

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Mesilato de desferroxamina como candidato a adjuvante
farmacêutico e cosmético

Márcia Lombardo

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

SÃO PAULO
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Mesilato de desferroxamina como candidato a adjuvante
farmacêutico e cosmético

Márcia Lombardo

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR
Orientador: Profa. Dra. Telma Mary Kaneko

SÃO PAULO
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L841m Lombardo, Márcia
Mesilato de desferroxamina como candidato a adjuvante farmacêutico e cosmético / Márcia Lombardo. - São Paulo, 2019.
162 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Farmácia.
Orientador: Kaneko, Telma Mary

1. Farmácia e Cosmetologia. 2. Farmacotécnica.
3. Antioxidantes. 4. Conservantes. I. T. II.
Kaneko, Telma Mary, orientador.

Márcia Lombardo

Mesilato de desferroxamina como candidato a adjuvante
farmacêutico e cosmético

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do título de DOUTOR

Profa. Dra. Telma Mary Kaneko
Orientador/ presidente

1º examinador

2º examinador

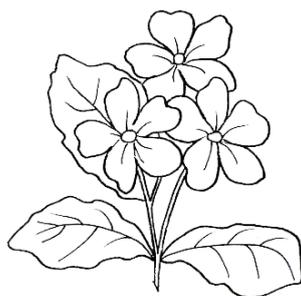
3º examinador

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Para meus pais e para minhas irmãs.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e a Universidade de São Paulo pelo provimento de cada recurso, direto ou indireto, necessário à execução deste trabalho. Expresso sincera gratidão a todos que de alguma forma me auxiliaram e me inspiraram ao longo destes anos. Em especial, quero agradecer a professora Telma Mary Kaneko pela oportunidade, orientação e suporte, e acima de tudo, pela alegria, confiança e tantos aprendizados. Ao professor Felipe Rebelo Lourenço pela parceria importantíssima, por ser sempre atencioso e exemplo de dedicação. Ao professor Breno Pannia Espósito pela colaboração valiosa e entusiasmo em ensinar. Aos professores André Rolim Baby, Terezinha de Jesus Andreoli Pinto e Irene Satiko Kikuchi, pelo incentivo. À pesquisadora Adriana Bugno, pelo apoio. E às colegas Lucile Tiemi Abe Matsumoto e Danielle Cristina Silva de Oliveira, por toda ajuda e energia positiva.



“O amor por princípio e a ordem por base;
o progresso por fim.”

- Auguste Comte

RESUMO

LOMBARDO, Márcia. **Mesilato de desferroxamina como candidato a adjuvante farmacêutico e cosmético**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Este trabalho propôs o uso do fármaco quelante mesilato de desferroxamina (DFO) como agente adjuvante para estabilização química e microbiológica de formulações. Soluções de ácido ascórbico (AA) 5,0% (p/v) foram preparadas com sistemas antioxidantes constituídos por diferentes combinações de DFO, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e metabissulfito de sódio, cada adjuvante na concentração máxima de 0,1% (p/v). Os sistemas foram testados previamente quanto à atividade antioxidante, mediante adição de um complexo de ferro (III) redox-ativo e ensaio baseado em fluorescência. Os sistemas também foram associados ao metilparabeno e avaliados quanto à atividade antimicrobiana pelo método turbidimétrico, utilizando-se a técnica de microdiluição em meios líquidos e cepas padrão de bactérias e fungos, incluindo *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 8739), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *C. albicans* (ATCC 10231) e *A. brasiliensis* (ATCC 16404). As soluções de AA foram expostas a condições de teste de estabilidade acelerada e avaliadas quanto à estabilidade química, empregando-se método volumétrico validado para quantificar AA. Verificou-se que o EDTA foi o agente quelante que melhor contribuiu na estabilidade química da solução de AA, entretanto, o DFO apresentou desempenho muito superior ao EDTA para bloquear a atividade pró-oxidante do ferro. Além disso, o DFO foi fator relevante na inibição do crescimento microbiano e demonstrou sinergia com o metilparabeno. A otimização estatística dos resultados indicou que o uso do DFO nos sistemas antioxidante e conservante pode reduzir consideravelmente a concentração dos adjuvantes convencionais, EDTA, metabissulfito e metilparabeno, os quais são muitas vezes associados a reações de hipersensibilidade ou a danos ao meio ambiente.

Palavras-chave: Desferroxamina. Quelante. Sequestrante. Conservante.

ABSTRACT

LOMBARDO, Márcia. **Desferroxamine mesylate as a candidate for pharmaceutical and cosmetic adjuvant**. 2019. 82 f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

In this work it was proposed the use of the chelating drug desferroxamine mesylate (DFO) as adjuvant for chemical and microbiological stabilization of formulations. Ascorbic acid (AA) solutions 5.0% (w/v) were prepared with antioxidant systems containing different combinations of DFO, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and sodium metabisulphite, using a maximum concentration of 0.1% (w/v) for each adjuvant. Previously, the systems were spiked with a redox-active iron (III) complex and tested for antioxidant activity by fluorescence-based assay. The systems also were associated with methylparaben and evaluated for antimicrobial activity by turbidimetric method, using the microdilution technique and standard strains of bacteria and fungi, including *S. aureus* (ATCC 6538), *E. coli* (ATCC 8739), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *C. albicans* (ATCC 10231) and *A. brasiliensis* (ATCC 16404). The AA solutions were exposed to accelerated stability test conditions and evaluated for chemical stability, using a volumetric method that was validated to quantify AA. It was found that EDTA was the chelating agent that most contributed to the chemical stability of AA solution, however, DFO demonstrated a much higher performance to EDTA to block the pro-oxidant activity of iron. In addition, DFO was a relevant factor in the inhibition of microbial growth and showed synergy with methylparaben. The statistical optimization of the results indicated that the use of DFO in the antioxidant and preservative systems might considerably reduce the concentration of the conventional adjuvants, EDTA, metabisulphite and methylparaben, which are often associated with hypersensitivity reactions or environmental damage.

Keywords: Desferroxamine. Chelating agent. Sequestrant. Preservative.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Mesilato de desferroxamina e sua forma complexada com Fe (III).....35
- Figura 2** – Interação metal-ligante e formação do anel quelato.....38
- Figura 3** – Ácido etilenodiamino tetra-acético em sua forma desprotonada e em sua forma complexada com íon metálico divalente.....41
- Figura 4** – Estrutura química geral dos parabenos e estrutura do metilparabeno....48
- Figura 5** – Principais grupos funcionais encontrados nos sideróforos.....55
- Figura 6** – Estrutura octaédrica de um complexo metálico.....56
- Figura 7** – Esquema do ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*.....76
- Figura 8** - Taxas de oxidação para os sistemas adjuvantes utilizados na estabilização química da solução de ácido ascórbico.....86
- Figura 9** - Superfície de resposta para a atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....89
- Figura 10** - Curva de distribuição fracionária de espécies α_i em função do pH, para o ácido etilenodiamino tetra-acético.....91
- Figura 11** - Curva de distribuição fracionária de espécies α_i em função do pH, para a desferroxamina.....91
- Figura 12** – Superfície de resposta para a inibição de *Staphylococcus aureus* em função das concentrações de metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....97

Figura 13 – Superfície de resposta para a inibição de <i>Escherichia coli</i> em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....	99
Figura 14 – Superfície de resposta para a inibição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....	101
Figura 15 – Superfície de resposta para a inibição de <i>Candida albicans</i> em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....	102
Figura 16 – Superfície de resposta para a inibição de <i>Aspergillus brasiliensis</i> em função das concentrações de desferroxamina e metilparabeno.....	103
Figura 17 - Volume gasto na determinação potenciométrica do teor de ácido ascórbico.....	107
Figura 18 – Perfil cromatográfico do ácido ascórbico.....	108
Figura 19 - Reação de óxido-redução do ácido ascórbico.....	110
Figura 20 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à seletividade.....	112
Figura 21 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à precisão e exatidão.....	113
Figura 22 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à linearidade.....	113
Figura 23 – Temperatura do ambiente ao longo do estudo de estabilidade da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) na condição de bancada.....	114

Figura 24 – Alíquotas da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) isenta de adjuvantes, após o preparo e após 56 dias na bancada e na estufa.....115

Figura 25 - Superfície de resposta para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....119

Figura 26 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de ácido etilenodiamino tetra-acético e desferroxamina na solução de ácido ascórbico.....126

Figura 27 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de ácido etilenodiamino tetra-acético e metilparabeno na solução de ácido ascórbico.....127

Figura 28 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de desferroxamina e metilparabeno na solução de ácido ascórbico.....128

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Composição das soluções de ácido ascórbico 5,0% (p/v) segundo o ensaio fatorial 3^3 fracionado.....66
- Tabela 2** – Desenho experimental da composição das amostras para a avaliação da atividade antioxidante.....68
- Tabela 3** – Concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético e mesilato de desferroxamina em porcentagem peso/volume e em milimolar.....69
- Tabela 4** - Composição das amostras segundo o ensaio fatorial 2^3 com pontos centrais, para a avaliação da atividade antimicrobiana.....72
- Tabela 5** - Intervalos de tempo de avaliação das soluções de ácido ascórbico.....78
- Tabela 6** - Amostras para a avaliação da seletividade do método volumétrico de teor de ácido ascórbico.....81
- Tabela 7** - Amostras para a avaliação da seletividade do método volumétrico de teor de ácido ascórbico em relação ao metabissulfito.....82
- Tabela 8** - Análise de variância para a regressão da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....87
- Tabela 9** - Equação de regressão e coeficientes de determinação para a atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....88
- Tabela 10** – Crescimento microbiano em absorbância e porcentagem de recuperação dos micro-organismos nos ensaios de atividade antimicrobiana.....94

Tabela 11 – Análise de variância para a regressão da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....	95
Tabela 12 – Equações de regressão e coeficientes de determinação para a atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.....	96
Tabela 13 - Influência do ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno na inibição do crescimento microbiano.....	104
Tabela 14 - Porcentagens de recuperação de ácido ascórbico para a avaliação da seletividade do método de teor.....	111
Tabela 15 - Análise de variância para a regressão da estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....	116
Tabela 16 - Equações de regressão e coeficientes de determinação para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina.....	117
Tabela 17 – Tempo máximo predito da estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) para os diferentes sistemas adjuvantes e condições de exposição.....	118
Tabela 18 - Coeficientes de determinação para os modelos estatísticos de atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes e estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v).....	122
Tabela 19 - Requisitos de qualidade estabelecidos para a solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v).....	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – ácido ascórbico

Ab – *Aspergillus brasiliensis*

ATCC - *American Type Culture Collection*

BS – metabissulfito de sódio

Ca – *Candida albicans*

DFO – desferroxamina ou mesilato de desferroxamina

DHR - dihidrorodamina

DMSO - dimetilsulfóxido

Ec – *Escherichia coli*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe/DFO - complexo de ferro (III) e desferroxamina

Fe/EDTA - complexo de ferro (III) e ácido etilenodiamino tetra-acético

Fe/NTA – complexo de ferro (III) e ácido nitrilotriacético

g.l. – graus de liberdade

HBS - *Hepes Buffer Solution*

HEPES - N - (2-hidroxiethyl) piperazina - N' - (2 - ácido etanosulfônico)

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

MP - metilparabeno

NTA - ácido nitrilotriacético

Pa – *Pseudomonas aeruginosa*

PVDF - fluoreto de polivinilideno

RSD - desvio-padrão relativo

R²-aj - coeficiente de determinação ajustado

R²-pred - coeficiente de determinação de predição

Sa – *Staphylococcus aureus*

SQ – soma dos quadrados

UA – unidades de absorbância

UFC – unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	33
2 REVISÃO DA LITERATURA	37
2.1 Agentes quelantes em formulações farmacêuticas e cosméticas	37
2.1.1 Ácido etilenodiamino tetra-acético: aspectos de segurança.....	42
2.2 Agentes conservantes em formulações farmacêuticas e cosméticas	45
2.2.1 Conservantes: aspectos de segurança.....	51
2.3 Mesilato de desferroxamina	53
2.3.1 Atividade antimicrobiana da desferroxamina.....	60
3 OBJETIVO	64
3.1 Objetivo geral	64
3.2 Objetivos específicos	64
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 Material utilizado no preparo das amostras	65
4.2 Soluções de ácido ascórbico	66
4.3 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes	68
4.3.1 Preparo das amostras para a avaliação da atividade antioxidante.....	68
4.3.2 Ensaio de atividade antioxidante <i>in vitro</i>	70

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes.....	71
4.4.1 Preparo das amostras para a avaliação da atividade antimicrobiana.....	71
4.4.2 Cepas microbianas e meios de cultura.....	73
4.4.3 Preparo das soluções-controle do ensaio de atividade antimicrobiana.....	74
4.4.4 Ensaio de atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	75
4.5 Avaliação da estabilidade química das soluções de ácido ascórbico.....	77
4.5.1 Ensaio de teor de ácido ascórbico.....	78
4.5.2 Verificação do método de quantificação de ácido ascórbico.....	80
4.5.3 Ensaio complementar de identificação de ácido ascórbico.....	83
4.6 Análise estatística.....	84
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes.....	85
5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes.....	92
5.3 Avaliação da estabilidade química das soluções de ácido ascórbico.....	105
5.4 Otimização estatística dos resultados.....	121
6 CONCLUSÃO.....	130
7 REFERÊNCIAS.....	131
8 APÊNDICES.....	143
9 ANEXOS.....	160

1 INTRODUÇÃO

O processo de desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas tem como prioridade garantir requisitos que atestem a eficácia e a segurança do produto final. Formulações com problemas na estabilidade podem comprometer a adesão e o sucesso do tratamento ou representar riscos à saúde do usuário. Com intuito de prevenir degradações, melhorar a aceitação ou mesmo o desempenho do produto, ingredientes adjuvantes são adicionados às formulações (LUIZA; CASTRO; NUNES, 1999; ELDER; KUENTZ; HOLM, 2016).

Os ingredientes frequentemente utilizados para manter a estabilidade de formulações possuem funções antioxidantes, sequestrantes, conservantes, tamponantes ou modificadoras do pH. Diversas substâncias podem ser empregadas para estes fins e o perfil toxicológico consiste no principal fator de seleção a ser considerado (PIFFERI; SANTORO; PEDRANI, 1999; PIFFERI; RESTANI, 2003).

A degradação de produtos farmacêuticos e cosméticos resulta principalmente da exposição ao oxigênio atmosférico ou da proliferação de micro-organismos contaminantes, tornando-se fundamental a incorporação de sistemas antioxidantes e conservantes nas formulações (HALLA et al., 2018).

Os agentes quelantes e conservantes são utilizados com frequência em uma ampla gama de produtos e o contato diário e repetido favorece o desencadeamento de reações de hipersensibilidade em indivíduos suscetíveis. Ademais, agentes convencionalmente utilizados na maioria dos medicamentos e produtos de higiene pessoal, tais como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e os parabenos, têm sido identificados como poluentes emergentes (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003; RUSSO et al., 2014; HAMAN et al., 2015; DEZA; GIMÉNEZ-ARNAU, 2017).

Neste sentido, a busca de adjuvantes alternativos ou a associação a novos agentes consiste em uma tendência atual, de maneira que sejam eficazes em concentrações reduzidas e não prejudiciais ao homem e ao meio

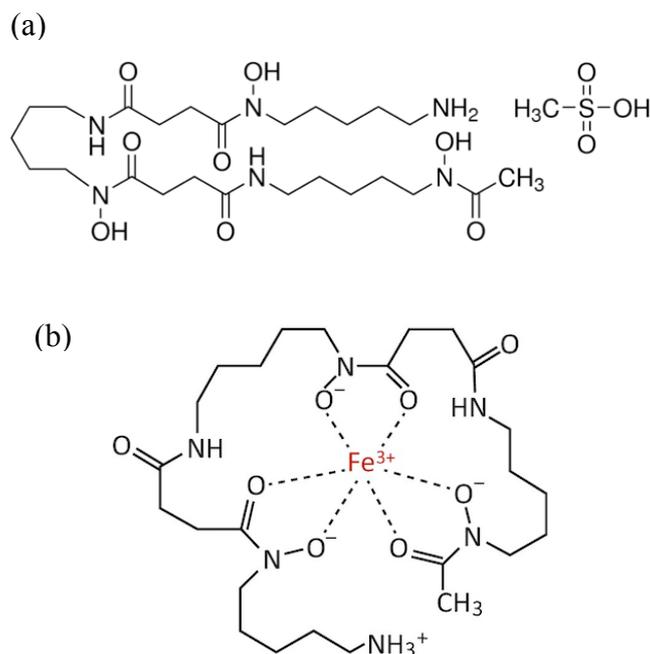
ambiente (OSTROSKY et al., 2011; SIEGERT, 2014; NARAYANAN et al., 2017).

Nesta busca ressaltamos os agentes pertencentes à classe dos fármacos quelantes. Estes medicamentos são utilizados para reverter a sobrecarga de metais no organismo, especialmente a sobrecarga de ferro associada à hemocromatose hereditária, hemossiderose transfusional ou intoxicação. As elevadas concentrações de ferro no organismo levam a um drástico aumento na formação de radicais livres, os quais são altamente tóxicos aos tecidos e órgãos (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; ALI; VIDHALE, 2013).

Estudos mostram que os fármacos quelantes também podem ser úteis para auxiliar o tratamento de diversas doenças infecciosas e degenerativas. O emprego destes fármacos em esquemas de antibioticoterapia se baseia na inibição do crescimento de microrganismos e parasitas frente à privação de elementos essenciais a sobrevivência microbiana. A retirada de ferro do meio pela ação de agentes quelantes acarreta na inibição ou inativação de proteínas e enzimas envolvidas em funções vitais dos micro-organismos (MARX, 2002; HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; GOKARN; PAL, 2018).

De acordo com Holbein e Orduña (2010), a quelação de ferro e a necessidade subjacente deste elemento representa a base para novos métodos de controle microbiano. Estes autores consideram como promissores os efeitos sinérgicos entre agentes quelantes e adjuvantes tradicionais na conservação de alimentos e produtos de higiene pessoal.

O emprego dos fármacos quelantes é limitado às terapias de quelação. A proposta deste trabalho considera que as propriedades destes fármacos podem ser de particular interesse à área do desenvolvimento de produtos farmacêuticos e cosméticos, como adjuvantes multifuncionais para a estabilização química e microbiológica de formulações. Dentre eles, o mesilato de desferroxamina (**Figura 1**) apresenta características que podem ser desejáveis para tal uso.

Figura 1 – Mesilato de desferroxamina e sua forma complexada com Fe (III)

Fonte: BOGDAN et al., 2016 (Adaptado)

a) mesilato de desferroxamina; b) complexo de ferro/desferroxamina

A desferroxamina é um produto natural de origem bacteriana, cuja molécula apresenta elevado peso molecular e reduzida lipofilicidade. O sal mesilato de desferroxamina é um fármaco que possui penetração tecidual restrita, com pobre absorção pelo trato gastrointestinal e tempo de meia-vida no plasma extremamente curto. Como não há biodisponibilidade pela via oral, o medicamento é apresentado somente na forma injetável (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; BYRNE; KRISHNAMURTHY; WESSLING-RESNICK, 2013).

Por outro lado, a notável hidrossolubilidade da molécula e a reduzida taxa de absorção agregam vantagens para um possível emprego da desferroxamina como agente quelante e/ou conservante em formulações, principalmente no que se refere a produtos para via tópica. Além disso, a sua utilização como adjuvante presume concentrações bem menores que as doses terapêuticas, sugerindo reduzida probabilidade de reações adversas e custos mais aceitáveis.

Neste contexto, este trabalho pretende trazer perspectivas para uma nova aplicação do mesilato de desferroxamina, bem como para o aprimoramento da qualidade de produtos farmacêuticos e cosméticos. Para tanto, faz-se necessária uma avaliação de seu potencial antioxidante e antimicrobiano, em comparação com sistemas clássicos de estabilização e conservação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agentes quelantes em formulações farmacêuticas e cosméticas

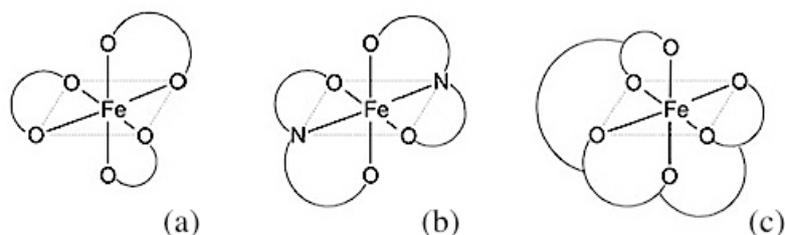
As alterações oxidativas de fármacos em solução resultam de reações que dependem de diversos fatores como concentração de oxigênio, temperatura, pH, radiação ultravioleta e presença de catalisadores. Os íons metálicos atuam como catalisadores de reações de decomposição e são considerados pró-oxidantes de influência decisiva no processo de auto-oxidação. Vestígios de metais em um sistema auto-oxidável podem acelerar a etapa de iniciação da oxidação. Assim, é importante que as soluções auto-oxidáveis sejam convenientemente protegidas, a fim de evitar ou retardar o máximo possível o desencadeamento dos processos oxidativos (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Os sulfitos, bissulfitos e metabissulfitos são os principais agentes antioxidantes utilizados na tecnologia farmacêutica de sistemas aquosos e atuam diretamente na remoção de radicais livres. Os agentes quelantes ou também denominados sequestrantes atuam por mecanismos preventivos, na desativação de metais, impedindo que estes precipitem, catalisem a oxidação ou participem de reações danosas ao produto. Frequentemente, os agentes quelantes são associados aos antioxidantes, visando à obtenção de efeitos sinérgicos (HART, 1984; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Os agentes quelantes funcionam como espécies doadoras de elétrons. A porção aniônica da molécula reage com cátions metálicos, formando-se ligações de coordenação para resultar em complexos ou anéis quelatos. Os agentes quelantes multidentados apresentam múltiplos locais para formar ligações de coordenação, aprisionando o metal em estruturas cíclicas fortemente ligadas (**Figura 2**). Os complexos ou quelatos possuem propriedades químicas totalmente diferentes das que caracterizam o metal livre, melhorando a partição na fase aquosa e conferindo-lhe maior

solubilidade, além de redução no potencial de óxido-redução (HART, 1984; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Figura 2 – Interação metal-ligante e formação do anel quelato



Fonte: HIDER, 2014 (Adaptado)

a) quelante bidentado: até três moléculas do quelante para um átomo de ferro; b) quelante tridentado: até duas moléculas do quelante para um átomo de ferro; c) quelante hexadentado: uma molécula do quelante para um átomo de ferro

Como anteriormente comentado, os agentes quelantes estão presentes em quase todos os produtos de higiene pessoal de consumo diário, com o objetivo de melhorar a estabilidade, a efetividade e a aceitação do consumidor (HART, 1984; ABTURYN, 2013).

