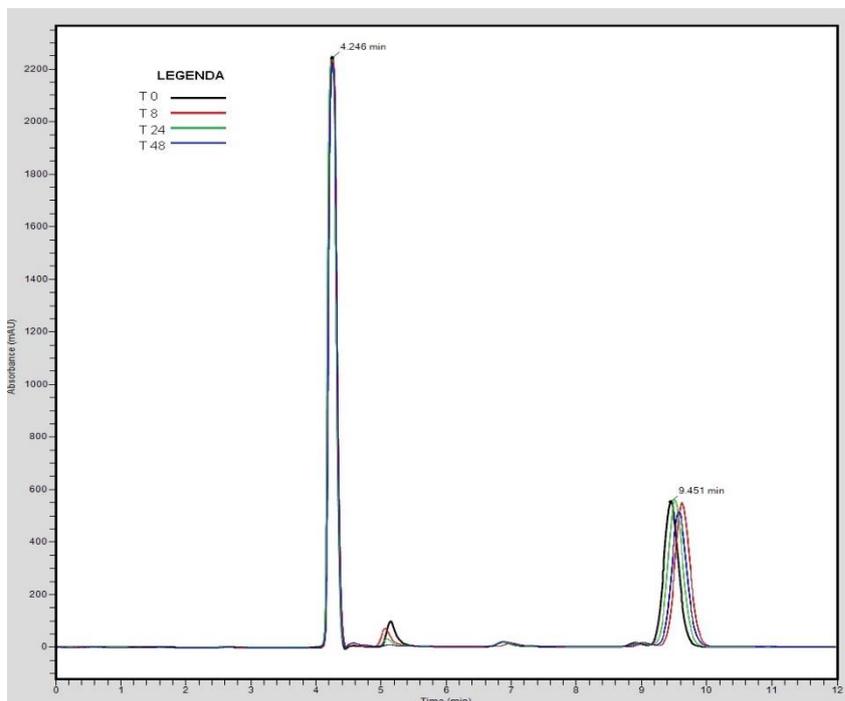


Figura 39. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H₂O₂

Fonte: autor

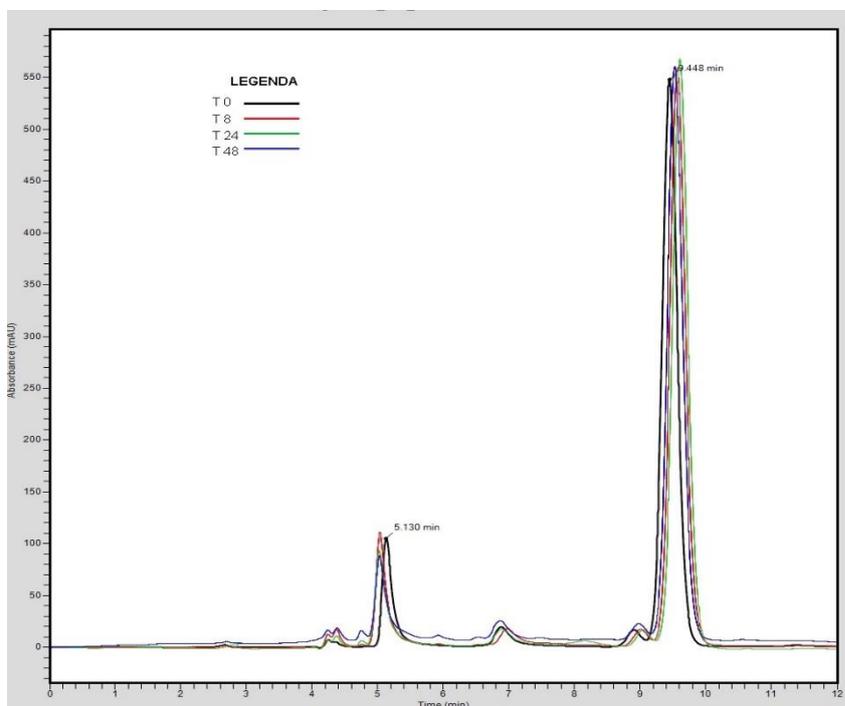


Figura 40. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de H₂O a 80 °C

Fonte: autor

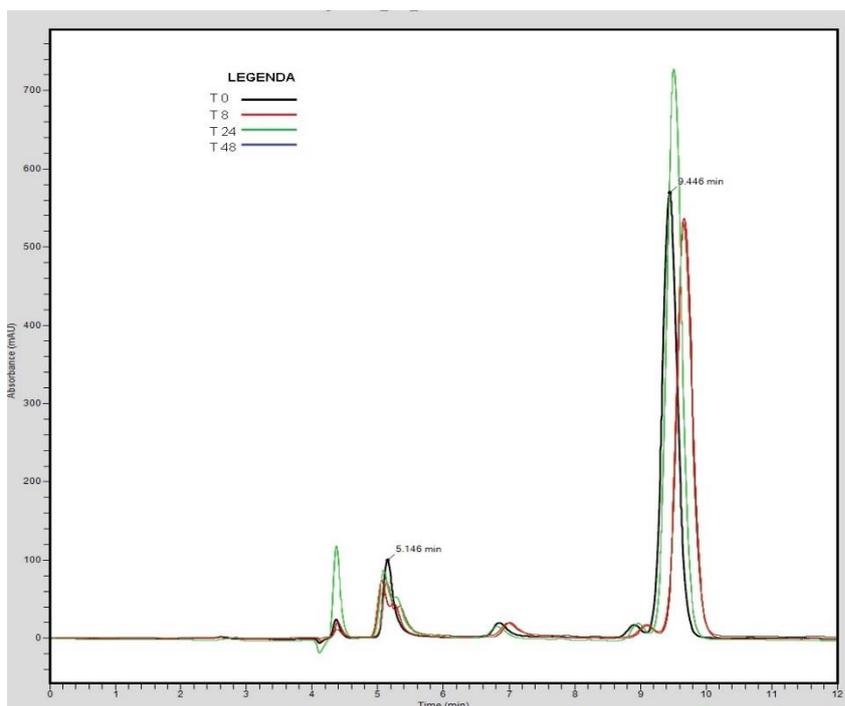


Figura 41. Cromatogramas da solução de MPAU frente à solução de luz UV

Fonte: autor

Obs.: para luz UV não houve sobreposição do cromatograma de 48 horas uma vez que a solução sofreu evaporação.