As impurezas metálicas em produtos farmacêuticos e cosméticos originam-se principalmente da água, das matérias-primas naturais, dos dispositivos de fabricação e dos recipientes de armazenamento. Por isso, os quelantes são utilizados para impedir que tais impurezas catalisem reações de oxidação ou rancificação associadas a alterações indesejáveis no produto, por exemplo, a opacificação de emulsões e a modificação de fragrâncias. Componentes de fragrâncias como aldeídos e cetonas são rapidamente oxidados por traços de ferro, cobre ou manganês (HART, 1984; ABTURYN, 2013).

Além de impactos na qualidade da formulação, as impurezas metálicas podem causar problemas de saúde e danos ao meio ambiente, o que justifica os esforços contínuos das Agências Reguladoras para implementar limites

aceitáveis de metais em medicamentos. A origem dos resíduos metálicos nestes produtos é atribuída principalmente a reagentes e catalisadores utilizados na síntese de fármacos. Ainda, o próprio processo de manufatura é causa comum de contaminação do produto com metais (WOLLEIN et al., 2015).

No caso da água, medidas de tratamento devem ser adotadas para torná-la aceitável ao uso desejado. Na indústria farmacêutica a qualidade da água é crítica e de alta prioridade, devendo atender rigorosas especificações físicas, químicas e microbiológicas. Em relação às impurezas metálicas da água, torna-se relevante a remoção dos componentes de dureza, cálcio e magnésio, e outras, como ferro e manganês (PAHWA et al., 2010).

A persistência de metais no ambiente e a ocorrência destes na natureza causam a contaminação de diversas matérias-primas, especialmente aquelas de interesse à indústria cosmética. Derivados vegetais e pigmentos podem apresentar níveis inadequados de metais pesados, tais como chumbo e mercúrio. De fato, alguns metais são proibidos em cosméticos, devido a reações de sensibilização da pele ou até efeitos sistêmicos, com agravos à saúde em exposições em longo prazo. Há que se considerar que a exposição está associada ao uso diário de mais de um produto, muitas vezes aplicados em extensas áreas do corpo e permanecendo em contato com a pele por longos períodos (BOCCA et al., 2014).

Como elemento abundante na natureza destaca-se o ferro, o qual pode apresentar-se na forma solúvel (Fe II) ou insolúvel (Fe III), como hidróxido. Em ambientes aeróbicos o estado oxidado do ferro é prevalente e de baixa solubilidade em pH neutro. Devido ao elevado potencial de óxido-redução, o ferro é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio altamente tóxicas ao meio (BRAUN; HANTKE, 2011; CHATURVEDI; DAVE, 2012; BYRNE; KRISHNAMURTHY; WESSLING-RESNICK, 2013).

A presença de ferro na água pode também ser decorrente de atividades industriais e do processo de corrosão de materiais. O excesso de ferro na água provoca alterações como turbidez, coloração avermelhada, odor característico e sabor metálico. Quando na forma de hidróxido, o ferro é capaz de manchar

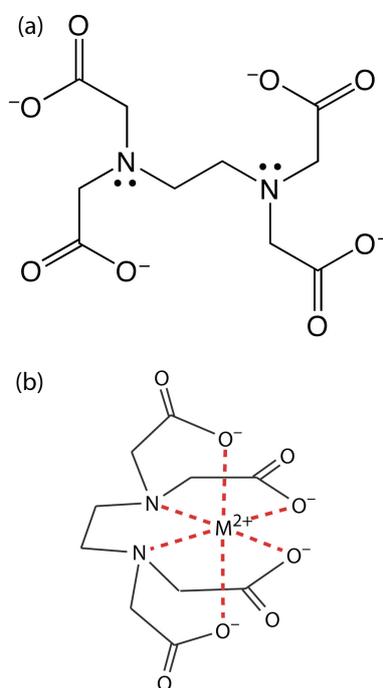
superfícies e obstruir tubulações. Níveis elevados de ferro podem causar o aumento da população de certas bactérias, o que contribui para o entupimento de encanamentos e a menor vazão. A degradação gradual de tubulações constituídas de ferro resulta em perfurações e vazamentos (CHATURVEDI; DAVE, 2012).

Frente ao exposto, o uso de agentes quelantes no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas torna-se necessário. Os principais agentes quelantes utilizados em soluções aquosas podem ser agrupados em agentes inorgânicos, como os polifosfatos, ou em agentes orgânicos, como os ácidos hidroxilados (ácido cítrico, ácido tartárico e ácido glucônico) e os derivados dos ácidos aminocarboxílicos. Os agentes quelantes orgânicos são os que apresentam maior interesse farmacêutico (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996).

Os ácidos aminocarboxílicos são espécies polianiônicas cujos grupamentos amino e carboxil possibilitam a formação de ligações de coordenação com cátions metálicos di e trivalentes, formando complexos neutros ou aniônicos, geralmente solúveis e estáveis. Desta classe de quelantes, o agente mais empregado é o ácido etilenodiamino tetra-acético, ou EDTA (HART, 1984; LANIGAN; YAMARIK, 2002; ABTURYN, 2013).

O EDTA e seus sais são aminas substituídas, cujo ânion tetranegativo é fortemente atraído por cátions metálicos alcalinos terrosos e de transição (**Figura 3**). Como quelante hexadentado, o EDTA doa seis pares de elétrons para formar pontes de coordenação com o íon metálico, originando uma conformação estrutural altamente estável. O EDTA é capaz de combinar-se com diversos metais, como cálcio ou ferro, diminuindo a disponibilidade dos mesmos (HART, 1984; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; LANIGAN; YAMARIK, 2002; ABTURYN, 2013).

Figura 3 – Ácido etilenodiamino tetra-acético em sua forma desprotonada e em sua forma complexada com íon metálico divalente



Fonte: <https://chem.libretexts.org/>

a) ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); b) complexo metal/EDTA

O principal uso atribuído ao EDTA é de agente clarificante, visto que impede a formação de compostos insolúveis de cálcio, magnésio e ferro, causadores de turvação. Originalmente, o EDTA foi desenvolvido para neutralizar os efeitos negativos da água dura e também para sequestrar metais pesados dos corantes utilizados na indústria têxtil. Na área da farmácia, os sais de sódio do EDTA são largamente utilizados na proteção de soluções medicamentosas contendo substâncias facilmente oxidáveis, como por exemplo, o ácido ascórbico (HART, 1984; PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; LANIGAN; YAMARIK, 2002; ABTURYN, 2013).

A formação de complexos metálicos depende de muitos fatores. A extensão e a magnitude da competição entre os metais são determinadas pelo poder de ligação do agente quelante com o metal e varia conforme a razão molar, o pH do meio e a presença de ânions que tendem a formar precipitados com o íon metálico. A estabilidade dos quelatos de EDTA é crescente para os

cátions Na^+ , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Fe^{+2} , Co^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Pb^{+2} e Fe^{+3} (HART, 1984; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Agentes quelantes tais como EDTA, ácido láctico, ácido cítrico e ácido fólico são também utilizados em formulações para potencializar a ação de conservantes, aprimorando a eficácia contra micro-organismos resistentes. A complexação de cátions polivalentes presentes na célula microbiana enfraquece a estabilidade celular e torna o micro-organismo mais sensível, facilitando a permeação do conservante. Adicionalmente, a remoção de elementos essenciais ao metabolismo celular, tal como o ferro do meio, contribui com a atividade antimicrobiana (LUNDOV et al., 2009; VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017; HERMAN, 2018).

Para as bactérias gram-negativas em particular, o EDTA é capaz de remover íons cálcio e magnésio da parede celular e romper interações eletrostáticas de proteínas e lipopolissacarídeos, levando à desintegração da camada externa (HART, 1984; ALAKOMI et al., 2006; VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017; HALLA et al., 2018).

2.1.1 Ácido etilenodiamino tetra-acético: aspectos de segurança

O consumo mundial do ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) atinge toneladas. Isto porque o EDTA tem ampla aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia, agroquímica, têxtil, metalúrgica, do papel, dentre outras. Em décadas passadas, o EDTA era um insumo extremamente consumido pela indústria fotográfica. Atualmente, o emprego do EDTA e de seus sais em cosméticos e produtos de higiene pessoal merece destaque. Nestes produtos o EDTA é considerado um adjuvante multifuncional, com propriedades antioxidantes e antimicrobianas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; LANIGAN; YAMARIK, 2002; KROKIDIS; MEGOULAS; KOUPPARIS, 2005; ABTURYN, 2013).

Devido à habilidade em quelar íons cálcio e romper conexões intercelulares, o EDTA é também utilizado como agente de permeação tecidual

em formulações farmacêuticas e cosméticas de uso externo, a fim de facilitar a penetração e a absorção de ativos. Diversos estudos de desenvolvimento de produtos já demonstraram o efeito positivo do EDTA na permeação de ativos, como em formulações de creme para tratar tumor de pele, solução oftálmica para tratar glaucoma, supositório para tratar hemorroida e produtos cosméticos para o cuidado da pele (MALIK et al., 1995; LANIGAN; YAMARIK, 2002; KIKUCHI et al., 2005; ABTURYN, 2013; AGUILERA et al., 2013; UNITED STATES PATENT, 2015).

Por outro lado, esta propriedade do EDTA pode fazer com que certos componentes da formulação sejam indesejavelmente absorvidos e se tornem prejudiciais, interferindo na segurança do produto. Além disso, reações de irritação são atribuídas às alterações provocadas na morfologia celular. Embora o próprio EDTA não seja absorvido pela pele e seja considerado um sensibilizante fraco, o uso repetido pode induzir à dermatite de contato. Em vista do potencial citotóxico, preconiza-se o uso do EDTA como adjuvante de formulações em concentrações menores que 2% (LANIGAN; YAMARIK, 2002).

Casos graves de reações adversas ao EDTA em indivíduos altamente suscetíveis já foram reportados na literatura. Reações imunológicas como alergia de contato, dermatite, eczema e indução de exantema sistêmico foram diagnosticadas em pacientes expostos a medicamentos e cosméticos contendo EDTA na composição. Os casos relacionados a medicamentos de uso externo envolveram pomada anti-inflamatória, colírios, pomadas oculares e spray nasal, enquanto os casos relacionados a medicamentos parenterais envolveram anestésicos locais e meio de contraste (RAYMOND; CROSS, 1969; KRUYSWIJK; POLAK, 1980; de GROOT, 1986; BHUSHAN; BECK, 1998; RUSSO et al., 2014; RAJAN; CORNELL; WHITE, 2015).

No caso das reações adversas ao EDTA associadas a cosméticos e produtos de higiene pessoal, estas foram decorrentes do contato com loções hidratantes, cremes hidratantes, filtros solares e xampus (KIMURA; KAWADA, 1999; SOGA et al., 2003; SÁNCHEZ-PEDREÑO; GARCÍA-BRAVO; FRÍAS-INIESTA, 2009; PRUITT; WARSHAW, 2010; RAJAN; CORNELL; WHITE, 2015).

De acordo com Laborde-Castérot et al. (2012), sintomas respiratórios como rinite e asma induzidos por EDTA foram diagnosticados em trabalhadores expostos a inalação de produtos aerossol, incluindo detergentes e desinfetantes contendo elevadas concentrações de EDTA.

Os saneantes domissanitários frequentemente contêm elevadas concentrações de EDTA na formulação, tanto para aumentar o espectro bactericida como para aprimorar o poder de limpeza, principalmente quando a composição do produto apresenta ácidos graxos sensíveis aos íons de dureza da água, cálcio e magnésio. Neste caso, o EDTA previne a formação de coágulos insolúveis de sabão que irão afetar a qualidade e a eficácia do produto (HART, 1984).

Outros aspectos negativos decorrentes do emprego massivo do EDTA são os riscos ecotoxicológicos. O EDTA é considerado uma substância persistente no ambiente porque apresenta limitada capacidade de biodegradação. Na área cosmética a questão ambiental contribuiu muito para o decaimento da sua popularidade, mesmo apresentando-se como um eficiente agente quelante (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003; LUNDOV et al., 2009; VARVARESOU et al., 2009; SIEGERT, 2014).

As inúmeras aplicações do EDTA o tornaram um dos poluentes antropogênicos mais espalhados no mundo. O EDTA já foi encontrado em elevadas proporções em águas superficiais da Europa. Por ser utilizado predominantemente em meio aquoso, este agente é amplamente liberado no ambiente através de efluentes domésticos e industriais. A presença de EDTA no solo se deve principalmente às aplicações agroquímicas e ao descarte de produtos em reservatórios de lixo (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003).

A degradação de complexos metálicos do EDTA depende da sua estabilidade e de condições ambientais restritas. O único processo natural capaz de remover complexos de EDTA consiste na fotólise, sendo esta limitada às superfícies, onde a intensidade de luz solar é maior. O complexo de Fe/EDTA é o mais lábil porque é muito fotoativo, enquanto outros complexos metálicos e a molécula livre de EDTA são mais persistentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998; OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003).

Quanto à biodegradação do EDTA, estudos realizados em águas subterrâneas mostraram que este processo dificilmente ocorre. Além disso, o EDTA é considerado tóxico para diversos micro-organismos. A biodegradação do EDTA já foi demonstrada em escala laboratorial, mas requer culturas microbianas altamente específicas e que normalmente são escassas na natureza. Infelizmente, as técnicas de tratamento de efluentes para eliminação de quelatos de EDTA geralmente apresentam custos elevados e riscos de originar subprodutos tóxicos (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003; KUVICHKINA et al., 2012).

A contaminação ambiental com EDTA acarreta em alterações no ecossistema, pois facilita a mobilidade de íons metálicos e a eutrofização da água. A menor oferta de íons metálicos essenciais ao metabolismo celular afeta organismos fotossintéticos. Por outro lado, a maior biodisponibilidade de Fe (III) estimula o crescimento de microalgas, causando desequilíbrios. Além disso, os complexos de EDTA podem aumentar significativamente a biodisponibilidade de metais pesados, altamente tóxicos a comunidades bióticas, embora os riscos potenciais de bioacumulação ainda não sejam conhecidos (OVIEDO; RODRÍGUEZ, 2003; SCHMIDT; BRAUCH, 2004).

2.2 Agentes conservantes em formulações farmacêuticas e cosméticas

Agentes conservantes são substâncias com atividade antimicrobiana utilizadas para prevenir a deterioração e prolongar a vida de prateleira do produto, bem como para proteger o usuário de infecções. Estes agentes são adicionados com o objetivo de manter a pureza microbiológica durante as etapas de fabricação, embalagem, estocagem e principalmente durante o período de uso, garantindo a eficácia e a segurança do produto (NARAYANAN et al., 2017; HERMAN, 2018).

Além do emprego de agentes conservantes, diversos aspectos devem ser considerados quando se busca a conservação de uma formulação, incluindo o controle microbiológico das matérias-primas, a validação da eficácia

antimicrobiana do sistema conservante e a escolha da embalagem primária (HALLA et al., 2018).

Os contaminantes microbiológicos de formulações farmacêuticas e cosméticas originam-se principalmente do ar, da água e das matérias-primas. Estes contaminantes podem ainda ser introduzidos pelos próprios manipuladores durante a produção, estocagem ou manuseio. Assim, a adoção das boas práticas de fabricação torna-se imperativa para prevenir a contaminação microbiana e deve contemplar o estabelecimento de operações unitárias bem definidas, a validação de procedimentos de limpeza e as atividades de treinamento da equipe (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A água é um dos fatores mais importantes na contaminação microbiana de produtos. A qualidade microbiológica da água depende de sua origem, sendo que os tratamentos de desmineralização e deionização frequentemente a melhoram. Para garantir a qualidade ótima, procedimentos complementares como ultrafiltração e radiação ultravioleta devem ser empregados (HALLA et al., 2018).

As composições farmacêuticas e cosméticas geralmente oferecem um ambiente ideal para a proliferação de micro-organismos, principalmente quando apresentam base aquosa e são acondicionadas em embalagens para uso repetido. Em preparações estéreis multidoses, como medicamentos injetáveis e colírios, os conservantes são adicionados para manter a esterilidade inicial do produto. A formulação deverá então se tornar um ambiente hostil e a atividade do conservante suficientemente rápida para garantir a eliminação de micro-organismos introduzidos pelo consumidor durante o uso (VARVARESOU et al., 2009; PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

A contaminação microbiana de formulações farmacêuticas e cosméticas pode causar descoloração, pontos pigmentados, formação de gases e odores, quebra de emulsões, alterações em propriedades reológicas e modificações no pH. Além disso, a contaminação representa riscos à saúde do usuário, principalmente quando se trata de produtos que possam entrar em contato com queimaduras e epitélio lesado (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Segundo Lundov et al. (2009), as infecções relacionadas a cosméticos são difíceis de serem descobertas ou documentadas e os surtos geralmente relacionam-se a patógenos oportunistas em indivíduos imunodeprimidos. É possível que o uso de cosméticos contaminados ocorra diariamente na população, mas sem suspeitas de infecções. Esta situação pode se tornar crítica em indivíduos sensíveis e que apresentam doenças de pele como dermatite de contato, para os quais os riscos de infecção serão maiores.

O *Staphylococcus aureus* e a *Pseudomonas aeruginosa* são os micro-organismos patogênicos mais encontrados em cosméticos, devido à habilidade que possuem para proliferar em diversos substratos. Além destes, fungos e leveduras dos gêneros *Aspergillus* sp e *Candida* sp são muito frequentes como contaminantes de formulações. Assim, as cepas padrão a serem utilizadas no teste de eficácia antimicrobiana de formulações farmacêuticas e cosméticas devem incluir os micro-organismos potencialmente patogênicos em produtos, como os descritos a seguir (LUNDOV et al., 2009; HALLA et al., 2018).

O *Staphylococcus aureus* é um cocos gram-positivo presente na microbiota da pele e região nasal e sua presença em produtos pode ser indicativa de contaminação humana. A *Pseudomonas aeruginosa* é um bacilo gram-negativo ubíquo, altamente patogênico e resistente, muito prejudicial quando envolvido em infecções oculares. A *Escherichia coli* é um bacilo gram-negativo indicativo de contaminação fecal. Como a maioria dos coliformes, *E. coli* é capaz de desenvolver resistência com facilidade. A *Candida albicans* é uma levedura ubíqua, altamente resistente e encontrada em mucosas humanas. O *Aspergillus brasiliensis* é um fungo filamentoso considerado a principal causa de contaminação e decomposição de cosméticos por bolores (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010; HALLA et al., 2018).

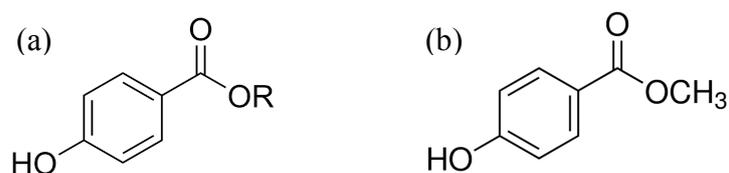
A escolha do agente conservante durante o desenvolvimento de formulações não é tarefa fácil, pois depende das particularidades de cada produto. Esta escolha deve se basear em características ideais como compatibilidade com os componentes da formulação, compatibilidade fisiológica, amplo espectro de ação, reduzido grau de toxicidade e baixos custos (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Atualmente existem muitos agentes conservantes aprovados para o uso, entretanto, a área cosmética é dominada pelos parabenos, formaldeídos, liberadores de formaldeído e isotiazolinonas. Dentre estes, os parabenos são predominantes, sendo encontrados em diferentes categorias de produtos e níveis de concentração (LUNDOV et al., 2009).

Os parabenos são os conservantes mais empregados em produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, devido ao baixo custo e ao amplo espectro de ação. Outras vantagens incluem pH próximo à neutralidade, ausência de odor e estabilidade em temperaturas elevadas. Além disso, não interferem na cor e na viscosidade de formulações (GENUIS et al., 2013; JUNGMAN; LAUGEL; BAILLET-GUFFROY, 2013).

Os parabenos são ésteres alquílicos do ácido para-hidroxibenzoico (**Figura 4**). Os mais utilizados são metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, isopropilparabeno, butilparabeno, isobutilparabeno e benzilparabeno. À medida que a cadeia alquílica (R) aumenta a atividade antimicrobiana também aumenta, enquanto a hidrossolubilidade diminui (JUNGMAN; LAUGEL; BAILLET-GUFFROY, 2013).

Figura 4 – Estrutura química geral dos parabenos e estrutura do metilparabeno



a) estrutura geral dos parabenos; b) metilparabeno

O mecanismo de ação dos parabenos consiste na inibição da síntese de proteínas, enzimas e material genético da célula microbiana. Outros mecanismos propostos estão relacionados com a influência no transporte de nutrientes através da membrana celular e a interação com canais iônicos, modificando a permeabilidade e a estabilidade da célula microbiana. Além

disso, estudos mostram que os parabenos podem afetar o consumo de oxigênio nas mitocôndrias de fungos (HALLA et al., 2018).

Outros agentes conservantes frequentemente utilizados em cosméticos e produtos de higiene pessoal são triclosan, álcool benzílico, clorexidina, tiomersal, compostos nitrogenados e sulfitos. O fenoxietanol e os ácidos orgânicos são mais empregados em associações de substâncias conservantes (LUNDOV et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017; HALLA et al., 2018; HERMAN, 2018).

De acordo com a estrutura química e o grupo funcional reativo, os conservantes podem apresentar diferentes mecanismos de ação antimicrobiana. Do ponto de vista de conservação, o uso de altas concentrações é mais efetivo, porém, de maior toxicidade; enquanto que concentrações muito baixas favorecem o desenvolvimento de resistência microbiana (HALLA et al., 2018).

Embora os agentes conservantes previnam a degradação microbiana do produto e os riscos ao usuário, muitos deles já foram associados a impactos negativos na saúde, estimulando a busca de novas substâncias com melhor perfil toxicológico. Considera-se ainda a utilização de ingredientes capazes de potencializar a ação dos conservantes, permitindo assim diminuir a concentração dos mesmos na formulação (VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017).

A tecnologia de barreiras é uma abordagem muito utilizada na área de alimentos e tem sido aplicada na produção de cosméticos. Esta tecnologia fundamenta-se na combinação inteligente de fatores de conservação, a fim de criar uma série de impedimentos para diminuir ou eliminar a contaminação microbiana. Os fatores de conservação abrangem processos criteriosos de desenvolvimento da formulação e da embalagem do produto, medidas para o controle da atividade de água e do pH e o cumprimento das boas práticas de fabricação. Isto possibilita a obtenção de efeitos sinérgicos para a proteção do produto e até a diminuição da quantidade de conservantes necessária à estabilidade da formulação (VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017).

O princípio da tecnologia de barreiras provê as bases científicas para o desenvolvimento de produtos livres de conservantes sintéticos, seja pelo emprego de agentes alternativos ou de ingredientes multifuncionais. Esta estratégia é promissora para a redução dos conservantes convencionais, entretanto, nem sempre garante a completa eliminação de efeitos adversos, irritantes ou sensibilizantes de uma formulação (VARVARESOU et al., 2009; HERMAN, 2018).

Os ingredientes multifuncionais são aqueles que além de possuir propriedades benéficas e desejáveis, tais como hidratantes e antioxidantes, contribuem na conservação microbiológica do produto. Estes ingredientes apresentam atividade antimicrobiana e são úteis no controle de microorganismos resistentes. A possibilidade de eliminação total dos agentes conservantes em uma formulação resulta em produtos denominados autoconservantes (VARVARESOU et al., 2009; HERMAN, 2018).

Exemplos de ingredientes multifuncionais aprovados em cosméticos incluem os emolientes e surfactantes, tais como glicóis, etil-hexilglicerina, ácidos graxos e seus monoésteres e fosfolípidos; as fragrâncias; o álcool fenetílico; os antioxidantes fenólicos; os agentes quelantes; o óxido de zinco; as nanopartículas de prata; dentre outros. Os principais agentes multifuncionais de origem natural são os peptídeos antimicrobianos, os óleos essenciais e os extratos vegetais (VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017; HERMAN, 2018).

Siegert (2014) propôs a estabilização microbiológica de diferentes formulações cosméticas por meio de ingredientes multifuncionais associados a agentes quelantes. O autor destaca que o diacetato tetrassódico de glutamato, um agente quelante altamente biodegradável, foi capaz de melhorar a eficácia antimicrobiana, possibilitando reduzir as concentrações usuais dos ingredientes multifuncionais nas formulações.

Narayanan et al. (2017) demonstraram a eficácia antimicrobiana de formulações de produtos para higiene pessoal livres de agentes conservantes. Novamente, os efeitos sinérgicos no controle da contaminação microbiana

foram obtidos pela associação de ingredientes multifuncionais a agentes antioxidantes e quelantes, resultando em formulações autoconservantes.

2.2.1 Conservantes: aspectos de segurança

Os aspectos relacionados com a segurança dos agentes conservantes constituem uma prioridade da ciência da conservação, já que a atividade contra as células microbianas necessariamente implica em toxicidade às células humanas (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010).

Em cosméticos, os agentes conservantes representam o maior grupo de substâncias alergênicas, depois das fragrâncias. Em sua maioria, os conservantes são substâncias de baixo peso molecular e alto potencial em causar reações de intolerância durante o contato (HALLA et al., 2018).

As questões relacionadas à segurança dos conservantes estão cada vez mais em evidência, principalmente porque oferecem riscos a indivíduos altamente suscetíveis ao desenvolvimento de dermatite de contato e eczema atópico (LUNDOV et al., 2009; DEZA; GIMÉNEZ-ARNAU, 2017; NARAYANAN et al., 2017; HERMAN, 2018).

A relação direta entre o efeito antimicrobiano e a toxicidade faz com que os agentes de conservação mais efetivos sejam os mais tóxicos ao usuário. Entretanto, a extensão, duração, frequência e via de exposição são fatores a serem considerados (HALLA et al., 2018).

Quanto maior o nível de exposição aos conservantes, maior a probabilidade de reações alérgicas, sendo estas reações dose-dependentes. Os efeitos indesejáveis podem se manifestar logo no primeiro contato ou após anos de uso, desde uma leve irritação na pele até quadros mais críticos (LUNDOV et al., 2009; HALLA et al., 2018).

Visto que a toxicidade atribuída aos conservantes é considerada inerente, a pesquisa de agentes com potencial tóxico reduzido ou o aprimoramento de estratégias de conservação já existentes são relevantes. A

condição ideal é aquela em que o conservante é capaz de exercer efeitos primários seletivos à célula microbiana (PINTO; KANEKO; PINTO, 2010; HALLA et al., 2018).

Contudo, a capacidade do produto em resistir à contaminação microbiana deve ser avaliada, pois muitas vezes a eficácia antimicrobiana pode ser atingida com concentrações bem menores aos limites máximos permitidos dos conservantes. Assim, o estabelecimento de uma concentração ótima na formulação pode manter um equilíbrio entre a potência e a segurança do agente conservante, de forma a minimizar a ocorrência de efeitos indesejáveis (LUNDOV et al., 2009; HERMAN, 2018).

Os principais conservantes em cosméticos associados a quadros de alergia são os formaldeídos, os liberadores de formaldeído e as isotiazolinonas. Em relação aos parabenos, os casos são considerados relativamente raros diante do uso extensivo desta substância. Porém, alguns estudos sugerem que os parabenos são disruptores endócrinos e possuem atividade estrogênica relacionada ao desenvolvimento de câncer de mama (LUNDOV et al., 2009; VARVARESOU et al., 2009; NARAYANAN et al., 2017; HALLA et al., 2018).

Segundo Jungman, Laugel e Baillet-Guffroy (2013), o risco potencial dos parabenos em formulações tópicas depende da taxa de absorção cutânea e da capacidade de atingir a circulação sistêmica. A permeação de parabenos varia de acordo com os veículos empregados na sua solubilização e pela própria composição da formulação, além de fatores relacionados ao uso do produto, como reaplicação e oclusão.

Entretanto, alguns autores assumem que os parabenos não são substâncias irritantes e que a toxicidade é diminuída após a permeação do estrato córneo, visto que são convertidos em metabólitos menos tóxicos. Consideram ainda que a atividade estrogênica é muito fraca nas concentrações usualmente empregadas. Por outro lado, o fenômeno denominado de paradoxo parabeno é mencionado com frequência na literatura. Neste fenômeno, peles sensíveis não reagem no contato com parabenos, mas reagem facilmente quando se encontram traumatizadas ou eczematosas (JUNGMAN; LAUGEL; BAILLET-GUFFROY, 2013).

Outro aspecto negativo a ser destacado em relação aos parabenos é a questão da contaminação ambiental. Estudos recentes apontam para a presença de parabenos em rios, água potável, águas residuais e no solo. Além disso, indícios de exposição rotineira foram detectados em tecidos e fluídos orgânicos de indivíduos de comunidade urbana (YAMAMOTO et al., 2011; GENUIS et al., 2013; HAMAN et al., 2015).

Genuis et al. (2013) defendem a necessidade de prevenir a exposição aos parabenos porque faltam evidências mais concretas quanto aos mecanismos toxicológicos, o sinergismo a outros agentes, a bioacumulação tecidual e os impactos da exposição em longo prazo. Por isso, alguns países tiveram o uso dos parabenos banido, especialmente em produtos para o público infantil, e muitos fabricantes de cosméticos e produtos de higiene pessoal começaram a apostar em formulações livres de parabenos.

2.3 Mesilato de desferroxamina

O sal mesilato de desferroxamina (vide **Figura 1**) é um fármaco semissintético obtido a partir da desferroxamina B, um sideróforo originalmente isolado da bactéria *Streptomyces pilosus*. Sideróforos são moléculas de baixo peso molecular e com habilidade de quelar ferro. Estas moléculas podem ser excretadas por bactérias, fungos ou plantas gramíneas como uma estratégia para captar e absorver ferro do solo, da água e de outros organismos, diante da necessidade deste elemento (HIDER; KONG, 2010; KOBAYAKAWA; KODANI, 2012).

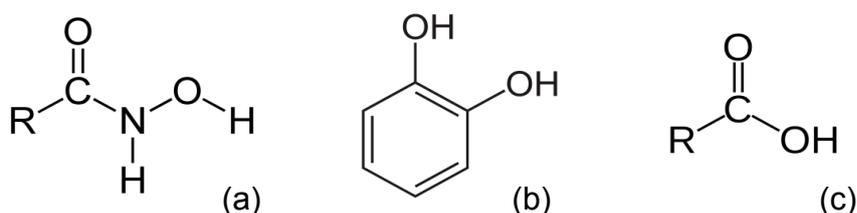
O ferro é um componente essencial para o funcionamento do metabolismo celular. Em ambientes aeróbicos o ferro apresenta-se indisponível, sob a forma de ferro (III), que é insolúvel. Os sideróforos possuem elevada afinidade e seletividade para quelar ferro (III) e têm a biossíntese tipicamente regulada pelos níveis de ferro no meio (BENITE; MACHADO, 2002; HIDER; KONG, 2010).

De acordo com a literatura existem mais de 500 sideróforos, sendo que muitos deles já foram caracterizados estruturalmente. Exemplos clássicos de sideróforos bacterianos são a enterobactina e a aerobactina, produzidas por *Escherichia coli*, a pioverdina e a piochelina, por *Pseudomonas aeruginosa*, a vibriobactina, por *Vibrio cholerae*, a micobactina T, por *Mycobacterium tuberculosis*, dentre outros (BENITE; MACHADO, 2002; HIDER; KONG, 2010).

Além do suprimento de ferro, a secreção de sideróforos pode estar relacionada com aspectos que influenciam a ecologia do meio, tais como patogenicidade, virulência, formação de biofilmes, mutualismo, competição, proteção contra metais tóxicos e evolução da espécie (HARRISON; BUCKLING, 2009; D'ONOFRIO et al., 2010; SAHU; SINDHU, 2011; SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011; LEE; van BAALEN; JANSEN, 2012).

A incorporação celular do ferro via sideróforos depende de mecanismos moleculares complexos, os quais envolvem a expressão de receptores específicos de membrana, proteínas carreadoras dependentes de energia e reguladores pós-transcricionais (KREWULAK; VOGEL, 2008; HIDER; KONG, 2010; BRAUN; HANTKE, 2011).

Em geral, os sideróforos apresentam em suas estruturas porções bidentadas formadas por ácido hidroxâmico, catecol e/ou ácido alfa-hidroxicarboxílico (**Figura 5**). Estes grupos funcionais consistem em sítios ligantes cujos átomos de oxigênio viabilizam a coordenação de íons férricos, formando anéis quelatos de cinco membros muito estáveis. Assim, os sideróforos são basicamente classificados como hidroxamatos, catecolatos ou alfa-hidroxicarboxilatos, podendo apresentar grupos mistos de ligantes. A desferroxamina (vide **Figura 1**) apresenta em sua estrutura três grupos hidroxamato (BENITE; MACHADO, 2002; KREWULAK; VOGEL, 2008; HIDER; KONG, 2010).

Figura 5 – Principais grupos funcionais encontrados nos sideróforos

a) ácido hidroxâmico; b) catecol; c) ácido alfa-hidroxicarboxílico, onde R = carbono alfa

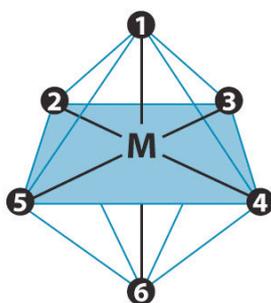
Os sideróforos, sem exceção, possuem maior afinidade para ferro (III) do que para ferro (II). Esta seletividade é um aspecto relevante, considerando-se que diversos íons divalentes tais como zinco, cobre, níquel e magnésio são fundamentais ao metabolismo e à integridade celular. Entretanto, apesar de a altíssima afinidade por ferro (III), muitos sideróforos são capazes de formar complexos relativamente estáveis com outros metais, incluindo alumínio (III), vanádio (III), cromo (III), gálio (III), molibdênio (II), cobre (II) e outros, dependendo da concentração disponível e do pH do meio (BENITE; MACHADO, 2002; HIDER; KONG, 2010; NAGOBA; VEDPATHAK, 2011; SCHALK; HANNAUER; BRAUD, 2011).

De fato, nenhum quelante é totalmente específico por um dado metal. A desferroxamina é capaz de quelar outros metais além do ferro (III) e os protocolos terapêuticos de quelação podem estar relacionados com a deficiência de elementos essenciais ao organismo, como por exemplo, o zinco (AYDINOK et al., 1999; SULTAN et al., 2015).

A seletividade dos sideróforos para ferro (III) é atribuída à presença dos átomos doadores de oxigênio em seus ligantes, carregados negativamente, o que propicia fortes interações com o metal. O ferro (III), assim como outros cátions metálicos trivalentes, possui alta densidade de carga, formando ligações estáveis com os ligantes de oxigênio. Em contrapartida, o ferro (II) tem menor densidade de carga e prefere ligantes nitrogenados. Os ligantes nitrogenados também possuem apreciável afinidade por metais biologicamente relevantes como cobre (II) e zinco (II) (HIDER; KONG, 2010; HIDER, 2014).

Visto que os requisitos de coordenação do ferro (III) são bem atendidos por seis átomos ligantes, os ligantes hexadentados como o trihidroxamato da desferroxamina podem se ligar aos seis orbitais disponíveis do ferro (III), normalmente resultando em um arranjo estrutural octaédrico (**Figura 6**). Nesta estrutura, os seis ligantes se distribuem ao redor de um centro, que é o ferro, com o mínimo de repulsão, o que confere grande estabilidade termodinâmica ao complexo (HIDER; KONG, 2010; HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; HIDER, 2014).

Figura 6 – Estrutura octaédrica de um complexo metálico



Fonte: <https://chem.libretexts.org/>

A elevada afinidade e estabilidade do complexo metálico fazem com que a sua taxa de dissociação seja extremamente baixa, especialmente em valores neutros de pH. Por isso, a troca de ferro entre quelantes hexadentados é um processo excessivamente devagar. No caso dos quelantes bidentados, a estabilidade cinética é menor. Como os quelantes bidentados são capazes de melhor acessar o ferro tecidual e apresentam maior labilidade e tendência em redistribuir o ferro, a associação de quelantes bidentados e hexadentados pode garantir uma terapia de quelação efetiva (HIDER; KONG, 2010; HIDER, 2014).

Quanto maior a seletividade do agente quelante para ferro (III) em relação ao ferro (II), mais negativo é o potencial redox do complexo e, portanto, menor a sua capacidade de gerar radicais livres. A maioria dos ligantes hexadentados formam complexos cineticamente inertes com o ferro (III) e

reduzem a produção de radicais hidroxilas a um mínimo, enfraquecendo o ciclo redox (HIDER; KONG, 2010; HIDER, 2014).

Segundo Benite e Machado (2002), os sideróforos podem representar um verdadeiro ganho econômico e ambiental, já que na qualidade de produtos naturais, sofrem biodegradação e não poluem o meio ambiente.

Vias de degradação da desferroxamina já foram demonstradas por alguns autores. Nestes estudos, cepas de bactérias gram-negativas isoladas da água e do solo e micro-organismos provenientes de estações de tratamento de águas residuais domésticas e industriais foram capazes de degradar a molécula (WINKELMANN; SCHMIDTKUNZ; RAINEY, 1996; WINKELMANN et al., 1999; PIERWOLA et al., 2004; FAZARY; AL-SHIHRI, 2014).

Devido às propriedades quelantes e antioxidantes, amplas aplicações tecnológicas já foram atribuídas aos sideróforos, principalmente nos setores agrônômico e ambiental, como fertilizantes do solo, promotores do crescimento vegetal, agentes de biocontrole, biorremediadores de poluentes e biossensores. Outras aplicações incluem a conservação de metais contra corrosão, a biodegradação da madeira, o branqueamento da polpa de papel e a criopreservação de células. Na área médica, os sideróforos são utilizados como fármacos para reverter a sobrecarga de metais no organismo (BENSON; LYNCH; JONES, 1995; BENITE; MACHADO, 2002; NAGOBA; VEDPATHAK, 2011; ALI; VIDHALE, 2013; AHMED; HOLMSTRÖM, 2014).

Na terapêutica, o mesilato de desferroxamina é indicado para tratar o acúmulo crônico de ferro decorrente de certas patologias, a intoxicação aguda por ferro e o acúmulo crônico de alumínio em pacientes com doença grave nos rins. A desferroxamina se complexa predominantemente com ferro férrico (ferrioxamina) e com íons trivalentes de alumínio (aluminioxamina), os quais são excretados através da urina e das fezes. A afinidade da desferroxamina para íons divalentes tais como cobre, zinco e cálcio é substancialmente menor (DESFERAL, 2018).

O mesilato de desferroxamina é considerado o medicamento padrão ouro para o tratamento de suporte de anemias raras como a talassemia major,

em que pacientes dependentes de frequentes transfusões sanguíneas estão sujeitos a uma constante sobrecarga de ferro no organismo (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; BYRNE; KRISHNAMURTHY; WESSLING-RESNICK, 2013).

A sobrecarga de ferro transfusional implica em ferro lábil no plasma e hemossiderose. O ferro redox ativo é potencialmente tóxico, pois aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, levando ao estresse oxidativo e a morte celular, via peroxidação de lipídeos e oxidação de aminoácidos, proteínas e material genético. Isto acarreta em danos teciduais progressivos, especialmente em células hepáticas, cardíacas e pancreáticas e às vezes irreversíveis, com a perda de funções orgânicas (NEUFELD, 2006; FLEMING; PONKA, 2012).

O tratamento com desferroxamina possibilita ganhos na expectativa de vida de pacientes com sobrecarga de ferro. No entanto, a via parenteral repetida por infusões longas dificulta a adesão ao tratamento. Este cenário tem favorecido a busca de melhorias nos protocolos de quelação, com foco no desenvolvimento de novos agentes quelantes com biodisponibilidade oral e que sejam efetivos na redução dos níveis de ferro teciduais (NEUFELD, 2006).

Até o momento, dois quelantes orais são aprovados para tratar a sobrecarga de ferro: deferiprona, um agente quelante bidentado, e desferasirox, um agente quelante tridentado. Tais quelantes são análogos sintéticos de sideróforos, cujas moléculas apresentam menor peso molecular e maior lipofilicidade em relação à desferroxamina, sendo capazes de formar complexos não carregados e com maior permeabilidade celular. Estes medicamentos são utilizados em associação com desferroxamina, produzindo efeitos sinérgicos, melhor adesão e menores custos no tratamento (NEUFELD, 2006; HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011; BYRNE; KRISHNAMURTHY; WESSLING-RESNICK, 2013).

Os agentes quelantes de ferro são também considerados úteis em protocolos de antibioticoterapia, já que a retirada de ferro pode afetar o desenvolvimento de patógenos. Entretanto, o papel duplo dos quelantes de ferro como antimicrobianos é muito discutido, pois em alguns casos estes

agentes podem favorecer a absorção de ferro pelo micro-organismo. Infecções invasivas tais como yersiniose e mucormicose já foram associadas ao tratamento com desferroxamina. Por outro lado, a perspectiva de introduzir a desferroxamina como antimicrobiano já teve resultados encorajadores em protocolos clínicos e não clínicos da malária (MARX, 2002; KONTOGHIORGHES et al., 2010; VISCA et al., 2013).

Segundo Qiu et al. (2011), a aplicação sistêmica de quelantes de ferro como agentes antimicrobianos pode causar interferências nos níveis de ferro necessários à resposta imunológica. Assim, estes autores sugerem que o potencial antimicrobiano dos quelantes de ferro deve ser mais explorado quanto ao uso tópico, em medicamentos e cosméticos destinados à cicatrização de feridas e infecções de unha ou mesmo em aplicações tecnológicas para evitar a contaminação microbiana de produtos.

A administração tópica da desferroxamina visando à redução de radicais livres e o tratamento auxiliar de agravos cutâneos já foi demonstrada em ensaios *in vivo*, conforme mencionado a seguir. Nestes estudos foram empregados recursos farmacotécnicos para facilitar a permeação cutânea do fármaco.

Juzeniene et al. (2007) discutiram mecanismos relacionados com o acúmulo de substâncias sensibilizantes na pele e avaliaram em um modelo de fotossensibilização o efeito de cremes contendo quelantes de ferro. Para estes autores, os agentes quelantes podem ser úteis na prevenção do fotoenvelhecimento e do câncer de pele.

Segundo Hou et al. (2013), a desferroxamina foi capaz de melhorar a neovascularização e acelerar o tratamento de feridas diabéticas. Neste mesmo contexto, Duscher et al. (2015) propuseram um sistema polimérico de liberação transdérmica e sustentada de desferroxamina, com resultados positivos no tratamento local de úlceras isquêmicas e necrose tecidual decorrentes de diabetes.

Visto que o ferro está envolvido em diversos processos bioquímicos, os quelantes de ferro podem se tornar ferramentas úteis para o tratamento de

muitas doenças infecciosas e degenerativas. O potencial terapêutico dos quelantes de ferro baseia-se na prevenção da formação de radicais livres, na remoção do ferro em sítios catalíticos de enzimas envolvidas na etiologia de algumas doenças ou na obtenção de pró-fármacos e novos derivados farmacologicamente ativos (HELI; MIRTORABI; KARIMIAN, 2011).

No caso da desferroxamina, a limitada permeabilidade da molécula requer estratégias para torná-la mais permeável e promissora no tratamento de processos degenerativos. Goswami et al. (2014) obtiveram conjugados de desferroxamina e peptídeos célula-penetrantes que foram capazes de acessar o ferro intracelular em um modelo *in vitro* da barreira hematoencefálica. Segundo Li et al. (2019), o dímero de desferroxamina-cafeína foi eficaz em quelar o ferro intracelular em linhagens de células de câncer de mama, levando à inibição do crescimento e da motilidade celular e à diminuição da população de células-tronco tumorais.