A avaliação por meio do estudo de degradação forçada demonstrou, através de testes qualitativos, as características dos cromatogramas obtidos pela submissão do AU a condições de ampla faixa de pH, oxidação, calor e luz, como preconizado em legislação vigente (RDC 166 de 2017). Frente a condições de baixo pH (Figura 37) o pico do AU não sofreu interferências e nenhum outro pico diferente pôde ser identificado no cromatograma. Já frente ao NaOH (Figura 38) foi possível observar o aparecimento de outros picos (com aproximadamente 3 min de tempo de retenção) ao longo dos tempos de coleta, porém sem interferência no pico do AU, o que poderia significar uma degradação em outra região da molécula e não na região responsável pela característica cromófora. Na submissão ao peróxido (Figura 39) é possível observar que o pico do AU também não sofreu alterações, porém um pico em aproximadamente 4 min pode ser observado nos cromatogramas de todos os tempos,

o que poderia ser algum componente da solução de peróxido. Através da análise da Figura 40, foi possível perceber que temperaturas altas não geram resíduos capazes de interferir no pico do AU. Já a Figura 41 demonstrou que a submissão do AU à luz UV não promove alterações no cromatograma do AU. O aumento do tamanho do pico deveu-se a um aumento de concentração do AU na amostra, uma vez que a amostra sofreu evaporação durante os tempos analisados.

Assim, o método demonstrou-se seletivo.

5.4.2.5. Exatidão

A recuperação total e o DPR % obtidos no parâmetro “exatidão” foram demonstrados através da Tabela 11.

Tabela 11. Resultado final para exatidão

	Recuperação média (%)	Recuperação total	DPR (%)
R₁	98,36		
R₂	98,99	98,47	0,48
R₃	98,07		

Fonte: autor

O critério de aceitação utilizado tanto para os DPR_s (%), quanto para as porcentagens de recuperação também foi o de 5% (95% de confiança- amplamente utilizados em estudos da área da saúde). Dessa forma, a recuperação média final (98,47%) e o DPR % (0,48) apresentaram-se dentro do limite determinado.

5.4.2.6. Robustez

Os resultados obtidos para as variações escolhidas no parâmetro de robustez, bem como os DPR%, podem ser observados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados obtidos no parâmetro de robustez

Condição alterada	Faixa de trabalho	DPR final (%)	Teor de AU (%)
Fluxo (mL/min)	0,58	2,40	103,21
	0,60		100
	0,62		98,48
Proporção de fase móvel	83:17	1,30	100,29
	85:15		100
	87:13		102,40
Marca de solvente	Panreac®	2,00	100
	J.T.Baker®		97,21
Comprimento de onda	208	12,38	111,85
	210		100
	212		87,17
Marca da coluna	Waters®	0,32	100
	Phenomenex®		100,46

Fonte: autor

A robustez foi avaliada através da proximidade dos resultados obtidos quando o método foi submetido a variações das condições estabelecidas, com os resultados obtidos através das condições estabelecidas do método. Para isso foi utilizado o DPR%, com um limite de 5%. Os resultados demonstrados na Tabela 12 mostram que não houveram variações significativas de área de pico conforme variação nas condições: proporção de fase móvel, vazão, marca de etanol e marca da coluna. Porém para comprimento de onda houve variação significativa. Sendo assim, o método é considerado robusto para pequenas alterações na proporção de fase móvel, vazão, marca de etanol e marca de coluna, no entanto, não é robusto para variações no comprimento de onda.

5.5. Avaliação da estabilidade das emulsões

A estabilidade das emulsões preparadas foi avaliada através da estabilidade preliminar, que visa submeter as formulações a condições extremas às quais

poderiam estar sujeitas, acelerando possíveis reações entre os componentes da fórmula, e causando dessa forma, alterações nas características do produto. Assim, o intuito em se realizar o estudo de estabilidade preliminar foi o de avaliar a estabilidade do AU quando incorporado a uma emulsão, bem como o comportamento da estabilidade da uma emulsão preparada, sem a finalidade de estimar a vida útil do produto, uma vez que há a necessidade de melhoria da solubilidade em água do AU, para que se obtenha uma emulsão mais homogênea e sem precipitação do ativo.

5.5.1. Teste de centrifugação

As emulsões submetidas ao teste de centrifuga podem ser observadas na Figura 42. Foi possível observar que as amostras submetidas à centrifugação não sofreram separação de fase e nem qualquer outro tipo de alteração, mantendo-se, dessa forma, estáveis ao teste da centrifugação.

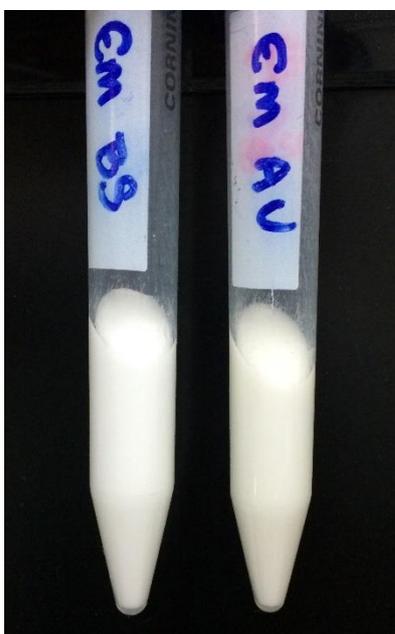


Figura 42. Emulsões submetidas à centrifugação a 3000 rpm.

Fonte: autor

5.5.2. Aspecto, cor e odor

A partir da Figura 43 a Figura 46, é possível visualizar as diferenças de aspecto e cor das emulsões, obtidas no estudo de estabilidade preliminar, para cada condição estudada, de T3 e T15. Na Figura 47 é possível observar as diferenças de aspecto e cor das emulsões submetidas ao ciclo de congelamento/descongelamento em T12.