2.3.1 Atividade antimicrobiana da desferroxamina

As pesquisas iniciais sobre a atividade antimicrobiana *in vitro* da desferroxamina foram conduzidas por van Asbeck et al. (1983a; 1983b), que revelaram efeitos bacteriostáticos de concentrações em torno de 200 a 400 µg/mL para diversas cepas de bactérias patogênicas, incluindo *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Alcaligenes faecalis*, *Neisseria meningitidis* e espécies de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* e *Providencia*. Foram também observados efeitos inibitórios sinérgicos da desferroxamina associada ao ácido ascórbico e a alguns antibióticos convencionais.

Hartzen, Frimodt-Møller e Thomsen (1989; 1991; 1994) corroboraram resultados de van Asbeck et al. (1983a; 1983b). Estes autores demonstraram que apesar da desferroxamina (200 µg/mL) ter apresentado efeitos reduzidos na inibição de dez isolados clínicos de *Staphylococcus aureus*, sua atividade foi relevantemente potencializada pela associação de ácido ascórbico. A desferroxamina também apresentou atividade sinérgica a antibióticos como

cefalotina, gentamicina, cefotaxima e ácido fusídico, principalmente quando associada ao ácido ascórbico, reduzindo a concentração mínima inibitória dos antibióticos contra as cepas de *S. aureus*. Efeitos inibitórios sinérgicos da associação de desferroxamina ou desferroxamina e ácido ascórbico à cefalotina ou gentamicina também foram observados contra cepas de estafilococos coagulase-negativas e bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*.

A necessidade de ferro da levedura patogênica *Candida albicans* e da levedura não patogênica e deteriorante de alimentos *Candida vini* foi investigada por Holbein e Orduña (2010). As leveduras foram desafiadas a diferentes quelantes de ferro exógenos. Entretanto, uma concentração relativamente baixa de desferroxamina (250 µg/mL) falhou em inibir os microorganismos.

Thompson et al. (2012) demonstraram que a desferroxamina em concentrações ao redor de 500 µg/mL não apresentou atividade inibitória relevante contra cepas bacterianas isoladas do ambiente hospitalar, incluindo *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*.

Segundo o estudo de Lai et al. (2016) a desferroxamina não apresentou efeito inibitório para fungos do gênero *Cryptococcus sp* e *Saccharomyces sp*, mesmo em concentrações muito elevadas, de aproximadamente 2000 µg/mL.

Gokarn e Pal (2017) realizaram uma avaliação preliminar da suscetibilidade de isolados resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* à ação de sideróforos. A desferroxamina B em concentrações máximas de 1000 µg/mL demonstrou efeito bacteriostático para a maioria dos isolados, o que foi atribuído à privação de ferro. Além disso, a desferroxamina apresentou atividade sinérgica a fármacos antituberculostáticos, reduzindo a concentração mínima inibitória e trazendo perspectivas no combate à resistência bacteriana.

Gokarn e Pal (2018) demonstraram também efeitos bacteriostáticos de concentrações muito elevadas de desferroxamina B (máximas de 10000 µg/mL) para isolados resistentes de *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*

baumannii e uma atividade sinérgica da desferroxamina a diversos antibióticos. Porém, os autores relataram que não foram observados efeitos sinérgicos do ácido ascórbico quando associado à desferroxamina. Além da privação de ferro, ressaltou-se como mecanismo inibitório a interferência em íons Zn^{+2} da célula bacteriana, tornando-a mais suscetível a ação dos antibióticos.

Os estudos em que a desferroxamina não demonstrou atividade antimicrobiana relevante foram justificados pela habilidade do micro-organismo em desenvolver mecanismos para adquirir ferro de quelantes exógenos. Nestes casos, a desferroxamina pode ter rapidamente disponibilizado o ferro aos micro-organismos, via receptores de sideróforos cognatos, aumentando o ferro intracelular e favorecendo o crescimento microbiano (HOLBEIN; ORDUÑA, 2010; THOMPSON et al., 2012; LAI et al., 2016; GOKARN; PAL, 2018).

Neste contexto, estratégias de liberação seletiva de substâncias biocidas via sideróforos têm sido apresentadas por alguns autores, com o objetivo de contornar a barreira de permeabilidade imposta pela célula microbiana. Este conceito, denominado “Cavalo de Tróia”, envolve o reconhecimento do sideróforo por receptores específicos de membrana, facilitando a entrada do agente na célula-alvo (KLINE et al., 2000; FARDEAU et al., 2011; MATTOS et al., 2013; PAGE, 2013; GÓRSKA; SLODERBACH; MARSZATT, 2014).

Segundo Huayhuaz et al. (2017), a atividade antimicrobiana da desferroxamina foi potencializada pela ligação da molécula à cafeína, obtendo-se assim um derivado mais permeável e mais tóxico às células. Neste caso, a inserção de uma fração lipossolúvel aumentou a capacidade da desferroxamina em afetar a homeostase dos íons e ainda de promover a liberação citosólica de agentes tóxicos por ela carregados, tais como alumínio e gálio.

O desenvolvimento e a síntese de novos quelantes antimicrobianos com altíssima afinidade e seletividade por ferro (III) visam impedir a absorção de ferro pelo micro-organismo, mediante mecanismos de competição com os sideróforos. As características físico-químicas do agente quelante são consideradas fatores-chave para aumentar o potencial antimicrobiano, tais como o baixo peso molecular e a elevada lipossolubilidade. Ainda assim,

ênfatiza-se que as estratégias de captação do ferro dependem muito da habilidade e da composição celular de cada espécie de micro-organismo (QIU et al., 2011; XU et al., 2011).

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial do mesilato de desferroxamina como candidato a agente adjuvante de formulações farmacêuticas e cosméticas, considerando-se aspectos físico-químicos e microbiológicos.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o mesilato de desferroxamina (DFO) como agente estabilizante e conservante de formulações farmacêuticas e cosméticas, conforme o modelo de estudo descrito a seguir:

- Avaliar a atividade antioxidante de sistemas adjuvantes constituídos por diferentes combinações de DFO, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e metabissulfito de sódio;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos diferentes sistemas adjuvantes, em associação ao metilparabeno;
- Avaliar a estabilidade química de soluções de ácido ascórbico a 5,0% (p/v), comparando os diferentes sistemas adjuvantes;
- Analisar os resultados com ferramentas estatísticas de otimização para estabelecer a composição de adjuvantes na solução de ácido ascórbico, de modo a atingir critérios desejáveis de qualidade físico-química e microbiológica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi previamente aprovado pelo Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz, cadastro CTC-IAL 28-I/2016.

O preparo das amostras e a avaliação da estabilidade química foram realizados no Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Medicamentos, do Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, do Instituto Adolfo Lutz, da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada no Laboratório de Química Bioinorgânica Ambiental e Metalofármacos, do Departamento de Química Fundamental, do Instituto de Química, da Universidade de São Paulo.

A avaliação da atividade antimicrobiana e a análise estatística dos dados foram realizadas no Laboratório de Controle Biológico de Qualidade de Medicamentos e Cosméticos, do Departamento de Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo.

4.1 Material utilizado no preparo das amostras

Os seguintes insumos foram empregados no preparo das amostras: ácido L-ascórbico (vitamina C; Roche, Basileia, Suíça), mesilato de desferroxamina (Cristália, São Paulo, Brasil), ácido etilenodiamino tetra-acético sal dissódico (Henrifarma, São Paulo, Brasil), metabissulfito de sódio (Volp, São Paulo, Brasil), metilparabeno (Henrifarma, São Paulo, Brasil), ácido metanoico (ácido fórmico; Merck, Darmstadt, Alemanha), dimetilsulfóxido (DMSO, Labsynth, São Paulo, Brasil), metanol (Vetec/Sigma-Aldrich, Rio de Janeiro, Brasil) e água ultrapura 18,2 mΩ (Elga-Veolia Purelab, High Wycombe, Inglaterra).

Utilizou-se balança analítica (Mettler Toledo AL204, Ohio, Estados Unidos), pipetador automático (Brand, Wertheim, Alemanha) e banho ultrassônico (Unique, São Paulo, Brasil).

4.2 Soluções de ácido ascórbico

Soluções aquosas de ácido ascórbico a 5,0% (p/v), ou 50,0 mg/mL, foram preparadas em meio acidificado utilizando-se diferentes combinações de desferroxamina, ácido etilenodiamino tetra-acético e metabissulfito como agentes adjuvantes. Concentrações usuais na prática magistral farmacêutica de 0,1% (p/v), ou 1,0 mg/mL, foram utilizadas para os ingredientes adjuvantes (PRISTA; ALVES; MORGADO, 1996; AQUINO; FELIPE, 2014).

No desenvolvimento das formulações adotou-se um planejamento fatorial fracionado (**Tabela 1**), contemplando a matriz de ensaio fatorial 3^3 , com as variáveis nas unidades originais e pontos centrais nas concentrações das variáveis (NETO, 2007).

Tabela 1 - Composição das soluções de ácido ascórbico 5,0% (p/v) segundo o ensaio fatorial 3^3 fracionado

Amostra	Concentração em % (p/v)			
	AA	EDTA	DFO	BS
A	5,00	---	---	---
B	5,00	0,10	---	---
C	5,00	0,10	---	0,10
D	5,00	---	0,10	---
E	5,00	---	0,10	0,10
F	5,00	0,10	0,10	---
G	5,00	---	---	0,10
H	5,00	0,10	0,10	0,10
BB	5,00	0,05	---	---
CC	5,00	0,05	---	0,05
DD	5,00	---	0,05	---
EE	5,00	---	0,05	0,05
FF	5,00	0,05	0,05	---
GG	5,00	---	---	0,05
HH	5,00	0,05	0,05	0,05

AA - ácido ascórbico (substância ativa); EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (quelante); DFO - desferroxamina (quelante); BS - metabissulfito (antioxidante); --- ausência

No preparo das soluções de ácido ascórbico 5,0% (p/v), as seguintes etapas foram executadas:

a) Preparo de 10 mL de soluções-estoque de cada adjuvante, 50 vezes concentradas. Para isto, pesou-se 500,0 mg do insumo em balança analítica e transferiu-se quantitativamente o pó para balão volumétrico, utilizando quantidade suficiente de água ultrapura. Os insumos foram solubilizados com auxílio de banho ultrassônico. Os balões foram avolumados com água ultrapura e as soluções foram homogeneizadas;

b) Preparo de 5 mL de soluções-estoque de cada adjuvante, 25 vezes concentradas, a fim de obter os pontos centrais. Para isto, as soluções anteriores foram diluídas com água ultrapura em balão volumétrico, na razão de dois;

c) Para cada composição pesou-se 2,50 g de ácido ascórbico e transferiu-se quantitativamente o pó para balões volumétricos de 50 mL protegidos da luz, utilizando quantidade suficiente de água ultrapura pH 3,5, acidificada com ácido metanoico (pHmetro Quimis, São Paulo, Brasil; soluções tampão de calibração Inorganic Venturis, Virgínia, Estados Unidos);

d) Conforme a necessidade da composição (vide **Tabela 1**), adicionou-se 1000 µL das soluções-estoque de adjuvantes (itens a e b) aos balões contendo o ácido ascórbico previamente solubilizado (item c), utilizando pipetador automático;

e) As composições finais foram avolumadas e homogeneizadas em água ultrapura acidificada, e então, fracionadas em tubos com tampa.

4.3 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

4.3.1 Preparo das amostras para a avaliação da atividade antioxidante

As amostras (**Tabela 2**) consistiram em soluções aquosas contendo diferentes combinações de desferroxamina, ácido etilenodiamino tetra-acético e metabissulfito, adotando-se um desenho experimental semelhante ao das soluções de ácido ascórbico (vide item 4.2). Como a relação molar entre EDTA e desferroxamina é um aspecto importante nesta avaliação, as concentrações dos insumos foram equalizadas e expressas em micromolar, sem a necessidade de pontos centrais. Concentrações reduzidas de ácido ascórbico foram adicionadas nas amostras, conforme preconizado no ensaio (item 4.3.2).

Tabela 2 – Desenho experimental da composição das amostras para a avaliação da atividade antioxidante

Amostra	Composição (μM)			
	EDTA	DFO	BS	AA
A	---	---	---	40,0
B	2,7	---	---	40,0
C	2,7	---	5,3	40,0
D	---	2,7	---	40,0
E	---	2,7	5,3	40,0
F	2,7	2,7	---	40,0
G	---	---	5,3	40,0
H	2,7	2,7	5,3	40,0

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (quelante) 2,7 μM ou 0,10% (p/v); DFO - desferroxamina (quelante) 2,7 μM ou 0,18% (p/v); BS - metabissulfito (antioxidante) 5,3 μM ou 0,10% (p/v); AA - ácido ascórbico 40,0 μM ou 0,70% (p/v); --- ausência

Em teoria, para atingir concentrações equimolares dos quelantes foi necessário utilizar uma concentração em porcentagem peso/volume aproximadamente 1,8 vezes maior de desferroxamina em comparação ao

EDTA (**Tabela 3**). Desse modo, a concentração de desferroxamina foi ajustada para 0,18% (p/v), tornando-se equimolar ao EDTA 0,10% (p/v).

Tabela 3 – Concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético e mesilato de desferroxamina em porcentagem peso/volume e em milimolar

EDTA dissódico			DFO		
g/mol	% (p/v)	mM	g/mol	% (p/v)	mM
372,240	0,037	1,000	656,790	0,050	0,760
	0,050	1,345		0,066	1,000
	0,100	2,690		0,100	1,520

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético; DFO - mesilato de desferroxamina; g/mol – massa molar; % (p/v) - porcentagem peso/volume (g/100 mL); mM - concentração em milimolar

Na prática, as amostras (vide **Tabela 2**) foram preparadas em concentração 1000 vezes maior (milimolar; mM), devido à diluição seriada prevista no protocolo experimental (item 4.3.2). As seguintes etapas de preparo foram executadas:

a) Soluções-estoque de EDTA, metabissulfito ou desferroxamina foram preparadas em água ultrapura, na concentração de 25,0 mg/mL (vide item 4.2 b). Conforme a necessidade da composição (vide **Tabela 2**), adicionou-se com o pipetador automático 200 µL de solução-estoque de EDTA, 200 µL de metabissulfito e 360 µL de desferroxamina para balão volumétrico de 5 mL;

b) Preparo de 25 mL de uma solução-estoque de ácido ascórbico em concentração aproximada de 18,0 mg/mL. Para isto, pesou-se cerca de 446,0 mg do ácido ascórbico em balança analítica e transferiu-se quantitativamente o pó para balão volumétrico, utilizando quantidade suficiente de água ultrapura pH 3,5, acidificada com ácido metanoico (pHmetro 905 Titrand/iEcotrode plus, Metrohm, Herisau, Suíça; soluções tampão de calibração Inorganic Venturis,

Virgínia, Estados Unidos). A solução-estoque foi avolumada e homogeneizada em água ultrapura acidificada;

c) Com pipetador automático adicionou-se 2000 μL de solução-estoque de ácido ascórbico em todas as composições do item a;

d) As composições finais foram avolumadas e homogeneizadas em água ultrapura acidificada, e então, fracionadas em microtubos. As amostras foram mantidas no congelador até o momento do ensaio.

4.3.2 Ensaio de atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante foi avaliada de acordo com Esposito et al. (2003). O método consiste na reação de oxidação do ácido ascórbico catalisada por metais adicionados ao meio, gerando radicais livres que oxidam a sonda não fluorescente dihidrorodamina (DHR) à rodamina fluorescente. Na presença de agentes quelantes e antioxidantes espera-se que a oxidação seja evitada, levando a um decaimento na emissão da fluorescência.

O complexo metálico redox-ativo nitrilotriacetato férrico (Fe/NTA) foi obtido na concentração de 10,0 mM (relação molar 1: 1 metal/ligante) pela reação entre ácido nitrilotriacético e sulfato ferroso amoniacal (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos), de acordo com o procedimento descrito (ESPOSITO et al., 2003). Um coquetel fluorogênico contendo DHR 50,0 μM (Biotium, Fremont, Estados Unidos) e ácido ascórbico 40,0 μM (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) foi preparado em solução tampão HBS pH 7,4 (Hepes Buffer Solution - HEPES 20,0 mM, cloreto de sódio 150,0 mM). A solução tampão foi previamente tratada em resina Chelex-100 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) para eliminar traços de ferro.

As amostras foram testadas em duplicata empregando-se microplaca de 96 poços, com adição de ferro, sem adição de ferro (controle do ensaio) e utilizando água ultrapura como branco (a mesma utilizada no preparo das amostras). Após a adição do complexo de ferro nas amostras-estoque (2,0 mM/poço), procedeu-se à diluição seriada, 1000 vezes na razão de 10. As

primeiras diluições foram realizadas em água ultrapura e a última diluição foi realizada no coquetel fluorogênico.

Empregou-se um leitor de microplacas de fluorescência (BMG FluoStar Optima, BMG Labtech, Alemanha), com filtros de excitação/emissão em 485/520 nm. Curvas cinéticas foram registradas a cada 2 minutos por 60 minutos, a 37 °C, selecionando-se 1250 como parâmetro de ganho de intensidade. Os valores de inclinação das curvas (fluorescência/minuto) foram utilizados para a avaliação da taxa de oxidação da DHR.

4.4 Avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes

4.4.1 Preparo das amostras para a avaliação da atividade antimicrobiana

As amostras consistiram em soluções aquosas contendo diferentes combinações de desferroxamina, ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e metilparabeno (**Tabela 4**), testados na concentração máxima de 0,1% (p/v). Adotou-se um planejamento fatorial, contemplando a matriz de ensaio fatorial 2³, com as variáveis nas unidades originais e pontos centrais em triplicata na concentração das variáveis (NETO, 2007).

Tabela 4 - Composição das amostras segundo o ensaio fatorial 2³ com pontos centrais, para a avaliação da atividade antimicrobiana

Amostra	Concentração em % (p/v)			
	EDTA	DFO	BS	MP
A	0,10	---	---	---
B	---	0,10	---	---
C	0,10	---	0,10	---
D	0,10	---	---	0,10
E	0,10	---	0,10	0,10
F	---	0,10	0,10	---
G	---	0,10	---	0,10
H	---	0,10	0,10	0,10
I1	0,05	---	0,05	0,05
I2	0,05	---	0,05	0,05
I3	0,05	---	0,05	0,05
J1	---	0,05	0,05	0,05
J2	---	0,05	0,05	0,05
J3	---	0,05	0,05	0,05

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (quelante); DFO - desferroxamina (quelante); BS - metabissulfito (antioxidante); MP - metilparabeno (conservante); --- ausência

Na prática, as amostras (vide **Tabela 4**) foram preparadas em concentração 10 vezes maior (10,0 e 5,0 mg/mL), devido ao procedimento de diluição no meio líquido previsto no protocolo experimental (item 4.4.4). As seguintes etapas de preparo foram executadas:

a) Preparo de 5 mL de soluções-estoque de cada adjuvante, 50 vezes concentradas. Para isto, pesou-se 250,0 mg do insumo em balança analítica e transferiu-se quantitativamente o pó para balão volumétrico, utilizando quantidade suficiente de diluente;

b) Para a solubilização do metilparabeno empregou-se como diluente uma mistura 50: 50 em % (v/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol e para os demais insumos, água ultrapura. Todos os insumos foram solubilizados com auxílio de banho ultrassônico. Os balões foram avolumados com o diluente e as soluções finais foram homogeneizadas;

c) Preparo de 5 mL de soluções-estoque de cada adjuvante, 25 vezes concentradas, a fim de obter os pontos centrais. Para isto, pesou-se em balança analítica três réplicas verdadeiras de 125,0 mg de cada insumo e transferiu-se quantitativamente o pó para balão volumétrico, utilizando quantidade suficiente de diluente. Para a solubilização dos insumos procedeu-se como descrito anteriormente (item b);

d) Conforme a necessidade da composição (vide **Tabela 4**), adicionou-se com pipetador automático 1000 µL das soluções-estoque (itens a e c) a balões de 5 mL. No caso dos pontos centrais, empregou-se uma réplica diferente de solução-estoque em cada composição;

e) As composições finais foram avolumadas e homogeneizadas em água ultrapura e então filtradas para microtubos, utilizando filtro de seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 µm (Merck Millipore, Burlington, Estados Unidos). As amostras foram mantidas refrigeradas até o momento do ensaio.

4.4.2 Cepas microbianas e meios de cultura

Foram empregadas cepas padrão rastreáveis para culturas de referência da *American Type Culture Collection* (ATCC). Os micro-organismos testados compreenderam bactérias e fungos relacionados com a contaminação e deterioração de formulações farmacêuticas e cosméticas, com base nos testes de segurança descritos nos compêndios oficiais de farmácia (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017; GIORGIO et al., 2018).

Os ensaios foram conduzidos com as bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (cocos gram-positivo), *Escherichia coli* ATCC 8739 (bacilo gram-negativo), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (bacilo gram-negativo) e com a levedura *Candida albicans* ATCC 10231, provenientes da Coleção de Culturas do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil), e também com o fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (Microbiologics Lab-Elite, St Cloud, Estados Unidos).

As cepas liofilizadas foram reativadas em meio líquido enriquecido e cultivadas em meio sólido. Para as bactérias utilizou-se caldo e ágar caseína-soja e para os fungos, caldo e ágar Sabouraud dextrose (BD Difco, Franklin Lakes, Estados Unidos). As condições de incubação foram de 37 °C por 24 horas para as bactérias, 25 °C por 48 horas para *C. albicans* e 25 °C por 5 dias para *A. brasiliensis*.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados com técnicas assépticas e com materiais estéreis ou submetidos à esterilização por calor seco ou úmido.

4.4.3 Preparo das soluções-controle do ensaio de atividade antimicrobiana

A fim de verificar a sensibilidade das cepas microbianas, soluções de antibiótico foram testadas como controles positivos. Para *S. aureus* e *E. coli* utilizou-se o cloranfenicol (U.S. Pharmacopeia, Rockville, Estados Unidos), para *P. aeruginosa*, a amicacina (Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) e para *C. albicans* e *A. brasiliensis*, a nistatina (U.S. Pharmacopeia, Rockville, Estados Unidos).

As soluções-estoque de antibiótico foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL. Para isto, pesou-se 5,0 mg do insumo em balança analítica e transferiu-se quantitativamente o pó para balão volumétrico de 5 mL, utilizando quantidade suficiente de diluente. A solubilização do cloranfenicol e da amicacina foi realizada em água ultrapura, enquanto a solubilização da nistatina em uma mistura 50: 50 em % (v/v) de dimetilsulfóxido e metanol, com auxílio de banho ultrassônico.

A recuperação da carga microbiana frente aos diluentes utilizados nos controles positivos e nas amostras (vide item 4.4.1) foi verificada, sendo estes considerados como controles negativos do ensaio. Desse modo, os seguintes diluentes foram testados: água ultrapura (utilizada nas amostras sem metilparabeno e nas soluções de cloranfenicol e amicacina); mistura 10: 10: 80

em % (v/v) de DMSO/metanol/água (utilizada nas amostras com metilparabeno) e mistura 50: 50 em % (v/v) de DMSO/metanol (utilizada na solução de nistatina).

Todas as soluções-controle (positivo e negativo) foram filtradas para microtubos, utilizando filtro de seringa com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,22 μm (Merck Millipore, Burlington, Estados Unidos) e mantidas refrigeradas até o momento do ensaio.

4.4.4 Ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de diluição em meios líquidos, utilizando microplacas de 96 poços (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003).

Após a reativação e o cultivo das bactérias ou da levedura em placas de Petri contendo meio sólido (vide item 4.4.2), uma pequena quantidade de massa celular foi ressuspensa em um tubo com solução estéril de cloreto de sódio (Labsynth, São Paulo, Brasil) a 0,9% (p/v).

A turbidez das suspensões microbianas foi ajustada para 0,5 na escala Mc Farland, o que corresponde a 10^9 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Diluições seriadas das suspensões foram realizadas em solução salina, sendo a última diluição realizada em meio líquido, de modo a obter inóculo na concentração de 10^5 a 10^6 UFC/mL para as bactérias e de 10^4 a 10^5 UFC/mL para a levedura.

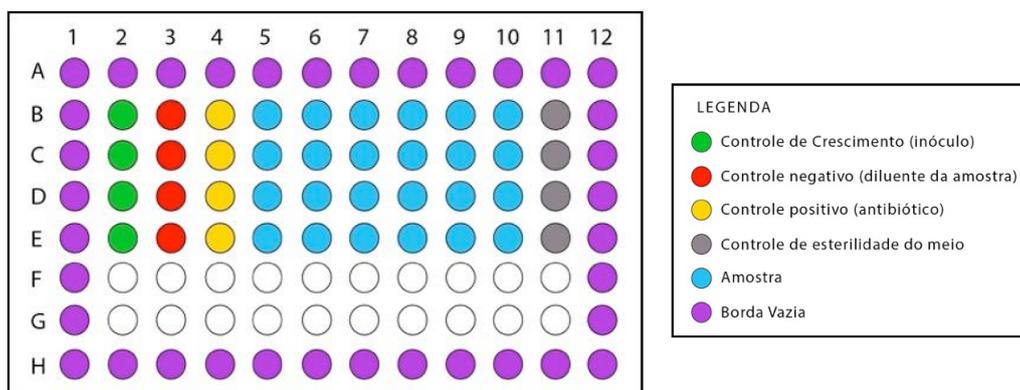
Após a reativação de *A. brasiliensis* (vide item 4.4.2), o cultivo foi realizado em tubos com ágar inclinado. Os tubos foram incubados até a esporulação e a massa celular foi recolhida com uma solução estéril de cloreto de sódio a 0,9% (p/v) contendo 0,5% (v/v) de polissorbato 80 (Labsynth, São Paulo, Brasil).

A suspensão de *A. brasiliensis* foi diluída seis vezes na razão de 10 e a carga microbiana foi determinada por contagem em placas, em duplicata, pela técnica de semeadura por espalhamento em superfície. O inóculo final foi então

preparado no meio de cultura líquido na concentração de 10^4 a 10^5 UFC/mL.

Os ensaios foram conduzidos com os inóculos padronizados, conforme o esquema mostrado na **Figura 7**.

Figura 7 – Esquema do ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*



Em cada ensaio, 20 μ L de amostra foram adicionados a 180 μ L do inóculo (200,0 μ g/poço), assim como 20 μ L de solução de antibiótico (controle positivo) foi adicionado a 180 μ L do inóculo (20,0 μ g/poço). Os diluentes (controles negativos) foram avaliados da mesma maneira que as amostras e controles positivos. Todas as amostras e controles foram testados no mínimo em quadruplicata.

Réplicas de 200 μ L de inóculo ou meio líquido (ausência do micro-organismo) foram incluídas na microplaca para monitorar o crescimento microbiano ou a esterilidade do meio. Além disso, a interferência das amostras na cor do meio líquido foi avaliada como branco das amostras (180 μ L de meio líquido e 20 μ L de água).

Para cada ensaio, a viabilidade do inóculo foi confirmada por contagem em placas, em duplicata, realizando-se a diluição do inóculo em solução salina ou meio líquido e semeadura por espalhamento em superfície. Foram empregados os meios de cultura e as condições de incubação descritos no item 4.4.2.

As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas nos ensaios com bactérias e a 25 °C por 48 horas nos ensaios com fungos. Após incubação, o crescimento microbiano foi avaliado em leitor de microplaca de absorvância (Synergy HT Biotek, Winooski, Estados Unidos), no comprimento de onda de 630 nm.

No caso do *A. brasiliensis*, além de uma leitura após 48 horas, a esporulação do fungo foi monitorada qualitativamente, por inspeção visual da turvação do meio, durante 5 dias de incubação. Como o padrão de resposta foi mantido, os valores obtidos na leitura após 48 horas foram adotados no estudo.

A porcentagem de inibição do crescimento microbiano foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - [(A_a / A_i) \times 100], \text{ onde:}$$

A_a = Absorvância da amostra

A_i = Absorvância do inóculo

4.5 Avaliação da estabilidade química das soluções de ácido ascórbico

A estabilidade química das formulações foi avaliada com base em diretrizes para a realização de estudos de estabilidade acelerada de formulações cosméticas. Os estudos de estabilidade são procedimentos exigidos no ato da regularização de produtos, pois fornecem dados sobre o comportamento das formulações frente a condições ambientais a que possam estar sujeitas até o término do prazo de validade (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

Logo após o preparo (vide item 4.2), as soluções de ácido ascórbico foram fracionadas em tubos de polipropileno de capacidade de 5,0 mL, fundo cônico e tampa, devidamente identificados. Os tubos foram apoiados em estantes para tubos de ensaio, distribuindo-se as alíquotas igualmente em dois grupos.

Um grupo foi mantido em cima de uma bancada de mármore situada em uma pequena sala fechada, com iluminação artificial intermitente, simulando o que ocorre em um ambiente comum e não controlado. A temperatura da sala foi registrada durante o dia, com intervalo de aproximadamente 6 horas, sendo um registro no meio da manhã e outro no início da tarde. O outro grupo de amostras foi armazenado em uma estufa a temperatura constante de 40 ± 1 °C (Binder ED115, Tuttlingen, Alemanha).

As amostras foram avaliadas quanto ao aspecto visual e teor de ácido ascórbico logo após a manipulação das formulações (tempo zero) e em intervalos de tempo definidos no decorrer do experimento (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Intervalos de tempo de avaliação das soluções de ácido ascórbico

Condição	Tempo (dias)										
	0	1	2	7	14	28	42	---	56	70	84
Bancada	0	1	2	7	14	28	42	---	56	70	84
Estufa a 40 °C	0	1	2	7	14	28	42	49	56	---	---

--- intervalo de tempo não avaliado

4.5.1 Ensaio de teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado por análise volumétrica, fundamentada na reação de oxidação do ácido ascórbico pelo iodato de potássio, em meio ácido (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Empregou-se um sistema de titulação automática (905 Titrand, Metrohm, Herisau, Suíça) equipado com uma unidade de dosagem de 10 mL (807 Dosing), um dispositivo certificado de dosagem do titulante (800 Dosino), um eletrodo de platina (iAg-Titrode) e módulo de agitação com barra magnética (803 TI Stand), sendo todo o sistema controlado pelo software Tiamo versão 2.3-98.

O titulante consistiu em uma solução volumétrica de iodato de potássio 0,02 M. No seu preparo, empregou-se um padrão primário de iodato de

potássio (teor de 99,4-100,4%, Dinâmica, São Paulo, Brasil), previamente submetido à secagem por 1 hora em estufa a 110 ± 1 °C (WTB Binder ED115, Tuttlingen, Alemanha).

O volume de reação foi preparado em um béquer, com aproximadamente 40,0 mL de água ultrapura e 10,0 mL de solução de ácido sulfúrico (Labsynth, São Paulo, Brasil) a 20% (v/v). Adicionou-se com pipetador automático 1000 µL da amostra (equivalente a 50,0 mg de ácido ascórbico e 1,0 mg ou 0,5 mg de cada adjuvante presente) e 1000 µL de solução de iodeto de potássio (teor $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Missouri, Estados Unidos) a 10% (p/v).

O ponto final da reação consistiu no potencial em milivolt (mV) referente ao ponto de equivalência da reação de óxido-redução na superfície de metal do eletrodo. O teor de ácido ascórbico foi calculado pela fórmula a seguir:

Teor de ácido ascórbico (mg/mL) = $V \times F/P$, onde:

V = volume em mL de iodato de potássio 0,02 M gasto na titulação

F = 8,806 (fator obtido da relação estequiométrica, sendo 1,0 mL de iodato de potássio 0,02 M = 8,806 mg de ácido ascórbico)

P = volume em mL da amostra

Foi realizada uma avaliação inicial do teor de ácido ascórbico na matéria-prima, em comparação com uma substância química de referência (ácido L-ascórbico, teor de 99,4%, TCI Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japão) e também em comparação com uma amostra de referência de solução oral de ácido ascórbico disponível no mercado (Cebion[®] gotas, teor declarado de 200 mg/mL, Merck S/A, Rio de Janeiro, Brasil).

As soluções do padrão e da matéria-prima foram preparadas na concentração de 50,0 mg/mL e a amostra de referência foi diluída em balão volumétrico na concentração teórica de 40 mg/mL. Utilizou-se como diluente água ultrapura pH 3,5, acidificada com ácido metanoico. Adotou-se como critério de aceitação teor de 90,0 a 110,0% de ácido ascórbico, de acordo com o preconizado em compêndios oficiais de farmácia (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

4.5.2 Verificação do método de quantificação de ácido ascórbico

O método de titulação potenciométrica para a determinação de ácido ascórbico nas amostras foi submetido a um protocolo de validação (BRASIL, 2017). Soluções de ácido ascórbico (matéria-prima) foram preparadas em água ultrapura acidificada para a avaliação dos parâmetros de seletividade, precisão, exatidão e linearidade, como descrito a seguir:

a) Seletividade:

A recuperação do analito foi avaliada adotando-se como critério de aceitação o teor de 90,0 a 110,0%, com base na especificação farmacopeica de teor de ácido ascórbico em comprimidos e solução injetável (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). A interferência dos adjuvantes na medição da concentração do ácido ascórbico foi verificada em duas etapas.

Na primeira etapa foram preparadas soluções do analito contendo diferentes combinações dos adjuvantes (**Tabela 6**). Foram testadas concentrações 10 vezes menores de ácido ascórbico e 10 vezes maiores de cada adjuvante (amostras 1 a 8) em relação à composição adotada como modelo de estudo (vide item 4.2). Outras variações na concentração das amostras contendo metabissulfito foram realizadas (amostras 9 e 10). Para tais avaliações, empregou-se solução titulante de iodato de potássio 10 vezes diluída, isto é, 0,002 M, devido à concentração de trabalho do ácido ascórbico.

Tabela 6 - Amostras para a avaliação da seletividade do método volumétrico de teor de ácido ascórbico

Amostra	Concentração (mg/mL)			
	AA	EDTA	BS	DFO
1	5,0	---	---	---
2	5,0	10,0	---	---
3	5,0	10,0	10,0	---
4	5,0	---	---	10,0
5	5,0	---	10,0	10,0
6	5,0	10,0	---	10,0
7	5,0	10,0	10,0	10,0
8	5,0	---	10,0	---
9	5,0	---	5,0	---
10	10,0	---	5,0	---

AA - ácido ascórbico (substância ativa); EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (quelante); DFO - desferroxamina (quelante); BS - metabissulfito (antioxidante); --- ausência

Na segunda etapa, a avaliação da seletividade do método foi direcionada para a presença do metabissulfito, já que este insumo é uma substância antioxidante, à semelhança do ácido ascórbico. Foram preparadas soluções de ácido ascórbico a 100% da concentração teste (50,0 mg/mL), variando-se as concentrações de metabissulfito (1,0 mg/mL) para níveis superiores e inferiores aos da composição modelo (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Amostras para a avaliação da seletividade do método volumétrico de teor de ácido ascórbico em relação ao metabissulfito

Amostra	Concentração (mg/mL)	
	AA	BS
1	50,00	50,00
2	50,00	25,00
3	50,00	10,00
4	50,00	5,00
5	50,00	1,00
6	50,00	0,50
7	50,00	0,25
8	50,00	---

AA - ácido ascórbico (substância ativa); BS - metabissulfito (antioxidante); --- ausência

b) Precisão:

O valor de dispersão dos resultados foi avaliado quanto à repetibilidade do método, procedendo-se a nove determinações do teor de ácido ascórbico de uma solução a 100% da concentração teste (50,0 mg/mL), no mesmo dia, pelo mesmo analista e com o mesmo equipamento. Realizou-se a leitura sequencial de uma mesma solução, a fim de melhor representar o estudo de estabilidade, o qual consiste em ensaiar uma mesma amostra no decorrer do tempo. Adotou-se como critério de aceitação o desvio-padrão relativo (RSD) menor que 5,0%.

c) Exatidão:

A concordância dos resultados individuais em relação ao valor aceito como verdadeiro (100%) foi avaliado como a média das porcentagens de recuperação do analito em relação à concentração teórica (50,0 mg/mL) e pelo valor de RSD, partindo-se dos resultados obtidos no ensaio de precisão.

Adotou-se como critério de aceitação uma faixa estreita de recuperação, de 98,0 a 102,0% e RSD menor que 5,0%.

d) Linearidade:

A capacidade do método em oferecer respostas diretamente proporcionais à concentração do analito em toda a faixa estabelecida para o procedimento analítico foi avaliada pela obtenção de uma curva de calibração de cinco pontos, em triplicata, utilizando soluções de ácido ascórbico nas concentrações de 30,0; 40,0; 50,0; 60,0 e 70,0 mg/mL. A correlação linear entre as variáveis foi determinada pelo coeficiente de determinação (R^2), adotando-se como critério de aceitação um valor maior que 0,99. Nos testes estatísticos foi utilizado nível de significância de 5,0%.

4.5.3 Ensaio complementar de identificação de ácido ascórbico

A identidade da matéria-prima de ácido ascórbico foi verificada em comparação com uma amostra de referência de solução oral de ácido ascórbico disponível no mercado (Cebion[®] gotas, teor declarado de 200 mg/mL, Merck S/A, Rio de Janeiro, Brasil). A análise foi conduzida de acordo com Khan et al. (2012), utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com detector de arranjo de diodos (Waters, Milford, Estados Unidos).

Empregou-se como fase estacionária uma coluna analítica octadecilsilano (ODS/C18) de 4,60 x 150 mm, 5 μ m (Waters Spherisorb ODS2, Waters, Milford, Estados Unidos), a 25 ± 2 °C. A fase móvel foi composta de água ultrapura acidificada com ácido metanoico a pH 3,5 e acetonitrila grau HPLC (Loba Chemie, Mumbai, Índia), na proporção de 75: 25. A fase móvel foi submetida à filtração em bomba de vácuo (Goldsun, São Paulo, Brasil), através de uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) 0,45 μ m (Merck Millipore, Burlington, Estados Unidos). A fase móvel foi desaerada empregando-se agitador magnético (Fisatom, São Paulo, Brasil) por 10 minutos

e ultrassom (Unique, São Paulo, Brasil) por 15 minutos. Utilizou-se volume de injeção da amostra de 5 µL, modo isocrático de eluição, fluxo de 1 mL/minuto e detecção em 254 nm.

No preparo da amostra, o ácido ascórbico foi pesado e transferido quantitativamente para balão volumétrico, utilizando quantidade suficiente de água ultrapura. O pó foi solubilizado com auxílio de ultrassom e a solução foi avolumada e homogeneizada com água ultrapura pH 3,5, acidificada com ácido metanoico. A amostra de referência foi diluída na água acidificada, utilizando pipeta volumétrica. Ambas as soluções foram preparadas na concentração de 100,0 µg/mL e filtradas para frascos de cromatografia, utilizando filtro de seringa com membrana PVDF 0,45 µm (Merck Millipore, Burlington, Estados Unidos).

4.6 Análise estatística

Os resultados foram analisados por meio dos softwares Minitab Statistical Software versão 17 (Minitab Inc., Pensilvânia, Estados Unidos), GraphPad Prism versão 7.03 (GraphPad Software Inc., Califórnia, Estados Unidos) e Microsoft Office Excel versão 16.0 (Microsoft Corporation, Redmond, Estados Unidos). Adotou-se nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

A atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes da solução de ácido ascórbico foi avaliada segundo o método desenvolvido por Esposito et al. (2003). Este método foi concebido para mensurar ferro lábil em plasma de pacientes com sobrecarga de ferro, bem como a eficácia de agentes farmacológicos utilizados em terapias de quelação de ferro.

No presente trabalho adotou-se o princípio do método descrito (ESPOSITO et al., 2003), contaminando-se as amostras com um complexo de ferro (III) redox-ativo, nitrilotriacetato férrico (Fe/NTA), a fim de verificar a capacidade dos sistemas adjuvantes em bloquear a atividade pró-oxidante do ferro na reação de oxidação do ácido ascórbico.

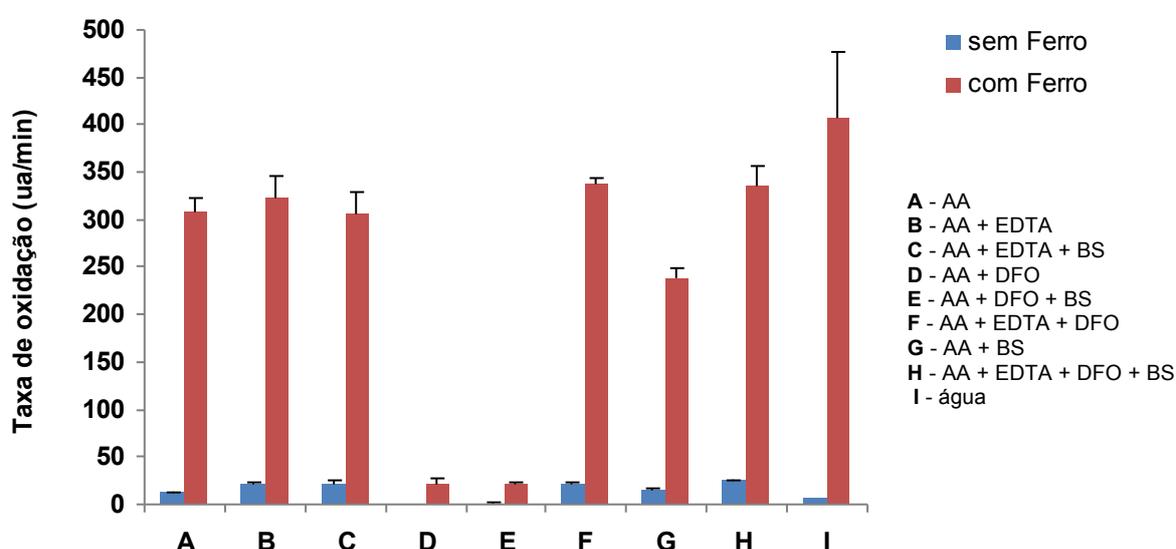
A relevância do ferro em processos redox do ácido ascórbico foi discutida por Fornaro e Coichev (1998), com ênfase em reações de oxidação em meio aquoso por complexos de ferro e reações envolvendo íons metálicos de transição ou oxigênio (auto-oxidação), catalisadas por íons ferro.

Conforme anteriormente discutido no item 2.1 da revisão da literatura, a remoção de impurezas metálicas é importante para evitar a oxidação de ingredientes e a degradação de formulações farmacêuticas e cosméticas. Tais impurezas podem originar-se de diversas fontes associadas ao processo produtivo e muitas vezes são de difícil eliminação. Além disso, elevadas concentrações de impurezas metálicas podem causar alterações organolépticas indesejáveis, como é o caso do ferro em meio aquoso (CHATURVEDI; DAVE, 2012; ABTURYN, 2013).

Os sideróforos, tais como a desferroxamina, possuem altíssima afinidade por ferro, o que os tornam agentes quelantes seletivos quando em competição com outros metais. O EDTA, por sua vez, também é um agente quelante capaz de formar complexos altamente estáveis com o ferro (AHMAD; RAO, 1997; HIDER; KONG, 2010).

As taxas de oxidação da sonda para as diferentes combinações de adjuvantes, na ausência e na presença de ferro, estão na **Figura 8**. De acordo com o método empregado, quanto maior a intensidade de fluorescência, maior a taxa de oxidação do sistema.

Figura 8 - Taxas de oxidação para os sistemas adjuvantes utilizados na estabilização química da solução de ácido ascórbico



AA - ácido ascórbico; EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético; BS - metabissulfito; DFO - desferroxamina; ua/min - intensidade de fluorescência por minuto

Segundo a **Figura 8**, as taxas de oxidação foram reduzidas na ausência de ferro, indicando que no ensaio não houve interferência das amostras e do branco da amostra (amostra I, água ultrapura). Na presença de ferro, as taxas de oxidação foram elevadas e comparáveis ao branco da amostra (amostra I contaminada com ferro), exceto para as amostras D (desferroxamina) e E (desferroxamina e metabissulfito).