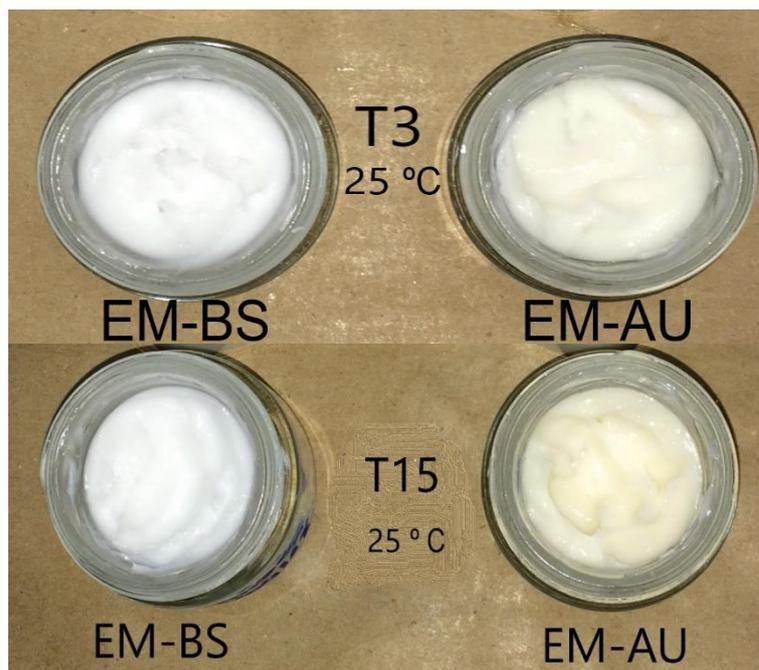


Figura 43. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 25 °C

Fonte: autor

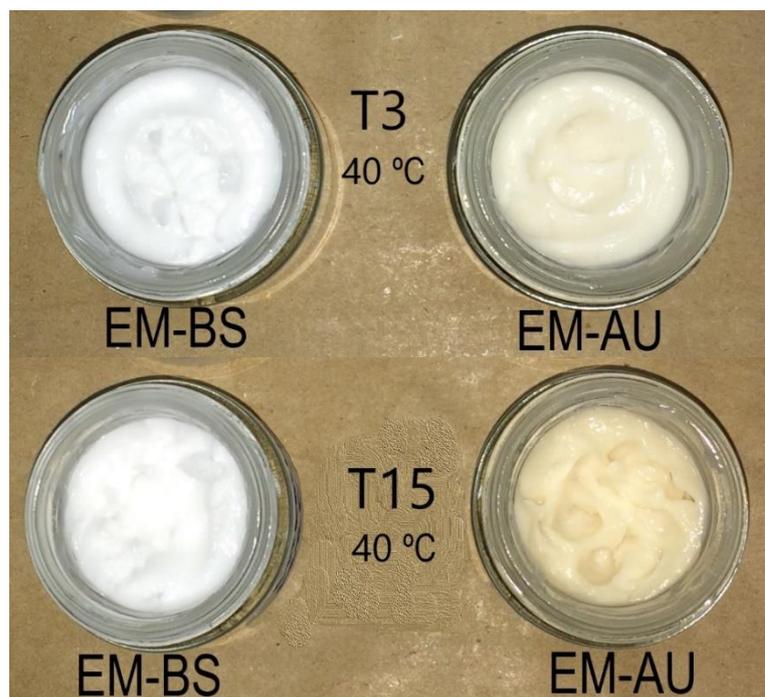


Figura 44. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 a 40 °C

Fonte: autor

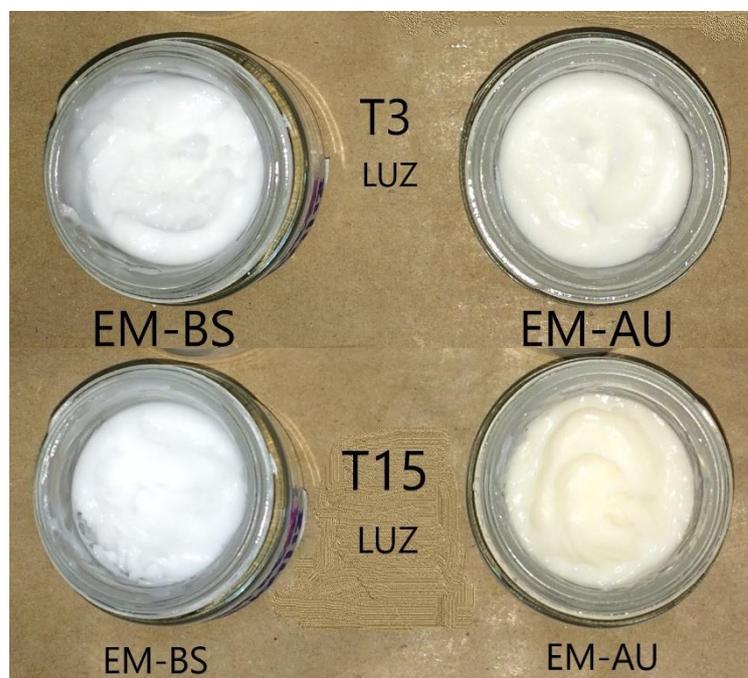


Figura 45. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em luz indireta

Fonte: autor

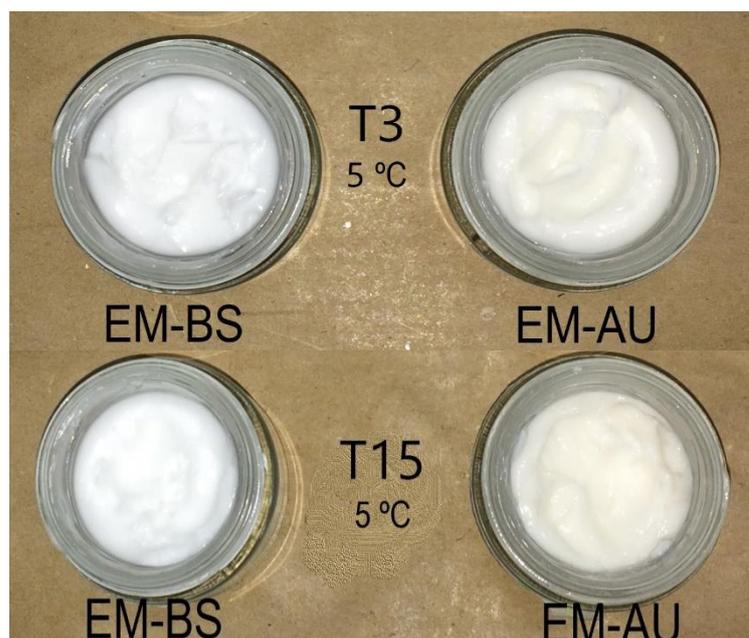


Figura 46. Comparativo de aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T3 e T15 em 5 °C

Fonte: autor



Figura 47. Aspecto e cor de EM-BS e EM-AU em T12 no ciclo de congelamento/descongelamento

Fonte: autor

É possível observar que, em relação à amostra inicial das emulsões, em T1, representadas pela Figura 26, as amostras de EM-BS permaneceram com as mesmas características de aspecto e cor. Já as amostras de EM-AU apresentaram algumas alterações em relação à amostra inicial. A amostra a 25 °C e a submetida à luz indireta sofreram uma pequena alteração de cor ao final dos 15 dias de estabilidade, demonstrando-se com intensidade palha um pouco mais forte do que em T1. Já a amostra a 40 °C apresentou um leve aumento de intensidade da cor palha em T3, e que intensificou-se mais em T15. A amostra a 5 °C e a submetida ao ciclo de

congelamento/ descongelamento apresentaram-se com a coloração um pouco menos intensa do que em T1. As amostras que apresentaram-se com a cor mais intensa provavelmente foi devido a uma oxidação do AU, causada pela temperatura ao longo do tempo. No entanto, as temperaturas mais baixas foram capazes de manter a coloração das amostras inalteradas, possivelmente por prevenirem reações de oxidação dos componentes. Nenhuma amostra apresentou variação de odor.

5.5.3. Determinação de pH

As variações de pH obtidas no estudo de estabilidade preliminar para a EM-BS ($6,65 \pm 0,04$) e para EM-AU ($6,62 \pm 0,03$) podem ser observadas nas Figura 48 e Figura 49, respectivamente.

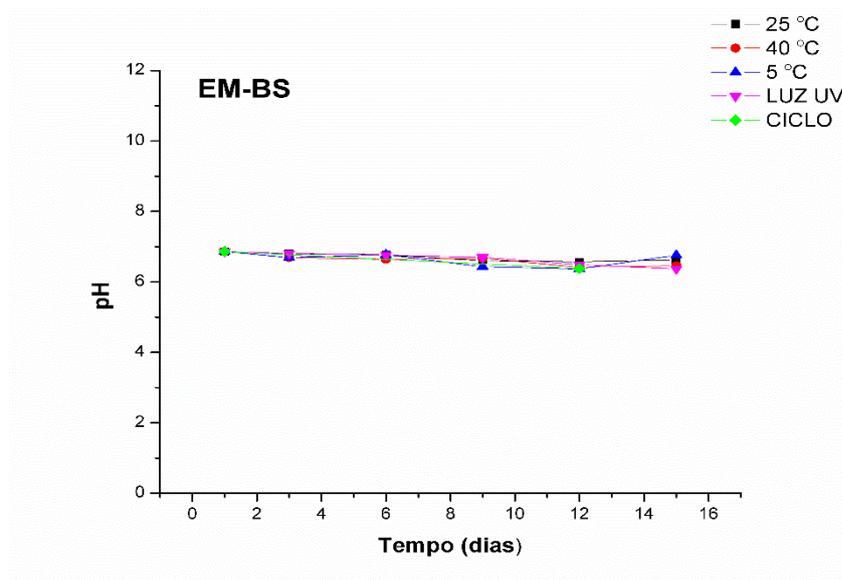


Figura 48. Valores de pH da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar

Fonte: autor

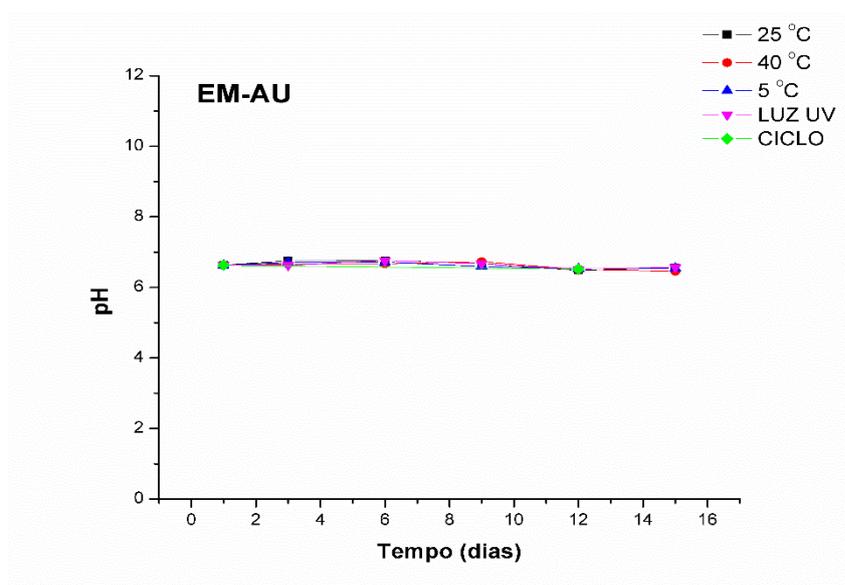


Figura 49. Valores de pH da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar

Fonte: autor

A partir dos gráficos, e pelos valores de média de pH e desvio padrão calculados, é possível observar que não houveram variações significativas de pH, tanto para EM- BS, como para EM-AU, conferindo dessa forma, estabilidade às emulsões analisadas, com relação ao pH.

5.5.4. Determinação da viscosidade

As variações de viscosidade obtidas no estudo de estabilidade preliminar para a EM-BS (83834 ± 2808) e para EM-AU (63243 ± 3144) podem ser observadas nas Figura 50 e Figura 51, respectivamente.

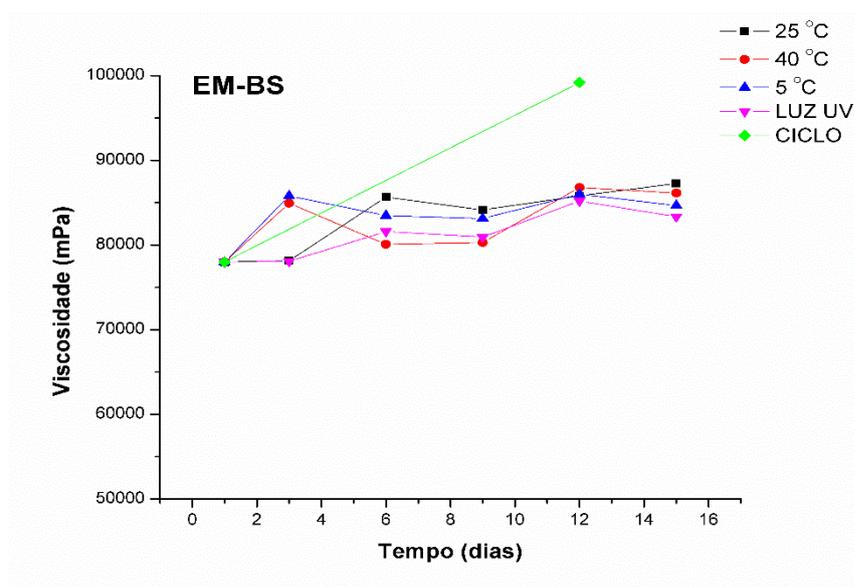


Figura 50. Valores de viscosidade da EM-BS obtidos na estabilidade preliminar
 Fonte: autor