Ainda em relação à **Figura 8**, verificou-se que as amostras D (desferroxamina) e E (desferroxamina e metabissulfito) apresentaram taxas de oxidação muito reduzidas e comparáveis à ausência de ferro. Além disso, observou-se nas microplacas o aparecimento de coloração marrom,

provavelmente devido à formação do complexo Fe/DFO. Entretanto, tais respostas não foram observadas nas amostras F (desferroxamina e EDTA) e H (desferroxamina, EDTA e metabissulfito).

A análise de regressão destes resultados foi realizada para prever a taxa de oxidação em função da concentração dos adjuvantes, corroborando com a discussão anteriormente apresentada.

A **Tabela 8** mostra a análise de variância e as particularidades do modelo estatístico obtido, incluindo os fatores mais representativos para a resposta (valor p).

Tabela 8 - Análise de variância para a regressão da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina

Fontes	Taxa de oxidação (ua/minuto)		
	g.l.	SQ	p-valor
Regressão	5	258870	0,000
X1	1	3536	0,009
X2	1	3770	0,008
X3	1	99757	0,000
X1*X3	1	74248	0,000
X2*X3	1	1834	0,043
Erro	10	3430	na
Falta de ajuste	2	1440	0,113
Erro puro	8	1990	na
Total	15	262300	na

X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético (μM); X2 - concentração de metabissulfito (μM); X3 - concentração de desferroxamina (μM); g.l. - graus de liberdade; SQ - soma dos quadrados; p-valor - significância do fator; na - não se aplica

A **Tabela 9** mostra o modelo estatístico do estudo, representado pela equação de regressão que prediz a taxa de oxidação, em função da concentração dos adjuvantes. Este modelo se mostrou bem ajustado (**Apêndice A**), com valores adequados de coeficientes de determinação (R^2) e alta qualidade no grau de predição (R^2 -pred).

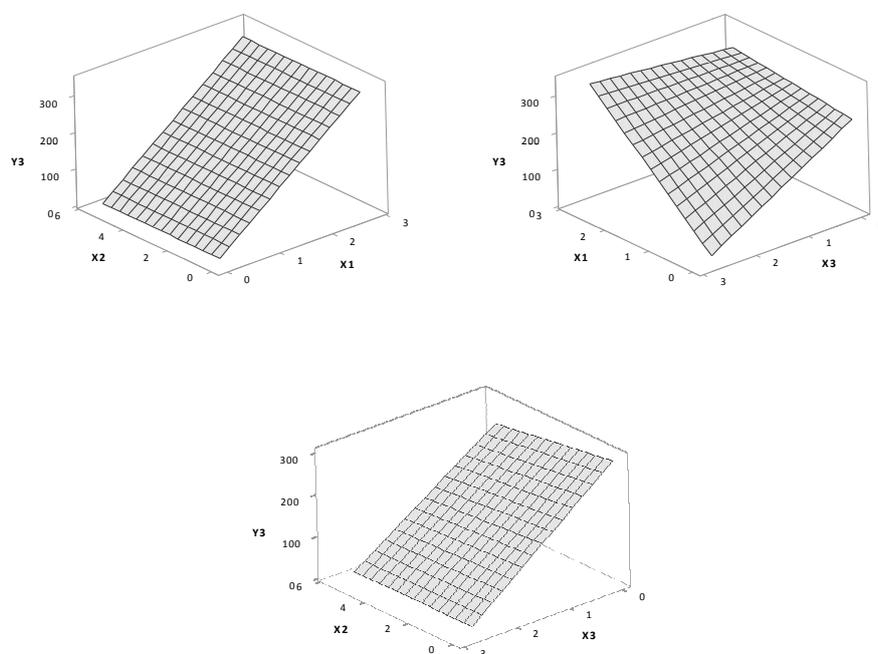
Tabela 9 - Equação de regressão e coeficientes de determinação para a atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina

Equação de regressão	R^2	R^2 -aj	R^2 -pred
$Y_3 = 294,9 + 15,57 X_1 - 8,19 X_2 - 101,31 X_3 + 37,38 X_1X_3 + 2,99 X_2X_3$	98,69	98,04	96,65

X_1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético (μM); X_2 - concentração de metabissulfito (μM); X_3 - concentração de desferroxamina (μM); Y_3 - taxa de oxidação (ua/minuto); R^2 - coeficiente de determinação (%); R^2 -aj - coeficiente de determinação ajustado (%); R^2 -pred - coeficiente de determinação de predição (%)

A partir do modelo estatístico foram obtidos gráficos tridimensionais de superfície de resposta, revelando o desempenho dos agentes adjuvantes na atividade antioxidante e a presença de interações (**Figura 9**).

Figura 9 - Superfície de resposta para a atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilendiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina



X1 - concentração de ácido etilendiamino tetra-acético (μM); X2 - concentração de metabissulfito (μM); X3 - concentração de desferroxamina (μM); Y3 - taxa de oxidação (ua/minuto); valores fixados em X1 = 0; X2 = 5,3 e X3 = 2,7, quando ausentes

De acordo com a **Figura 9**, reduzidas taxas de oxidação (Y3) foram observadas para concentrações crescentes de desferroxamina. Foi detectada interação com metabissulfito (**Apêndice B**), mas este fator praticamente não interferiu na resposta da desferroxamina (X2; X3). Por outro lado, elevadas taxas de oxidação foram observadas para concentrações crescentes de EDTA, sendo que a associação do metabissulfito não interferiu na resposta (X1; X2). Verificou-se uma resposta antagônica entre desferroxamina e EDTA (X1; X3) e interação entre estes fatores (**Apêndice B**).

Desse modo, constatou-se que a desferroxamina apresentou melhor performance do que o EDTA. Segundo a literatura, quanto menor o acesso de hidrogênio e peróxido de hidrogênio ao ferro complexado, menor o potencial redox e a produção de radicais livres em condições fisiológicas. Um potencial

redox menor que -400 mV é considerado altamente negativo, garantindo que o complexo de ferro (III) não sofra oxirredução e, portanto, não gere radicais livres prejudiciais em um ambiente aeróbico. Enquanto o potencial redox da desferroxamina é de -468 mV, o potencial redox do EDTA é de -110 mV, sendo este último mais suscetível à atividade redox (HIDER; KONG, 2010; HIDER, 2014).

Além disso, a estabilidade relativa dos complexos formados com o ferro e a influência do pH do meio são fatores que podem explicar os resultados observados para os diferentes sistemas adjuvantes.

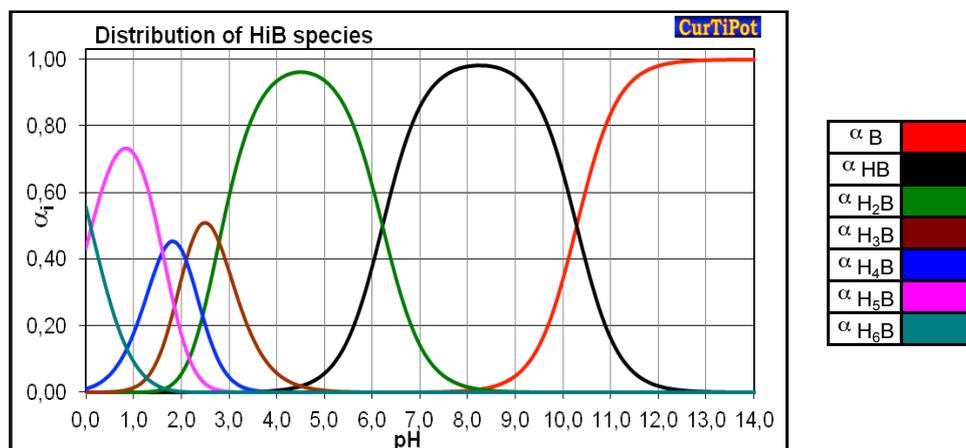
O complexo de ferro e ácido nitrilotriacético (NTA) preconizado no método (vide item 4.3.2) possui estabilidade menor em relação ao complexo de ferro e EDTA, sendo as constantes de formação ($\log K_f$) de 15,87 e 25,10 respectivamente. No caso da desferroxamina, o complexo com ferro é ainda mais estável e apresenta constante de formação ($\log K_f$) de 30,60 (MARTELL et al., 1996; IHNAT; VENNERSTROM; ROBINSON, 2002).

Uma vez formados, os complexos de Fe/EDTA são menos estáveis em pH 7,0 ou superior e razoavelmente estáveis na faixa ácida (3,6 a 5,6), enquanto que os complexos de Fe/DFO são muito estáveis em condições fisiológicas (AHMAD; RAO, 1997; IHNAT; VENNERSTROM; ROBINSON, 2002).

Entretanto, a incapacidade da desferroxamina em suprimir a atividade pró-oxidante do ferro quando na presença de EDTA (amostras F e H) pode ser compreendida por aspectos relacionados com a cinética de reação, ou seja, pela velocidade de formação do complexo nas condições do ensaio, as quais mimetizam o fisiológico, em meio tamponado pH 7,4 (vide item 4.3.2).

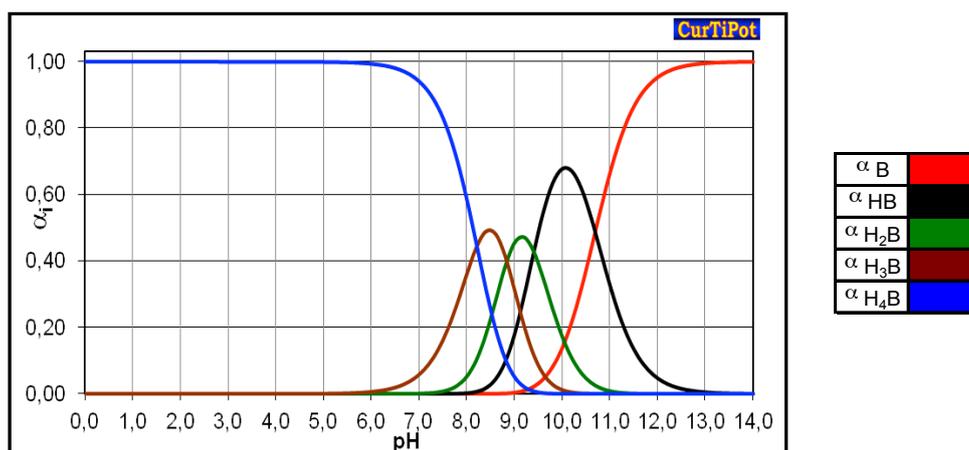
A **Figura 10** mostra que o EDTA está quase totalmente desprotonado no pH 7,4, predominando-se as espécies αHB , enquanto que a **Figura 11** mostra que cerca de 90,0% da desferroxamina ainda está totalmente protonada neste pH, predominando-se as espécies $\alpha\text{H}_4\text{B}$. Assim, nas condições do ensaio o EDTA provavelmente formará complexos com o ferro mais rápido que a desferroxamina.

Figura 10 - Curva de distribuição fracionária de espécies α_i em função do pH, para o ácido etilenodiamino tetra-acético



O EDTA pode ser protonado nos quatro carboxilatos e nas duas aminas e foi representado por H_6EDTA^{2+} . Curvas obtidas no programa CurTiPot. Fonte: GUTZ, I.G.R. CurTiPot - pH and Acid-Base Titration Curves: Analysis and Simulation software, version 4.2. Disponível em: http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html

Figura 11 - Curva de distribuição fracionária de espécies α_i em função do pH, para a desferroxamina



A desferroxamina pode ser protonada nos três hidroxamatos e na amina terminal. Foram utilizados quatro valores de pKa e a desferroxamina foi representada por H_4DFO^+ (IHNA⁺; VANNERSTROM; ROBINSON, 2002). Curvas obtidas no programa CurTiPot. Fonte: GUTZ, I.G.R. CurTiPot - pH and Acid-Base Titration Curves: Analysis and Simulation software, version 4.2. Disponível em: http://www.iq.usp.br/gutz/Curtipot_.html

Como o complexo Fe/EDTA é muito mais estável que Fe/NTA, isto faz com que a reação de complexação da desferroxamina com o ferro seja muito mais lenta. Desse modo, espera-se que quanto menor a concentração de EDTA, menor a interferência no desempenho da desferroxamina.

Os resultados provaram que a desferroxamina é capaz de bloquear a atividade pró-oxidante do ferro com eficácia muito superior ao EDTA, o que é relevante quando se trata de terapias farmacológicas de quelação. Constatou-se que a eficiência da desferroxamina diminui se o ferro pró-oxidante estiver na forma de um complexo significativamente estável, como Fe/EDTA, considerando-se concentrações equimolares de desferroxamina e EDTA.

Diante do exposto, este estudo mostrou que em meio contaminado com ferro a desferroxamina poderá ser altamente eficaz na estabilização química de formulações, independente da associação de metabissulfito. Adicionalmente destaca-se que o mesilato de desferroxamina é utilizado como fármaco desde longa data, logo, quanto aos aspectos toxicológicos esta molécula apresenta segurança comprovada.

5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes

As investigações descritas na literatura a respeito da atividade antimicrobiana *in vitro* da desferroxamina mostram que este agente pode atuar na inibição do crescimento microbiano, entretanto, as respostas inibitórias variam conforme a concentração da desferroxamina e a cepa microbiana desafiada. Além disso, os estudos diferem quanto às metodologias de avaliação da atividade antimicrobiana e por vezes utilizam estratégias para potencializar a atividade da molécula (vide item 2.3.1).

De acordo com Lai et al. (2016), o emprego de quelantes de ferro como agentes sinérgicos a agentes antimicrobianos deve ser explorado, especialmente diante dos desafios impostos pela resistência a antibióticos. Contudo, os autores destacam que a sinergia parece ser específica para cada

micro-organismo, podendo até mesmo ocorrer a promoção do crescimento ou a antagonização do antibiótico.

No presente trabalho buscou-se avaliar o efeito inibitório da desferroxamina associada a agentes estabilizantes e conservantes frequentemente utilizados em formulações farmacêuticas e cosméticas de base aquosa, desafiando-se cepas patogênicas relacionadas com a contaminação de produtos farmacêuticos e cosméticos.

Os agentes testados foram desferroxamina, EDTA, metabissulfito e metilparabeno, em diferentes associações. Empregou-se concentração máxima de 1000 µg/mL de cada agente, o que corresponde à concentração de 0,1% (p/v) em formulações magistrais.

A **Tabela 10** mostra os controles realizados na avaliação da atividade antimicrobiana, cujos resultados permitiram a validação dos ensaios. Valores elevados de absorbância do inóculo foram relativos ao crescimento microbiano de 100%. Valores reduzidos de absorbância do meio de cultura e do meio de cultura com amostra indicaram a esterilidade do meio e a não interferência da amostra na cor do meio. As cepas demonstraram sensibilidade ao antibiótico, com valores de inibição de 93,1 a 96,8%. Não houve interferência dos diluentes das amostras no crescimento microbiano, já que as porcentagens de recuperação de cada inóculo não diferiram de um fator de dois em relação ao controle de 100% (50 a 200%), obtendo-se valores de 55,7 a 120,7% (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

Tabela 10 – Crescimento microbiano em absorbância e porcentagem de recuperação dos micro-organismos nos ensaios de atividade antimicrobiana

Controle do ensaio	Micro-organismo				
	Sa	Ec	Pa	Ca	Ab
Inóculo (UA)	0,893	0,974	1,413	1,356	1,287
Meio de cultura (UA)	0,135	0,052	0,051	0,043	0,045
Meio de cultura + amostra (UA)	0,097	0,052	0,050	0,042	0,046
Sensibilidade ao antibiótico ^a (% de inibição)	93,137	94,762	96,071	96,810	94,192
Recuperação do inóculo em água (%)	80,560	92,338	102,389	99,111	98,427
Recuperação do inóculo em DMSO/metanol/água ^b (%)	66,471	120,737	100,336	95,571	92,502
Recuperação do inóculo em DMSO/metanol ^c (%)	---	---	---	61,612	55,659

Sa = *S. aureus* (ATCC 6538) $1,6 \times 10^5$ UFC/poço; Ec = *E. coli* (ATCC 8739) $1,0 \times 10^6$ UFC/poço; Pa = *P. aeruginosa* (ATCC 9027) $1,7 \times 10^5$ UFC/poço; Ca = *C. albicans* (ATCC 10231) $2,2 \times 10^4$ UFC/poço; Ab = *A. brasiliensis* (ATCC 16404) $1,3 \times 10^4$ UFC/poço; UA - unidades de absorbância; a) cloranfenicol 20,0 µg/poço (*S. aureus* e *E. coli*); amicacina 20,0 µg/poço (*P. aeruginosa*); nistatina 20,0 µg/poço (*C. albicans* e *A. brasiliensis*); b) 10: 10: 80 em % (v/v); c) 50: 50 em % (v/v); DMSO - dimetilsulfóxido; --- não se aplica

Por meio da ferramenta estatística, a análise de regressão dos resultados foi realizada para prever a porcentagem de inibição microbiana, em função da concentração dos adjuvantes. A **Tabela 11** mostra a análise de variância e as particularidades dos modelos estatísticos obtidos, incluindo os fatores mais representativos para as respostas (valor p).

Tabela 11 – Análise de variância para a regressão da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno

Fontes	Sa			Ec			Pa			Ca			Ab		
	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor
Regressão	7	55965,1	0,000	6	13289,4	0,000	6	105904	0,000	7	98499,2	0,000	5	25420,9	0,000
X1	---	---	---	1	210,2	0,000	1	10501	0,000	1	16157,4	0,000	---	---	---
X2	1	78,2	0,183	1	43,6	0,001	1	4	0,138	1	18,4	0,340	---	---	---
X3	1	18490,8	0,000	1	1136,4	0,000	1	65	0,000	1	22,9	0,288	1	170,6	0,000
X4	1	25,3	0,447	1	5114,3	0,000	1	3	0,243	1	0,6	0,862	1	298,8	0,000
X1 ²	---	---	---	---	---	---	1	11434	0,000	1	11066,2	0,000	---	---	---
X2 ²	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X3 ²	1	8618,1	0,000	1	839,7	0,000	---	---	---	---	---	---	1	399,4	0,000
X4 ²	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	1	101,1	0,000
X1 X2	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X1 X3	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X1 X4	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X2 X3	1	180,0	0,045	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
X2 X4	1	170,8	0,051	1	10,0	0,113	---	---	---	1	92,6	0,035	---	---	---
X3 X4	1	1002,1	0,000	---	---	---	1	3425	0,000	1	6701,9	0,000	1	6280,2	0,000
Erro	60	2584,6	na	62	240,8	na	62	114	na	60	1195,0	na	62	127,9	na
Falta de ajuste	2	165,0	0,148	3	6,5	0,654	3	3	0,712	2	78,2	0,141	4	1,5	0,950
Erro puro	58	2419,6	na	59	234,3	na	59	112	na	58	1116,9	na	58	126,3	na
Total	67	58279,8	na	68	13530,2	na	68	106019	na	67	99694,3	na	67	25548,8	na

X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Sa - % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538); Ec - % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739); Pa - % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027); Ca - % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231); Ab - % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404); g.l. - graus de liberdade; SQ - soma dos quadrados; p-valor - significância do fator; --- fatores não considerados no modelo estatístico; na – não se aplica

A **Tabela 12** mostra os modelos estatísticos do estudo, representados por equações de regressão que predizem as porcentagens de inibição de cada micro-organismo, em função da concentração dos adjuvantes. Todos os modelos se mostraram bem ajustados (**Apêndices C a G**), com valores adequados de coeficientes de determinação (R^2) e alta qualidade no grau de predição (R^2 -pred).

Tabela 12 – Equações de regressão e coeficientes de determinação para a atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno

Micro-organismo	Equação de regressão	R^2 (%)	R^2 -aj (%)	R^2 -pred (%)
<i>S. aureus</i>	$Y_4 = 92,90 - 48,7 X_2 - 1748,3 X_3 - 27,7 X_4 + 11253 X_3^2 - 861 X_2 X_3 + 839 X_2 X_4 + 2032 X_3 X_4$	95,57	95,05	93,83
<i>E. coli</i>	$Y_5 = 70,96 - 100,2 X_1 + 29,53 X_2 - 673,6 X_3 + 328,83 X_4 + 4623 X_3^2 - 203 X_2 X_4$	98,22	98,05	97,83
<i>P. aeruginosa</i>	$Y_6 = 9,654 + 2566,7 X_1 + 6,55 X_2 - 62,1 X_3 + 7,17 X_4 - 17058 X_1^2 + 3753,9 X_3 X_4$	99,89	99,88	99,87
<i>C. albicans</i>	$Y_7 = 5,86 + 2549,5 X_1 - 19,2 X_2 - 36,2 X_3 + 4,3 X_4 - 16826 X_1^2 + 625 X_2 X_4 + 5337 X_3 X_4$	98,80	98,66	98,39
<i>A. brasiliensis</i>	$Y_8 = 78,953 - 199,5 X_3 + 285,5 X_4 - 3197 X_3^2 - 1374 X_4^2 + 5166,3 X_3 X_4$	99,50	99,46	99,38

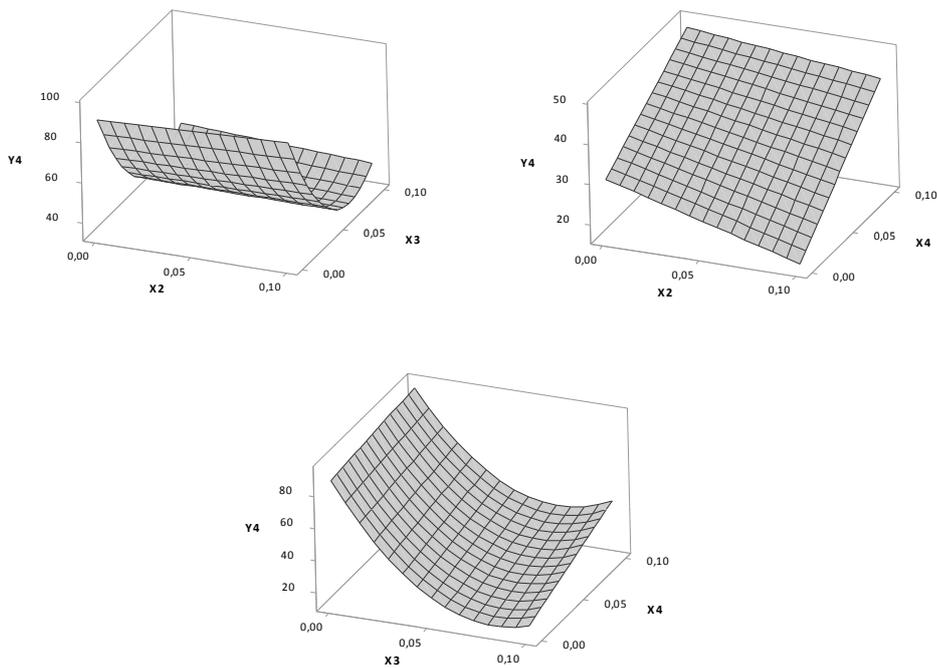
X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y4 - % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538); Y5 - % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739); Y6 - % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027); Y7 - % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231); Y8 - % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404); R^2 - coeficiente de determinação (%); R^2 -aj - coeficiente de determinação ajustado (%); R^2 -pred - coeficiente de determinação de predição (%)

A partir dos modelos estatísticos foram obtidos gráficos tridimensionais de superfície de resposta, revelando o desempenho dos agentes adjuvantes na inibição do crescimento microbiano e a presença de interações. Dentre todas

as associações apontadas pelos modelos (**Figuras 12 a 16**), as respostas mais relevantes para cada micro-organismo serão a seguir discutidas.