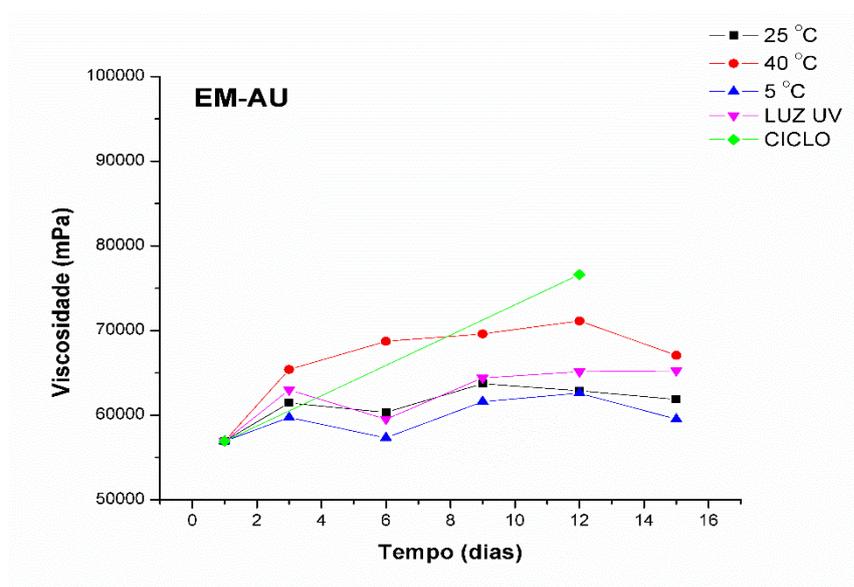


Figura 51. Valores de viscosidade da EM-AU obtidos na estabilidade preliminar
 Fonte: autor

A partir dos gráficos e pelos valores de média de viscosidade e desvio padrão calculados, é possível observar que para EM-BS houve um leve aumento de

viscosidade para todas as condições, sendo um pouco mais expressivo para a amostra submetida ao ciclo de congelamento/ descongelamento. Para a EM-AU a viscosidade também não sofreu grandes alterações, tendo demonstrado variações um pouco mais expressivas para as amostras submetidas ao ciclo de congelamento/descongelamento, à luz indireta e a 40 °C. Porém, as alterações observadas não são expressivas e, portanto, as emulsões demonstraram-se de certa forma estáveis com relação à viscosidade.

5.5.5. Determinação do teor de AU

O teor de AU nas amostras submetidas à temperatura de 25, 50 e 5 °C e à luz indireta, determinado nos tempos T1, T9 e T15, bem como o teor da amostra submetida ao ciclo de congelamento/descongelamento em T12, estão representados na Figura 52.

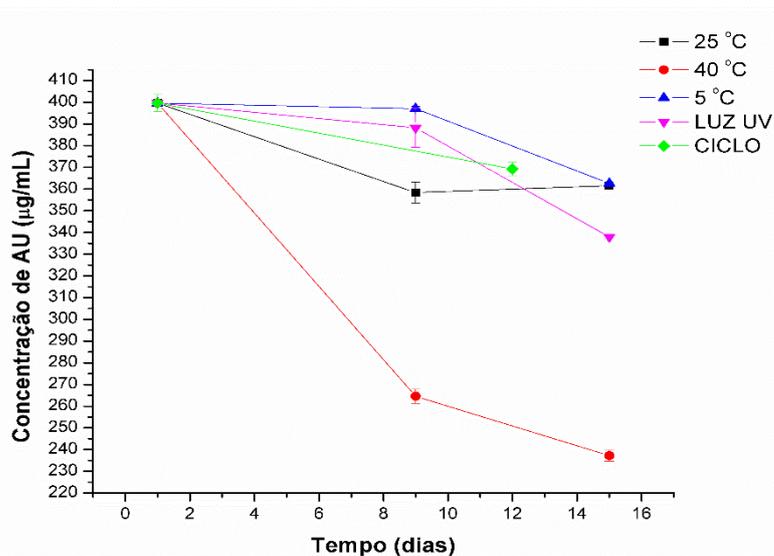


Figura 52. Valores de teor de EM-AU ao longo dos 15 dias de experimento

Para análise do teor de AU ao longo do tempo, também foi feita uma análise estatística ANOVA One Way, com pós teste de Tuckey. Os resultados estão representados através de médias e desvio padrão na Tabela 13.

Tabela 13. Média e desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/mL}$) de AU na EM-AU no início, meio e fim do estudo de estabilidade preliminar, frente às condições submetidas

Tempo (dias)	Condição de armazenamento				
	25 °C	40 °C	5 °C	LUZ	CICLO
1	399,63 ^a \pm 4,00				
9	358,40 ^b \pm 4,96	264,58 ^b \pm 3,26	397,05 ^a \pm 0,98	388,24 ^a \pm 9,09	-
12	-	-	-	-	369,27 ^b \pm 3,03
15	361,49 ^b \pm 7,79	237,20 ^c \pm 2,55	362,62 ^b \pm 8,26	337,96 ^b \pm 3,13	-

Legenda: a,b,c,- letras iguais representam valores estatisticamente iguais em uma mesma coluna

Fonte: autor

Analisando a Figura 52 e a Tabela 13, observa-se um decaimento no valor do teor em todas as condições às quais a EM-AU foi submetida, sendo esse decaimento mais significativo nas amostras submetidas à temperatura de 40 °C e à luz, o que está de acordo com os resultados obtidos para aspecto, cor e odor, e viscosidade, em que também foram percebidas mudanças nessas mesmas condições às quais as amostras foram submetidas. Provavelmente, como já foi discutido, essa diferença encontrada possa ter ocorrido em decorrência da temperatura que causaria uma degradação do AU presente nas formulações. Dessa forma, há um indicativo de que um produto contendo AU necessitaria de condições especiais de armazenagem para que o ativo não sofresse degradação causando prejuízos à formula.

6. CONCLUSÕES

- ✓ O controle de qualidade da MP avaliada forneceu dados que proporcionaram confiabilidade à amostra. Porém através do ensaio de solubilidade foi possível perceber a dificuldade de solubilização que o AU apresenta, principalmente em água, o que acaba limitando a escolha dos materiais a serem utilizados e dos ensaios a serem realizados. Sendo assim, torna-se necessário o estudo de mecanismos que facilitem a solubilização do AU;
- ✓ A avaliação da eficácia do AU com relação à atividade antioxidante, despigmentante e antimicrobiana foi comprovada através dos ensaios empregados, tendo o AU apresentado uma boa atividade frente a todos os testes, principalmente no antimicrobiano, em que demonstrou um forte potencial para inibição e morte celular, o que reforça a ideia de um ativo bastante interessante, com características multifuncionais para prevenção de alterações indesejadas na pele e como um possível agente antimicrobiano de formulações, a ser mais explorado na área cosmética;
- ✓ Apesar do AU exigir uma concentração mais alta que o AA para inibição de 50% dos compostos nos ensaios realizados para atividade antioxidante e despigmentante, ele apresenta a vantagem de possuir atividade antimicrobiana e diversas outras reportadas em literatura, como atividade anti-inflamatória e antineoplásica, o que o tornam um ativo multifuncional interessante para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos multifuncionais. Além disso, sua associação com outros ativos antioxidantes e despigmentantes poderia aumentar a potência dos mesmos;
- ✓ Em concentrações até 50 µg/mL o AU não demonstrou citotoxicidade, porém é necessário o desenvolvimento de mecanismos que melhorem sua solubilidade, a fim de que se possa aumentar a concentração para o teste até a obtenção da máxima concentração em que não se observa citotoxicidade;
- ✓ A metodologia desenvolvida e validada apresentou a vantagem de, além de empregar preceitos de química verde, utilizando solventes menos tóxicos em comparação com as metodologias encontradas em literatura, ter apresentado um tempo de retenção menor do que os encontrados em literatura;

- ✓ A emulsão preparada com AU revelou poucas diferenças nas características físico-químicas como aspecto, pH e viscosidade comparada com a emulsão preparada sem AU;
- ✓ O estudo de estabilidade preliminar da emulsão contendo AU demonstrou que as características de pH e viscosidade da emulsão se mantêm estáveis quando submetida a condições extremas. Porém o teor de AU é alterado, sofrendo decaimento, principalmente em temperaturas elevadas, indicando que alguns cuidados devem ser tomados quanto a temperatura de armazenamento de um produto acabado.

7. REFERÊNCIAS

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.4168-4170, 2001.

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

ALMEIDA, J.R.G.S.; ARAÚJO, C.S.; PESSOA, C.; COSTA, M.P.; PACHECO, A.G.M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Rev. Bras. Frutic.**, v.36, p.258-264, 2014.

ALVARADO, H.L.; ABREGO, G.; SOUTO, E.B.; GARDUÑO- RAMIREZ, M.L.; CLARES, B.; GARCIA, M.L.; CALPENA, A.C. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo an in vivo characterization. **Colloi Surf B: Biointerfaces**, v.130, p.40-47, 2015.

ALVES, L.D.S.; ROLIM, L.A.; FONTES, D.A.F.; NETO, P.J.R.; SOARES, M.F.L.R.; SOBRINHO, J.L.S. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UV-VIS. **Quim. Nova**, v.33, n.9, p.1967-1972, 2010.

AMARAL, L.F.B. **Avaliação da eficácia antimicrobiana do monoéster de C-8 xilitol como alternativa conservante para produtos cosméticos**. Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciências Biomédicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

ANCHISI, C.; MACCIONI, A.M.; SINICO, C.; VALENTI, D. Stability studies of new cosmetic formulations with vegetable extracts as functional agents. **II Farmaco**, v.56, p.427-431, 2001.

ANTELO, D.P.; FIGUEIRA, A.L.; CUNHA, J.M.T. Aspectos imunológicos do vitiligo. **Med. Cutan. Iber. Latin. Am**, v.36, n.3, p.125-136, 2008.

ANTIENÈ, D.; LEKAVICIENE, R. Psychological and physical well-being of Lithuanian youth: Relation to emotional intelligence. **Medicina**, n.53, p.277-284, 2017.

ANTONIO, E.; JUNIOR, O.R.A.; ARAUJO, I.S.; KHALIL, N.M.; MAINARDES, R.M. Poly (lactic acid) nanoparticles loaded with ursolic acid: Characterization and *in vitro* evaluation of radical scavenging activity and cytotoxicity. **Materials Sci. Eng. C**, n.71, p.156-166, 2017.

ANTUNES, R.M.P.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; CAMARA, C.A.; ARRUDA, T.A.; CATÃO, R.M.R.; et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 16, n.4, p. 517-524, 2006.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química**- Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2012.

BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, v.29, n 1, p.113-123, 2006.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BERGAMIN, L.S.; FIGUEIRÓ, F.; DIETRICH, F.; MANICA, F.M.; FILIPPI-CHIELA, E.C.; MENDES, F.B.; et al. Interference of ursolic acid treatment with glioma growth: an *in vitro* and *in vivo* study. **Eur Jour Pharmacology**, v. 811, p.268-75, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RES n. 481, de 23 de setembro de 1999. Estabelece os parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 set.1999.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC n.7, de 10 de fevereiro de 2015. Dispõe sobre os requisitos técnicos para a regularização de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 fev., 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada. RDC n.166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul. 2017.

BUENO, C.; VILLEGAS, M.L.; BERTOLOTI, S.G.; PREVITALI, C.M.; NEUMANN, M.G.; ENCINAS, M.V. The excited-state interaction of resazurin and resorufin with amines in aqueous solutions. *Photophysics and photochemical reaction. Photochem Photobiol*, v.76, n.4, p.385-390, 2002.

CAMARANO, A.A.; PASINATO, M.T. O envelhecimento populacional na agenda das políticas públicas. **Os novos idosos brasileiros: muito além dos 60?**. Capítulo 8, p.253, 2004.

ÇELIK, D.; YILDIZ, M. Investigation of hydrogen production methods in accordance with green chemistry principles. **Int. J. Hydrogen Energy**, n.42, p.23395- 23401, 2017.

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

CHIARI, B.G.; TROVATTI, E.; PECORARO, E.; CORREA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; RIBEIRO, S.J.L.; ISSAC, V.L.B. Synergistic effect of green coffee oil and synthetic sunscreen for healthcare application. **Ind. Crops Prod.**, v.52, p.389-393, 2014.

CLSI. Manual Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards- 6ª ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006a.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Information Supplement. Document M2-A9 Disk Diffusion, v.26, n.3, 2006b.

CORRÊA, M.A.; KUREBAYASHI, A.K.; ISAAC, V.L.B. **Cosmetologia** Ciência e Técnica. São Paulo: Livraria e editora MEDFARMA, 2012.