Em relação ao *Staphylococcus aureus* (Y4, **Figura 12**) foram observadas elevadas porcentagens de inibição deste micro-organismo para concentrações decrescentes de desferroxamina em associação ao metabissulfito (X2; X3) e para concentrações decrescentes de desferroxamina em associação ao metilparabeno (X3; X4), sendo detectada interação entre os fatores mencionados (**Apêndice H**).

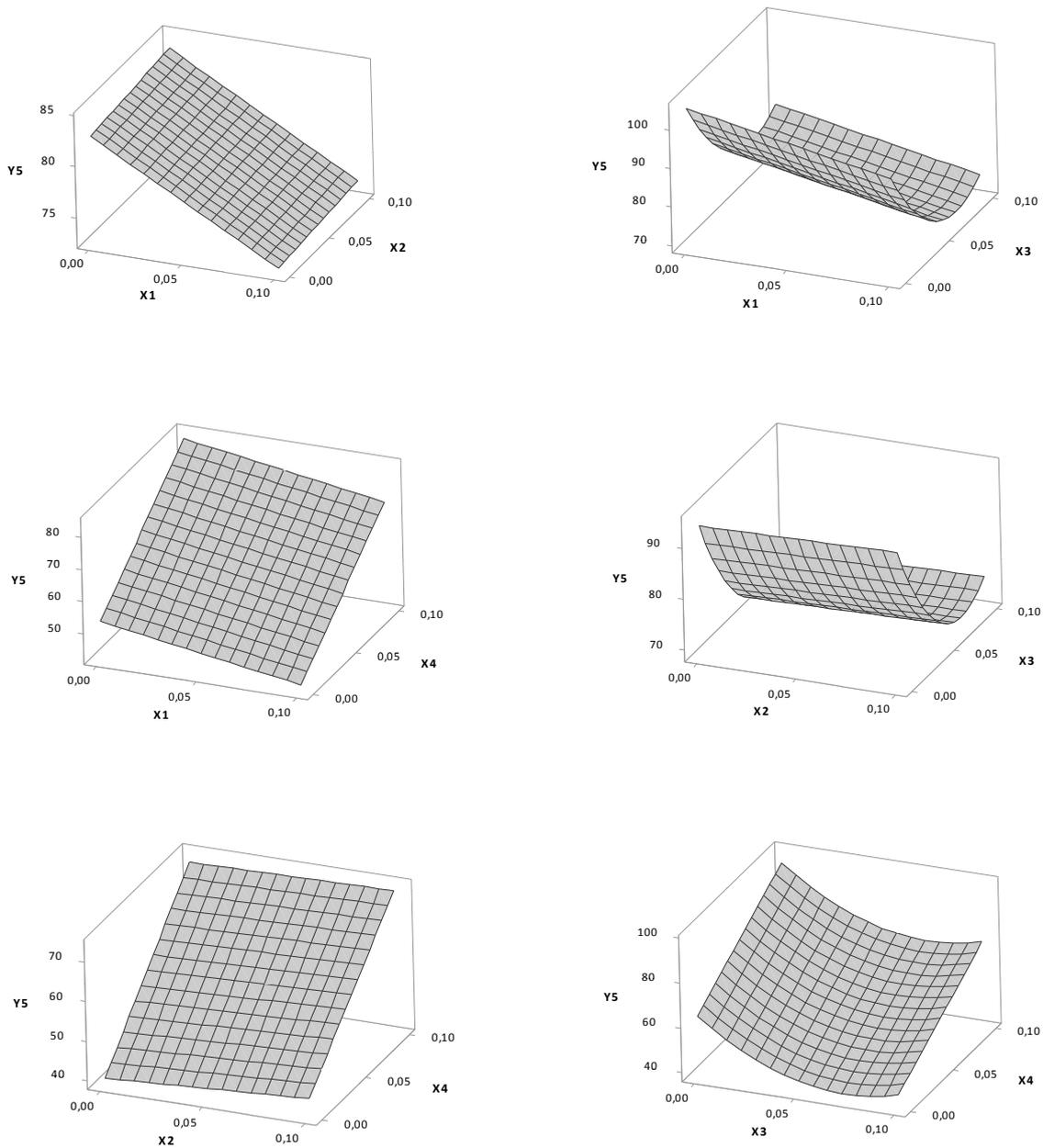
Figura 12 – Superfície de resposta para a inibição de *Staphylococcus aureus* em função das concentrações de metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno



X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y4 - % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538) $1,6 \times 10^5$ UFC/poço. Quando ausentes, os valores de X1, X2, X3 e X4 foram fixados em 0,1% (p/v), onde X1 corresponde à concentração de ácido etilenodiamino tetraacético em % (p/v)

No caso da *Escherichia coli* (Y5, **Figura 13**) foram observadas elevadas porcentagens de inibição desta bactéria, principalmente na presença de metilparabeno (X4). O aumento da concentração de metabissulfito (X2) praticamente não alterou as respostas, mas houve interação entre metabissulfito e metilparabeno (**Apêndice I**). Verificou-se que a resposta foi melhor com a diminuição da concentração de EDTA (X1) e com a diminuição da concentração de desferroxamina (X3), sendo que uma elevada porcentagem de inibição foi alcançada em concentrações intermediárias de desferroxamina.

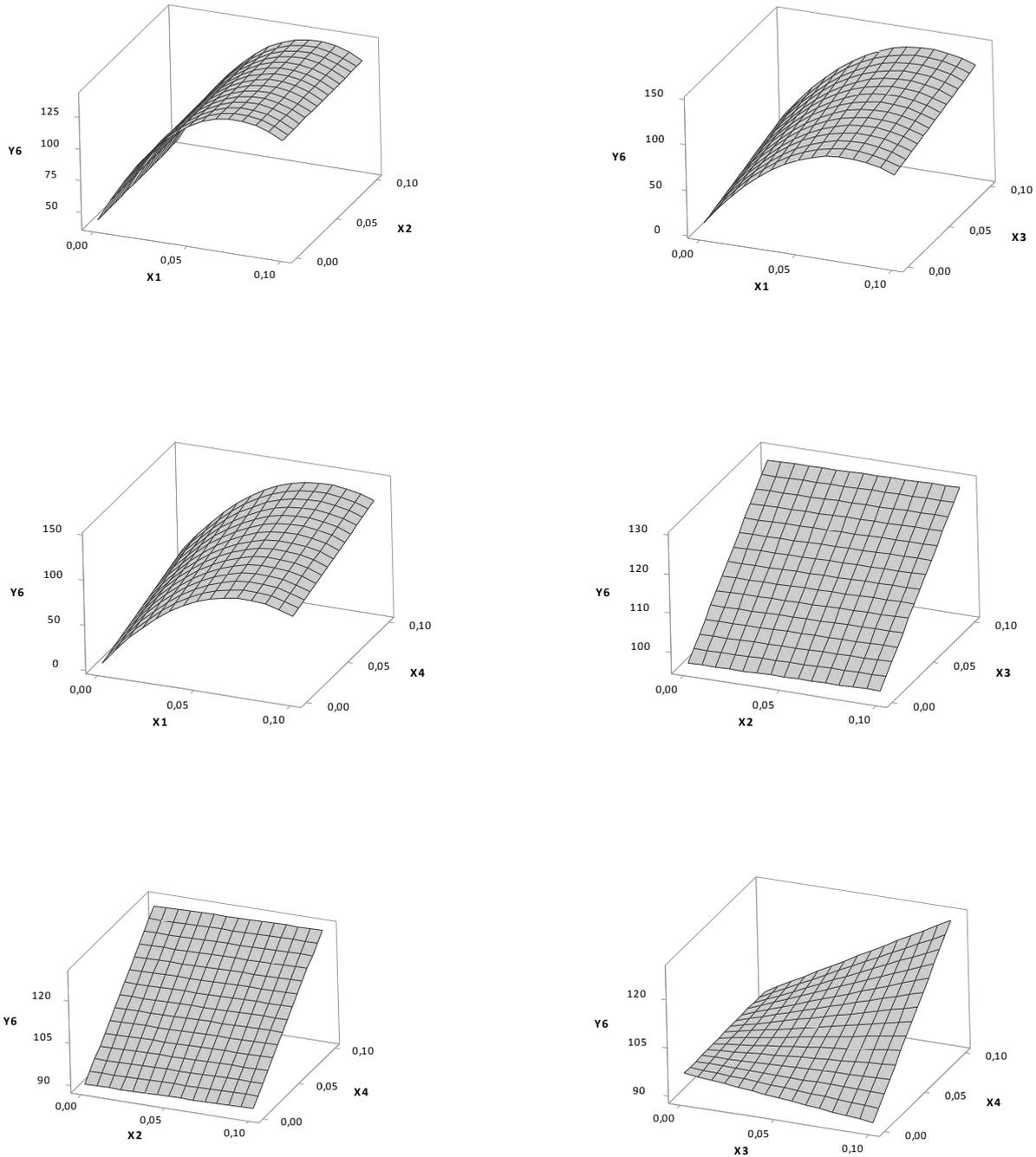
Figura 13 – Superfície de resposta para a inibição de *Escherichia coli* em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno



X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y5 - % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739) $1,0 \times 10^6$ UFC/poço. Quando ausentes, os valores de X1, X2, X3 e X4 foram fixados em 0,1% (p/v)

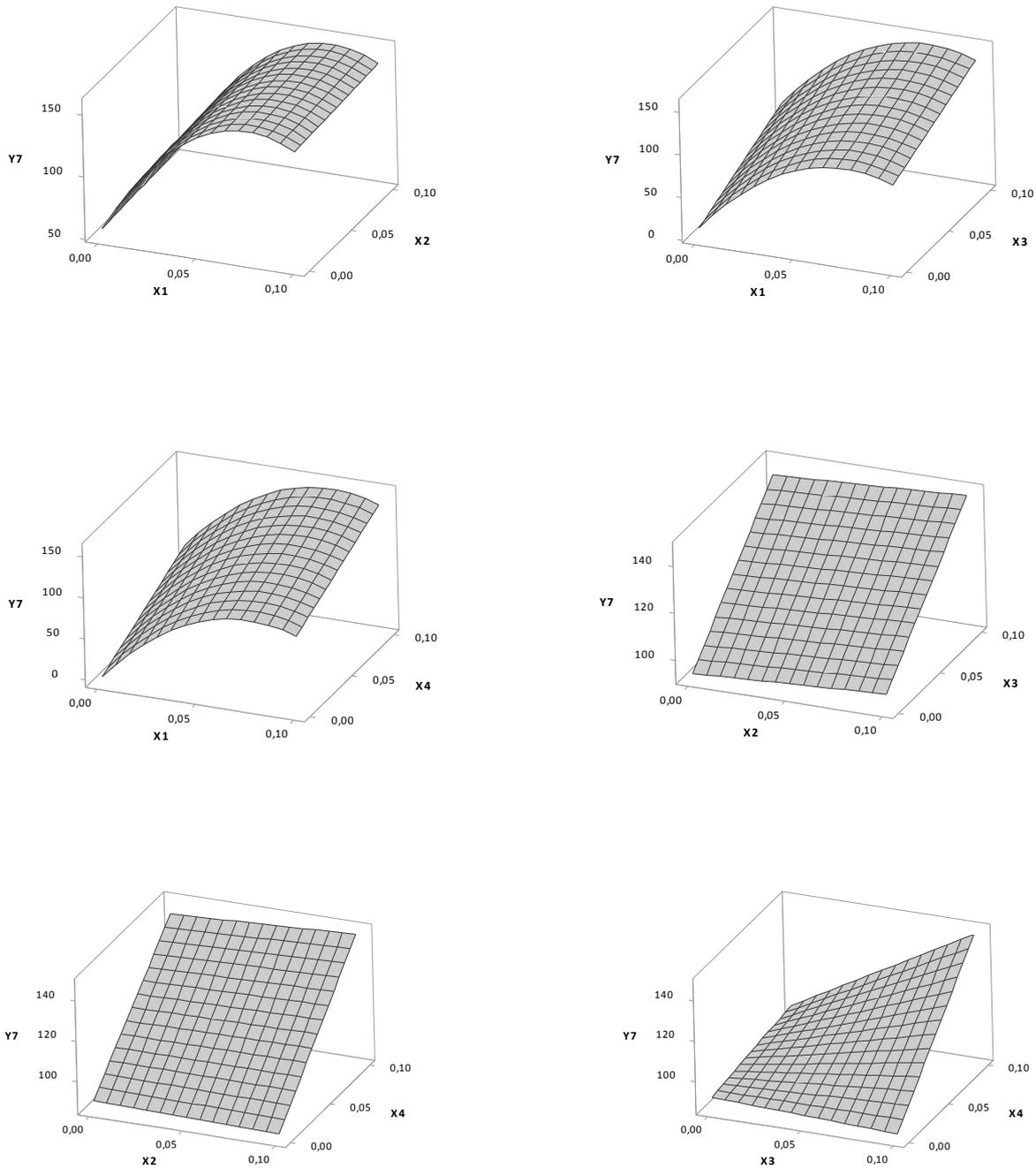
A *Pseudomonas aeruginosa* (Y6) e a *Candida albicans* (Y7) apresentaram perfis de resposta muito semelhantes (**Figuras 14 e 15**). Foram observadas elevadas porcentagens de inibição com o aumento da concentração de EDTA (X1), desferroxamina (X3) e metilparabeno (X4). O aumento da concentração metabissulfito (X2) praticamente não alterou as respostas, mas houve interação com o metilparabeno na inibição de *C. albicans* (**Apêndice K**). Tanto para *P. aeruginosa* como para *C. albicans* a associação de desferroxamina e metilparabeno (X3; X4) resultou em interação entre estes fatores (**Apêndices J e K**).

Figura 14 – Superfície de resposta para a inibição de *Pseudomonas aeruginosa* em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno



X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y6 - % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027) $1,7 \times 10^5$ UFC/poço. Quando ausentes, os valores de X1, X2, X3 e X4 foram fixados em 0,1% (p/v)

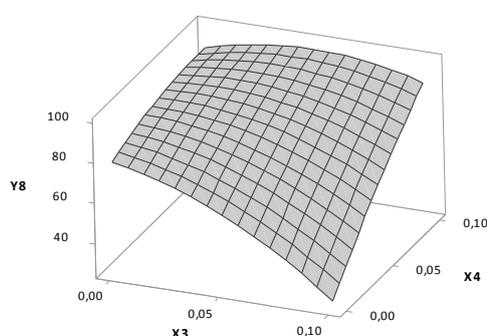
Figura 15 – Superfície de resposta para a inibição de *Candida albicans* em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno



X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y7 - % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231) $2,2 \times 10^4$ UFC/poço. Quando ausentes, os valores de X1, X2, X3 e X4 foram fixados em 0,1% (p/v)

De acordo com a **Figura 16**, elevadas porcentagens de inibição de *Aspergillus brasiliensis* (Y8) foram observadas para concentrações decrescentes de desferroxamina e concentrações crescentes de metilparabeno (X3; X4), com interação entre os fatores (**Apêndice L**). Esta foi a única resposta significativa apontada pelo modelo estatístico e indicou a possibilidade de associação dos fatores em concentrações ótimas reduzidas.

Figura 16 – Superfície de resposta para a inibição de *Aspergillus brasiliensis* em função das concentrações de desferroxamina e metilparabeno



X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); Y8 - % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404) $1,3 \times 10^4$ UFC/poço. Valores de X1 e X2 fixados em 0,1% (p/v), onde X1 corresponde à concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v) e X2 corresponde à concentração de metabissulfito em % (p/v)

Neste estudo foi possível observar que a desferroxamina contribuiu na inibição do crescimento microbiano. Além disso, elevadas porcentagens de inibição foram obtidas para concentrações de metilparabeno menores que 0,1% (p/v), em associações envolvendo os outros adjuvantes. Tais achados são particularmente interessantes quando o objetivo de reduzir conservantes em formulações é considerado.

A discussão da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes conduziu à **Tabela 13**, na qual foram apresentados os principais efeitos de cada adjuvante na inibição dos micro-organismos. A desferroxamina apresentou influência positiva na inibição de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C.*

albicans, enquanto o EDTA apenas na inibição de *P. aeruginosa* e *C. albicans*. Além disso, a associação da desferroxamina ao metilparabeno resultou em interação e promoveu melhora na resposta inibitória dos micro-organismos testados, exceto *E. coli*. No caso do EDTA, não foi observada interação relevante com outros adjuvantes.

Tabela 13 - Influência do ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno na inibição do crescimento microbiano

Componente	Micro-organismo				
	Sa	Ec	Pa	Ca	Ab
EDTA	---	(-)	(+)*	(+)*	---
BS	(-)	(x)	(x)	(x)	---
DFO	(-)*	(+)*	(+)	(+)	(-)
MP	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Interação	BS/DFO (-) DFO/MP (+)	XXX	DFO/MP (+)	DFO/MP (+)	DFO/MP (+)

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético; BS - metabissulfito; DFO - desferroxamina; MP - metilparabeno; Sa = *S. aureus* (ATCC 6538) $1,6 \times 10^5$ UFC/poço; Ec = *E. coli* (ATCC 8739) $1,0 \times 10^6$ UFC/poço; Pa = *P. aeruginosa* (ATCC 9027) $1,7 \times 10^5$ UFC/poço; Ca = *C. albicans* (ATCC 10231) $2,2 \times 10^4$ UFC/poço; Ab = *A. brasiliensis* (ATCC 16404) $1,3 \times 10^4$ UFC/poço; (+) influência positiva na resposta; (-) influência negativa na resposta; (x) não há influência relevante na resposta; * resposta não linear (curvatura); XXX não há interação relevante; --- fator não considerado no modelo estatístico

A interação da desferroxamina com o metilparabeno remete a trabalhos anteriormente mencionados, que sugerem ação sinérgica da desferroxamina a fármacos antimicrobianos e a redução da concentração mínima inibitória destes fármacos (van ASBECK et al., 1983a, 1983b; HARTZEN; FRIMODT-MØLLER; THOMSEN, 1989, 1991, 1994; GOKARN; PAL, 2017, 2018).

Em relação à associação da desferroxamina especificamente a agentes de conservação, poucas são as publicações. Polson et al. (2014) propuseram como objeto de patente algumas composições biocidas contendo agentes conservantes associados à quelantes de elevada afinidade e seletividade para

ferro. Segundo os autores, a supressão do ferro torna o micro-organismo estressado, o que melhora o desempenho dos antimicrobianos e possibilita a redução destes na composição (ARCH CHEMICALS, 2014).

Os autores da referida patente discutiram a crescente necessidade em buscar agentes antimicrobianos eficientes e não prejudiciais ao meio ambiente e consideraram inúmeras aplicações para as composições biocidas propostas. Dentre elas, o controle microbiológico de sistemas aquosos industriais, o controle microbiológico de produtos de higiene pessoal ou mesmo como ativos de formulações antitranspirantes ou destinadas ao cuidado de feridas (ARCH CHEMICALS, 2014).

5.3 Avaliação da estabilidade química das soluções de ácido ascórbico

A escolha do ácido ascórbico (vitamina C) como modelo desta pesquisa se justificou pelo alto grau de suscetibilidade à oxidação, sendo assim um marcador de eficácia do sistema antioxidante. Além disso, considerou-se como vantagem a elevada hidrossolubilidade deste ativo.

A oxidação do ácido ascórbico é desencadeada pela ionização da molécula em solução aquosa. Outros fatores como temperatura elevada, pH elevado, presença de oxigênio dissolvido e efeito catalítico de íons metálicos aumentam o grau de degradação (STAMFORD, 2012).

Na terapêutica, o ácido ascórbico é amplamente empregado por via oral como suplemento e para tratar a forma grave de sua deficiência, o escorbuto, caracterizado por sintomas como sangramento, cicatrização lenta, edemas na gengiva, perda dental, lesões em cartilagens e tecidos conjuntivos, fraqueza dos ossos, dentre outros. O uso intravenoso do ácido ascórbico somente é indicado em curto prazo, quando a administração oral não é possível ou é insuficiente. Apesar das Agências Reguladoras não declararem qualquer outro uso aprovado para o ácido ascórbico, inúmeras pesquisas exploram os seus

benefícios clínicos, devido à poderosa ação antioxidante (LUNA et al., 2011; MICROMEDEX, 2018).

Estudos mostram que o ácido ascórbico pode ser útil como auxiliar no tratamento de infecções, inflamações e quadros de falência de órgãos, bem como na profilaxia do câncer, da doença de Alzheimer e outras. Em relação ao uso tópico, apresenta eficácia na queratose folicular, prevenindo a formação de lesões papulares, na melhora da pele danificada pela radiação solar, na cicatrização de feridas e na redução de eritemas resultantes de tratamentos a laser (MICROMEDEX, 2018).