COSTA, A.; CORDERO, T.; MARMIRORI, J.; MOISES, T.A.; ALVES, C.R.T. Associação de emblica, licorice e belides como alternativa à hidroquinona no tratamento clínico de melasma. **An Bras Dermatol.**v.85, n.5, p.613-620, 2010.

DALLA VECHIA. L.; GNOATTO, S.C.B.; GOSMANN, G. Derivados oleanos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim. Nova**, v. 32, n 5, p.1245-1252, 2009.

DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA, R.F.A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Quim Nova**, v.30, n.1, p.99-105, 2007.

DUARTE, A.F.S.; HIROTA, B.C.K.; DE OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS, R.; MURAKAMI, F.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl. (Rubiaceae). **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.35, n. 4, p. 607-614, 2014.

ELOY, J.O.; OLIVEIRA, E.C.V.; OLIVEIRA, S.S.A.M.; SARAIVAI, J.; MARCHETTI, J.M. Desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE para

quantificação de ácido ursólico em dispersões sólidas. **Quim. Nova**, v.35, n.5, p.1036-1040, 2012.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, n.37, p. 277-285, 2004.

FARMACOPEIA brasileira. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERRAZ, M.S.F.C. O conceito de saúde. **Rev. Saúde Pública**, v.31, n.5, p.538-42, 1997.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, n1, 1997.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, MTJ. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/ água: avaliação da estabilidade física. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.30, n.3, p.263-271, 2009.

FRANZOL, A.; REZENDE, M.C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionante aniônico, catiônico e não- iônico. **Polímeros**, n.25, p.1-9, 2015

FRIGHETTO, N.; WELENDORF, R.M., SILVA, A.M.P.; NAKAMURA, M.J.; SIANI, A.C. Aplicação de cromatografia centrífuga de contra- corrente na purificação de ácido ursólico das folhas de *Eugenia brasiliensis* Lam. **Rev. Bras. Farmacogn.**, n.15(4), p.338, 2005.

GONCHOROSKI, D.D.; CORREA, G.M. Tratamento de hiperchromia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. **Infarma**.v.17, n.3/4, p.84-88, 2005.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **Lancet**.v.355, n.9210, p.1179-80, 2000.

HAMERMESH, D.S.; ABREVAYA, J. Beauty is the promise of happiness? **Eur. Eco. Review**, n.64, p.351-368, 2013.

HAO, Q.; TIAN, J.; LI, X.; CHEN, L. Using a hybrid of green chemistry and industrial ecology to make chemical production greener. **Resources, Conservation and Recycling**, n.122, p.106-113, 2017.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm Bonaer**. v. 23, n.3, p.418-24, 2004.

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

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO, H.R.N; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico- químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev.Ciênc.Farm.Básica Apl.**, v.29, n.1, p.81-96, 2008.

JESUS, J.A.; LAGO, J.H.G.; LAURENTI, M.D.; YAMAMOTO, E.S.; PASSERO, L.F.D. Antimicrobial activity of oleanic and ursolic acids: an update. **Evidence-Based Comp.and Alt.Medicine**. v.2015, p.14, 2015.

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

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

KALACHE, A.; VERAS, R.P.; RAMOS, L.R. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. **Rev.Saúde Publ**. v.21, n. 3, p.200-10, 1987.

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

KOZAI, K.; MIYAKE, Y.; KOHDA, H.; KAMETAKA, S.; YAMASAKI, K.; SUGINAKA, H.; NAGASAKA, N. Inhibition of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* by oleanolic and ursolic acid. **Caries Res**, v.21, n.2, p.104-108, 1987.

KUMAR, R.; PHILIP, A. Modified Transdermal Technologies: Breaking the barriers of drug permeation via the skin. **Trop. J. Pharm. Res**.v.6, n.1, p.633-44, 2007.

LABORATÓRIO DE PESQUISA MULTIUSUÁRIOS. **Imagens e informações do laboratório multiusuários.** Disponível em: < <http://www2.fcfar.unesp.br/#!/laboratorios-multiusuarios/laboratorios/>>. Acesso em: 17 ago. 2017.

LABORATÓRIO I MULTIUSUÁRIOS DE ANÁLISES QUÍMICAS. **Imagens e informações do equipamento (3) Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com RAMAN acoplado- FT- RAMAN/ FTIR.** Disponível em: < <http://www.iq.unesp.br/#!/laboratorios-multiusuarios/lab-multiusuario-de-analises-quimicas---nova/laboratorio-i/>>. Acesso em: 18 out. 2017.

LIU, J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, 49, p.57-58, 1995.

LIPOWSKA, M.; LIPOWSKI, M.; OLSZEWSKI, H.; DYKALSKA- BIECK, D. Gender differences in body- esteem among seniors: Beauty and health considerations. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v.67, p.160- 170, 2016.

MAGALHAES, W.S.; CORREA, C.M.; ALENCASTRO, R.B.; NAGEM, T.J. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. **Quim Nova**.v.35, n.2, p.241- 8, 2012.

MARTINS, M.R.F.M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Rev. Bras. Ciênc.Farm.**, v.38,n.1, 2002.

MCCOLL-KENNEDY, J.R.; DANAHER, T.S.; GALLAN, A.S.; ORSINGHER, C.; LERVIK-OLSEN, L.; VERMA, R. How do you feel today? Managing patient emotions during health care experiences to enhance well- being. **Journal of Business Research**, v.79, p.247-259, 2017.

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

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

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases Biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An.Bras. Dermatol.** v.84, n.3, p.263-9, 2009.

MORAIS, S.M.; JUNIOR, F.E.A.C.; SILVA, A.R.A.; NETO, J.S.M.; RONDINA, D.; CARDOSO, J.H.L. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste brasileiro. **Quim Nova**, v.29, n.5, p.907-910, 2006.

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

NICOLETTI, M.A.; ORSINE, E.M.A.; DUARTE, A.C.N.; BUONO, G.A. Hiperchromias: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**.v.14, p.46-51, 2002.

OLIVEIRA, E.C.V.; CARNEIRO, Z.A.; ALBUQUERQUE, S.; MARCHETTI, J.M. Development and evaluation of a nanoemulsion containing ursolic acid: a promising trypanocidal agent. **Pharm Sci Tech**.v.18, n. 7, p.2551-60, 2017.

OLOYEDE, H.O.B.; AJIBOYE, H.O.; SALAWU, M.O.; AJIBOYE, T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic and ursolic acid. **Microbial Pathogenesis**.v.111, p.338-44, 2017.

O'NEIL, M.J.; SMITH, A.; HECKELMAN, P.E. (Ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**. 13th. ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck, 2001. p.1761-1762.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Rev Bras Farmacogn.** v. 17, n.1, p.102-107, 2007.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method

for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; DE MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação de estabilidade física. **Rev. Bras. Ciênc.Farm.**, v.44, n.2, p.249-259, 2008.

PORTAL MEC. Livro 092- arquivos. Disponível em: <<http://portal.mec.gov.br/seb/arquivos/pdf/livro092.pdf>>. Acesso em 27 out. 2017.

PRADO, A.G.S. Química verde, os desafios da química do novo milênio. **Quim Nova**, v.26, n.5, p.738-744, 2003.

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

RESENDE, E.C. Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo ácido ursólico: investigação da atividade citotóxica, antioxidante, antidegradação da matriz celular, toxicidade e permeação cutânea ex vivo e in vivo. 2013. F. 23-24. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)- Universidade Federal de Goiás.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quim. Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RIBEIRO, M.O.; GOMES, M.S.; SENNA, S.G.; ROSSETTI, M.L.R.; FONSECA, L.S. Avaliação de testes rápidos em microplacas usando indicadores de viabilidade celular para determinação da susceptibilidade de cepas *Mycobacterium tuberculosis* à isoniazida e rifampicina. **J. Bras Pneumologia**, v. 30, n.4, p.455-460, 2004.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de toxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Res.**, v.6, n. 3, p.317-320, 2003.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; DA SILVA, L.P.; MANFRON, M.P.; CERON, C.S.; ALVES, S.H.; KARKOW, A.K.; SANTOS, J.P.A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Cienc. Rural**, v.39, n.3, p.941-944, 2009.

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

SÁ JUNIOR, L.S.M. Desconstruindo a definição de saúde. **Jornal do Conselho Federal de Medicina**, p.15-16, jul/ago/set,2004.

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

SATO, M.E.O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. **Rev Bras Cien Farmacêuticas**.v. 43, n.2, p. 195-203, 2007.

SANTOS, T.G.; REBELO, R.A.; DALMARCO, E.M.; GUEDES, A.; GASPER, A.L.; BELLA CRUZ, A.B.; SCHMIT, A.P.; BELLA CRUZ, R.C.; STEINDEL, M.; NUNES, R.K. Composição Química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. **Quim. Nova**, v.35, n.3, p.477-481, 2012.

SCOTTI, L.; SCOTTI, M.T.; CARDOSO, C.; PAULETTI, P.; GAMBOA, I.C.; BOLZANI, V.S.; VELASCO, M.V.R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.43, n.2. p. 153-166, 2007.

SILVA, F.M.; LACERDA, P.S.B.; JUNIOR, J.J. Desenvolvimento sustentável e química verde. **Quim Nova**, v.28, n.1, p.103-110, 2005.

SILVA, M.G.V; VIEIRA, I.G.P, MENDES, F.N.P; ALBUQUERQUE, R.N.S; SILVA, F.O; MORAIS, S.M. Variation of Ursolic Acid Content in Eight Ocimum Species from Northeastern Brazil. **Molecules**, n.13, p.2482- 2487, 2008.

SILVA, H.S.; LIMA, A.M.M.; GALHARDONI, R. Successful aging and health vulnerability: approaches and perspectives. **Interface- Comunic., Saude, Educ.**, v.14, n.35, p.867-77, 2010.

SINGH, S.; LOHANI, A.; MISHRA, A.K.; VERMA, A. Formulation and evaluation of carrot seed oil- based cosmetic emulsions. **J. Cosmet. Laser Ther.**, v.20, p.1-9, 2018.

SOMOVA, L.O.; NADAR, A.; RAMMANAN, P.; SHODE, F.O. Cardiovascular, antihyperlipidemic and antioxidant effects of oleanolic and ursolic acids in experimental hypertension. **Phytomedicine**.v.10, p.115-21, 2003.

SOUZA, T.M.; MOREIRA, R.R.D.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade anti- séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Rev Bras Farmacogn**, v.17, n.1, p.71-75, 2007.

SPAGNOL, C.M. **Estudo da eficácia e citotoxicidade de filme e sistema emulsionado contendo ácido cafeico**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP Araraquara, 2014.

SPAGNOL, C.M.; FERREIRA, G.A.; CHIARI-ANDRÉO, B.G.; ISAAC, V.L.B.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Ascorbic acid in cosmetic formulations: stability, in vitro release, and permeation using a rapid, inexpensive, and simple method. **J. Disper. Sci. Technol.**, v. 38, n. 6., p. 901-908, 2017.

TARALKAR, S.V.; CHATTOPADHYAY, S. A HPLC method for determination of ursolic acid and betulinic acids from their methanolic extracts of vitex negundo linn. **J Anal Bioanal Techniques**, v. 3, n.3, 2012.

TOBIN, D.J. Introduction to skin aging. **J Tissue Viability**.n.26, n.1, p.37-46, 2017.

VERAS, R. Envelhecimento populacional contemporâneo: demandas, desafios e inovações. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, n.3, p.548-54, 2009.

USP. United States Pharmacopeia Convention. Chromatography- Physical tests. **U.S. Pharmacopeia National Formulary**, USP 40 NF 35, <621>, 2017.

VIEIRA, L.M.; CASTRO, C.F.S.; DIAS, A.L.B.; SILVA, A.R. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr.All. (Anacardiaceae). **Rev Bras PI Med**.v.7, n.4, p.521-527, 2015.

VUJCIC, M.; TOMICEVIC-DUBLJEVIC, J.; GRBIC, M.; LECIC-TOSEVSKI, D.; VUKOVIC, O.; TOSKOVIC, O. Nature based solution for improving mental health and well-being in urban areas. **Environmental Research**, n.158, p.385-392, 2017.

XU, X.H.; SU, Q.; ZANG, Z.H. Simultaneous determination of oleanolic acid and ursolic acid by RP-HPLC in the leaves of *Eriobotrya japonica* Lidl. **J Pharma Analysis**, v.2, n.3, p.238-40, 2012.

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

ZHOU, C.; CHEN, K.; SUN, C.; CHEN, Q.; ZHANG, W. Determination of oleanolic acid, ursolic acid and amygdalin in the flower of *Eriobotrya japonica* Lindl.by HPLC. **Biomed Chromatogr**, v.21, n.7, p.755-761, 2007.