De fato, o ácido ascórbico é considerado um ativo dermatológico, sendo frequentemente utilizado como complemento em produtos para proteção solar. Isto se deve à sua capacidade de neutralizar radicais livres induzidos por raios ultravioletas, prevenindo a mutação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e a imunossupressão, que são fatores associados ao fotoenvelhecimento e ao câncer de pele. Além disso, estimula a síntese de colágeno e regenera a vitamina E, contribuindo com o reservatório antioxidante da pele. O ácido ascórbico também promove o clareamento de manchas e cicatrizes e o controle de processos inflamatórios, tais como queimaduras, acne e eventos pós-cirúrgicos (PINNELL; MADEY, 1999; FARRIS, 2005).

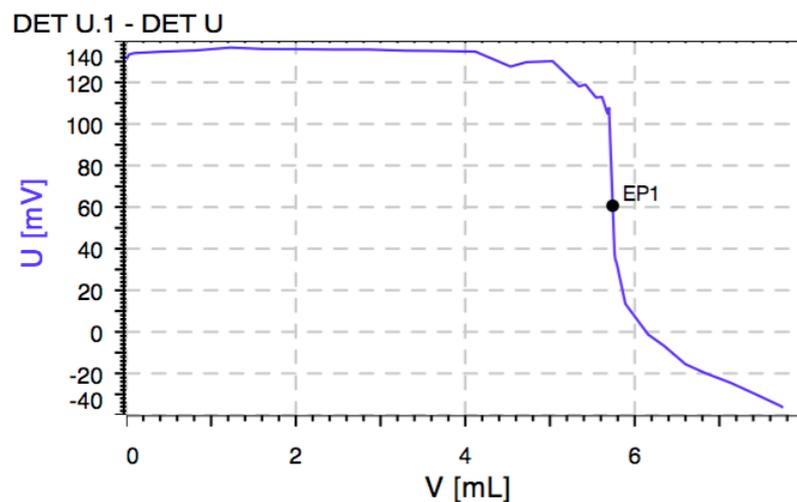
O efeito antioxidante do ácido ascórbico pode resultar em muitos benefícios. Por outro lado, esta propriedade consiste no principal desafio para o desenvolvimento de formulações estáveis. A degradação do ácido ascórbico é quase sempre acompanhada pelo aparecimento de coloração amarelada, a qual progride rapidamente dependendo da formulação, embalagem e condições de armazenamento (STAMFORD, 2012).

O estudo conduzido por Aquino e Felipe (2014) mostrou que preparações magistrais de géis aquosos de vitamina C para uso tópico são mais estáveis quando manipuladas em pH ácido e contendo sistemas antioxidantes sinérgicos, além de acondicionamento em bisnagas de alumínio e armazenamento na geladeira.

Atualmente, as formulações cosméticas de ácido ascórbico evoluíram muito, devido ao emprego de ingredientes de alto desempenho e que são capazes de viabilizar a estabilidade e a absorção percutânea do ativo. Diversos derivados mais estáveis do ácido ascórbico estão disponíveis no mercado, no entanto, para que estes tenham função na pele é necessário que sejam absorvidos e convertidos na forma ativa L-ácido ascórbico (PINNELL; MADEY, 1999; STAMFORD, 2012).

No presente estudo, a verificação inicial do teor de ácido ascórbico na matéria-prima foi realizada por método potenciométrico (**Figura 17**), com resultado de 95,48% em relação à substância química de referência. Nas mesmas condições, a amostra de referência (solução oral, gotas) apresentou teor de 96,12%. O critério de aceitação adotado foi de 90,0 a 110,0% de ácido ascórbico.

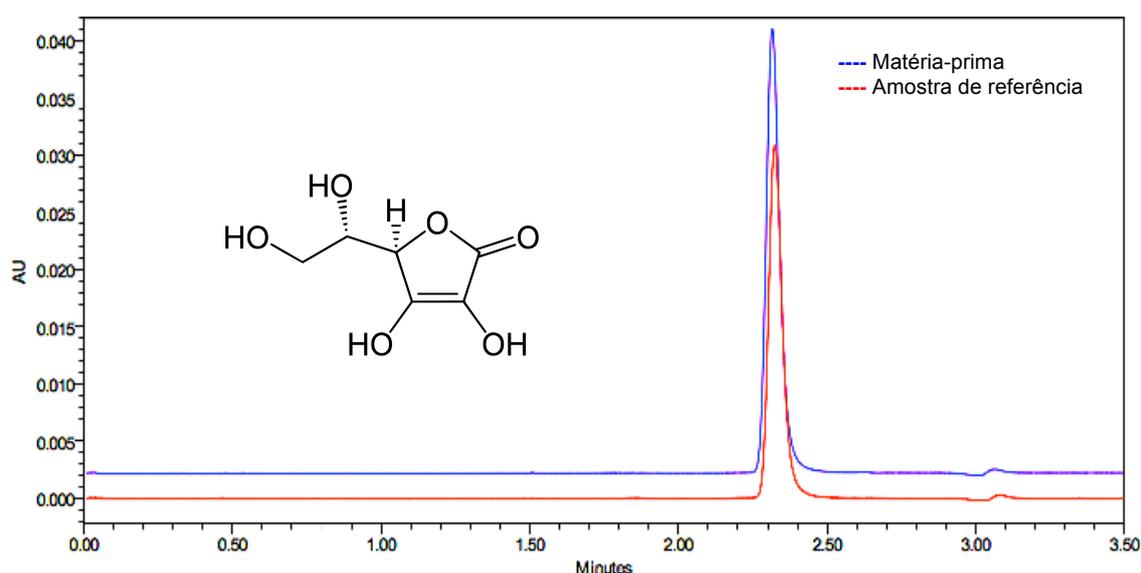
Figura 17 - Volume gasto na determinação potenciométrica do teor de ácido ascórbico



Volume gasto (V) em mililitros (mL) durante a titulação dinâmica (DET U); ponto de equivalência (EP) em milivolts (mV); amostra: solução de ácido ascórbico a 5,0% (p/v) ou 50,0 mg/mL; titulante: solução de iodato de potássio 0,02 M

A verificação complementar da identidade do ácido ascórbico na matéria-prima foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, em relação a uma amostra de referência (solução oral, gotas). A análise apresentou resultado positivo no tempo de retenção de aproximadamente 2,3 minutos (Figura 18).

Figura 18 – Perfil cromatográfico do ácido ascórbico



Fase estacionária: coluna C18 (4,60 x 150 mm, 5 μ m) a 25 ± 2 °C; fase móvel: água acidificada pH 3,5 e acetonitrila (75: 25); concentração da amostra: 100,0 μ g/mL; volume de injeção: 5 μ L; modo de eluição: isocrático; fluxo: 1 mL/minuto; comprimento de onda de detecção: 254 nm

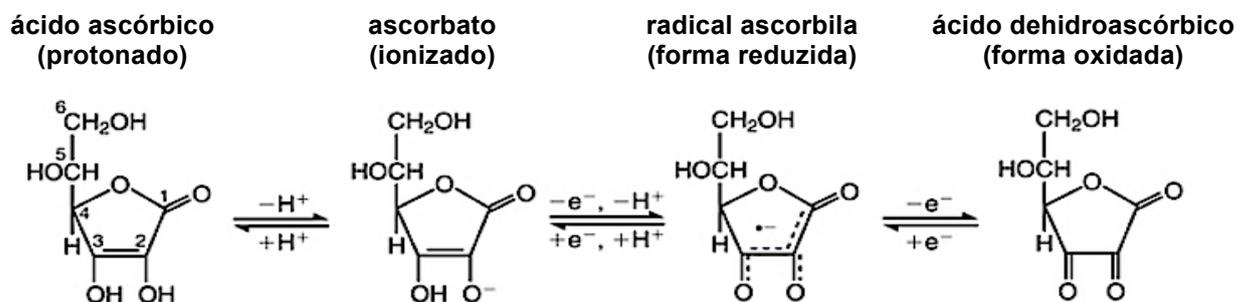
Embora o método de cromatografia em fase reversa descrito por Khan et al. (2012) tenha sido utilizado para a identificação do ativo, a robustez necessária para a avaliação da estabilidade da solução de ácido ascórbico ao longo do tempo não foi atingida nestas condições e mesmo propondo-se alterações no volume de injeção, na proporção da fase móvel, no pH da amostra e no preparo de soluções amostra e padrão (tamponamento, proteção da luz, refrigeração no compartimento de amostras).

Segundo a Farmacopeia Americana, o doseamento de ácido ascórbico por cromatografia líquida é preconizado somente para solução injetável, sendo a fase estacionária um sistema altamente polar, composto por resinas esféricas porosas de gel hidrofílico de acrilato, e a fase móvel uma solução aquosa tamponada em pH ácido (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

Entretanto, a volumetria de óxido-redução consiste na técnica clássica de doseamento de ácido ascórbico. Além de mais simples e mais barata que a cromatografia líquida, ainda é largamente empregada em amostras de medicamentos e alimentos, sendo assim adotada.

Os compêndios nacional e americano preconizam a volumetria de óxido-redução para o doseamento de ácido ascórbico em matérias-primas e comprimidos. A última edição da Farmacopeia Brasileira ainda mantém a volumetria para o doseamento de ácido ascórbico em solução injetável. Em verdade, diferentes procedimentos podem ser realizados com este fim, especialmente as reações com diclorofenol-indofenol (Método de Tillmans) ou reações diretas com iodo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

Tanto o iodo como o iodato são oxidantes fracos que fazem passar o ácido ascórbico para a sua forma oxidada, o ácido dehidroascórbico, em uma reação reversível (**Figura 19**). A oxidação pelo iodato se faz com a liberação de ácido iodídrico e que pode regenerar em parte o ácido ascórbico, pela redução do ácido dehidroascórbico. Por isso, a concentração do ácido iodídrico deve ser controlada pela adição de iodeto de potássio, em quantidade acurada. No presente trabalho, o método de doseamento de ácido ascórbico foi realizado por titulação com iodato de potássio, em vez de iodo (VILLELA; PECCI, 1943; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

Figura 19 - Reação de óxido-redução do ácido ascórbico

Fonte: <https://basicmedicalkey.com> (Adaptado)

Villela e Pecci (1943) demonstraram que dosagens de ácido ascórbico em sucos de frutos cítricos foram mais exatas com a solução de iodato de potássio do que com a solução de iodo. Segundo os autores, estes resultados favorecem o uso de iodato de potássio nas dosagens de ácido ascórbico em soluções puras. Além disso, a facilidade da técnica permite dosagens em série sem a necessidade de padronização da solução de iodato, que é muito estável.

Uma vez que foram mantidas as condições de análise descritas na literatura, a validação do método volumétrico para determinação do teor de ácido ascórbico nas amostras priorizou os parâmetros de seletividade, repetibilidade, exatidão e linearidade (BRASIL, 2017). Inicialmente foi verificada a seletividade do método, com ênfase na interferência da matriz, mensurando-se a recuperação do analito na presença dos demais componentes da composição.

De acordo com a **Tabela 14**, constatou-se que não houve interferência relevante do EDTA e da desferroxamina na quantificação do analito, mesmo quando estes adjuvantes estão em altas concentrações. Por outro lado, observou-se uma possível interferência do metabissulfito, que também é um antioxidante, quando presente em altas concentrações. Neste caso, foram obtidos valores de recuperação acima do limite superior da especificação (teor de 90,0 a 110,0%).

Entretanto, o método mostrou-se seletivo nas condições reais de análise, verificando-se que a interferência do metabissulfito não foi significativa quando nas concentrações da composição (1,0 e 0,5 mg/mL), observando-se conformidade na recuperação do analito (ácido ascórbico 50,0 mg/mL) para concentrações de metabissulfito menores ou iguais a 5,0 mg/mL (**Tabela 14**).

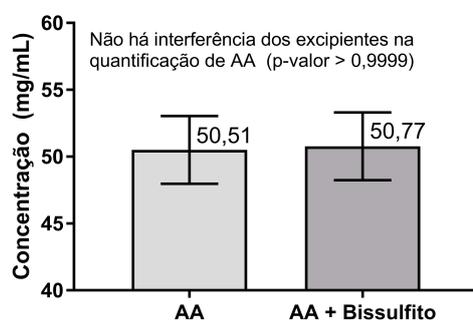
Tabela 14 - Porcentagens de recuperação de ácido ascórbico para a avaliação da seletividade do método de teor

AA	Concentração (mg/mL)			Recuperação de AA (%)
	EDTA	BS	DFO	
5,01	---	---	---	105,23
5,01	10,00	---	---	100,44
5,01	10,00	10,00	---	157,05
5,01	---	---	10,00	101,84
5,01	---	10,00	10,00	157,55
5,01	10,00	---	10,00	96,05
5,01	10,00	10,00	10,00	156,75
5,01	---	10,00	---	155,15
5,01	---	5,00	---	128,59
10,02	---	5,00	---	118,61
50,03	---	50,00	---	127,76
50,03	---	25,00	---	116,45
50,03	---	10,00	---	114,51
50,03	---	5,00	---	103,64
50,03	---	1,00	---	101,48
50,03	---	0,50	---	102,03
50,03	---	0,25	---	101,14
50,03	---	---	---	100,96

AA - ácido ascórbico (substância ativa); EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (quelante); DFO - desferroxamina (quelante); BS - metabissulfito (antioxidante); --- ausência

A **Figura 20** mostra que não houve diferença significativa no teor de ácido ascórbico para uma solução do ativo e para uma solução do ativo contendo metabissulfito, nas concentrações máximas dos insumos a serem empregadas no estudo e considerando o desvio-padrão obtido na verificação da repetibilidade do método.

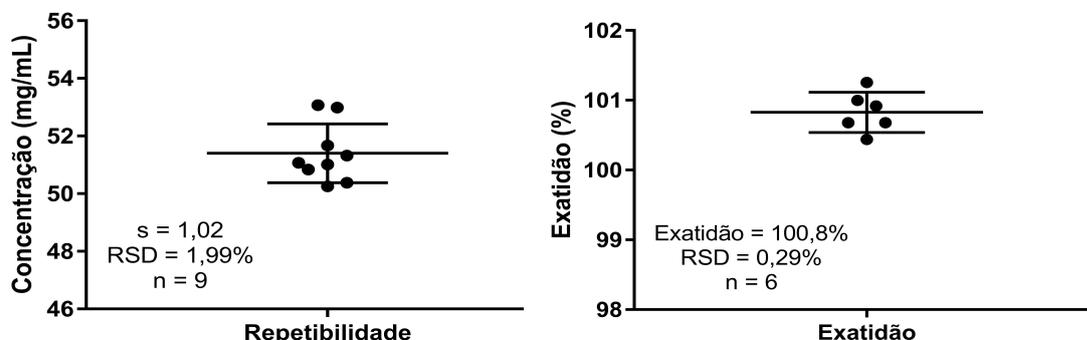
Figura 20 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à seletividade



AA - ácido ascórbico; Bissulfito - metabissulfito

O método de quantificação de ácido ascórbico demonstrou precisão e exatidão (**Figura 21**). Os valores de repetibilidade das nove determinações (n) apresentaram-se próximos do desvio-padrão ($s = 1,02$) e o desvio-padrão relativo (RSD) foi de 1,99%, sendo o critério de aceitação um valor menor que 5,0%. A recuperação do analito para seis determinações (n) foi de 100,8% e o RSD de 0,29%, valores que estão dentro dos critérios de aceitação, ou seja, 98,0 a 102,0% e menor que 5,0%, respectivamente.

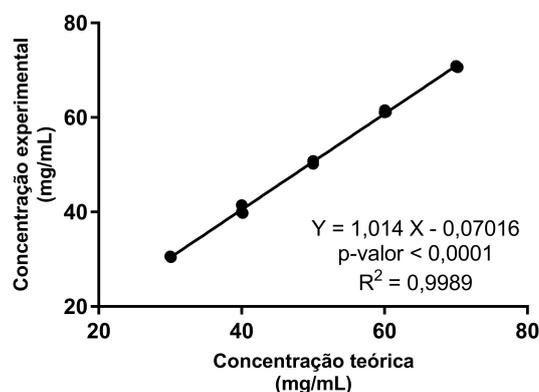
Figura 21 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à precisão e exatidão



s – desvio-padrão; RSD – desvio-padrão relativo; n – número de determinações

O método de quantificação de ácido ascórbico apresentou linearidade na faixa de concentração de trabalho. A **Figura 22** apresenta a curva de calibração obtida em triplicata e a sua equação da reta. Com nível de significância de 5,0%, o valor p foi menor que 0,0001 e o coeficiente de determinação R^2 igual a 0,9989, sendo o critério de aceitação de R^2 maior que 0,99.

Figura 22 - Quantificação de ácido ascórbico na validação do método volumétrico quanto à linearidade



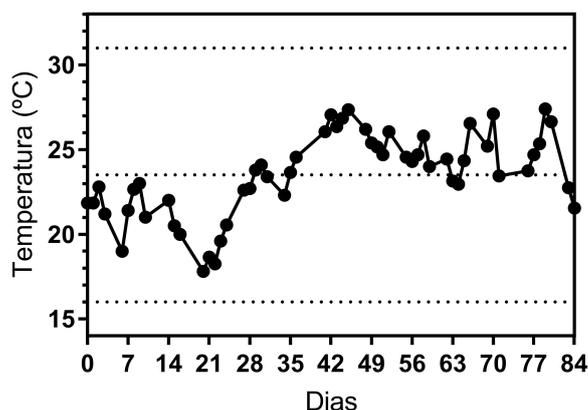
Equação da reta; p-valor; coeficiente de determinação (R^2)

Frente aos resultados, constatou-se que o método de quantificação de ácido ascórbico se mostrou adequado para a finalidade proposta na matriz em estudo. Após a verificação do método, as diferentes composições da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) foram preparadas (vide item 4.2) e então submetidas à avaliação da estabilidade química ao longo do tempo (vide item 4.5).

Os estudos de estabilidade são requisitos fundamentais no desenvolvimento de medicamentos e cosméticos, pois contribuem na avaliação do desempenho do produto e da aceitação do consumidor, bem como na garantia da qualidade e da segurança. Os testes de estabilidade são considerados procedimentos preditivos e visam acelerar alterações passíveis de ocorrer no produto nas condições de mercado, relacionadas a variações de temperatura, luminosidade e umidade do ambiente ou ao próprio material de acondicionamento da formulação (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2004).

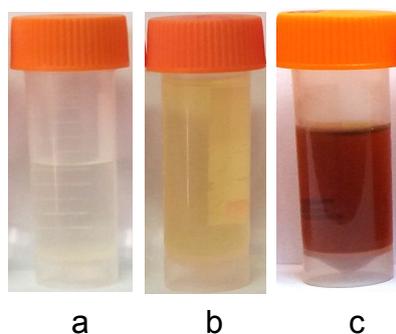
Neste estudo, as amostras deixadas no ambiente de bancada foram avaliadas entre os meses de agosto e outubro. Durante o período, as variações de temperatura da sala foram monitoradas por duas medidas durante o dia, sendo registrada temperatura mínima de 17,8 °C e máxima de 27,8 °C, com média de $23,5 \pm 2,5$ °C (**Figura 23**).

Figura 23 – Temperatura do ambiente ao longo do estudo de estabilidade da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) na condição de bancada



As soluções aquosas de ácido ascórbico 5,0% (p/v) apresentaram aspecto límpido, transparente e cor tenuemente amarelada após o preparo. Como ilustrado na **Figura 24**, alterações progressivas e marcantes na coloração foram observadas ao longo do estudo, especialmente na condição de estufa a 40 °C, sugerindo-se como previsto, a maior suscetibilidade de oxidação do ativo em temperaturas elevadas.

Figura 24 – Alíquotas da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) isenta de adjuvantes, após o preparo e após 56 dias na bancada e na estufa



a) solução de ácido ascórbico após o preparo; b) solução de ácido ascórbico após 56 dias no ambiente de bancada; c) solução de ácido ascórbico após 56 dias na estufa a 40 °C

Em relação ao teor de ácido ascórbico, a análise de regressão dos resultados foi realizada para predizer o período em que o teor do ativo nas composições permanece dentro dos limites estabelecidos, ou seja, de 90,0 a 110,0%. Desta forma foi possível comparar o efeito dos diferentes sistemas antioxidantes.

A **Tabela 15** mostra a análise de variância e as particularidades dos modelos estatísticos obtidos, incluindo os fatores mais representativos para as respostas (valor p).

Tabela 15 - Análise de variância para a regressão da estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina

Fontes	Bancada			Estufa		
	g.l.	SQ	p-valor	g.l.	SQ	p-valor
Regressão	6	20273,2	0,000	4	234,5	0,002
X1	1	6046,9	0,000	1	117,3	0,001
X2	1	158,8	0,382	1	3,2	0,475
X3	1	91,4	0,503	1	13,1	0,164
X1*X1	1	1487,8	0,022	1	65,1	0,007
X2*X2	1	---	---	---	---	---
X3*X3	---	264,7	0,267	---	---	---
X1*X2	1	3375,2	0,003	---	---	---
X1*X3	---	---	---	---	---	---
X2*X3	---	---	---	---	---	---
Erro	8	1485,7	na	10	58,0	na
Total	14	21758,9	na	14	292,5	na

X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); Bancada - estabilidade do ácido ascórbico em bancada (dias); Estufa - estabilidade do ácido ascórbico em estufa a 40 °C (dias); g.l. - grau de liberdade; SQ - soma dos quadrados; p-valor - significância do fator; --- fatores não considerados no modelo estatístico; na – não se aplica

A **Tabela 16** mostra os modelos estatísticos do estudo, representados por equações de regressão que predizem a estabilidade do ácido ascórbico nas condições de bancada e estufa, em função da concentração dos adjuvantes. Ambos os modelos se mostraram ajustados (**Apêndices M e N**). Os modelos estatísticos de estabilidade química resultaram em menor capacidade de predição (R^2 -pred) em comparação aos modelos estatísticos de atividade antioxidante e atividade antimicrobiana (itens 5.1 e 5.2, respectivamente), provavelmente porque tratam de uma resposta complexa, relacionada com reações aceleradas de degradação do ativo.

Tabela 16 - Equações de regressão e coeficientes de determinação para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina

Condição de armazenamento	Equação de regressão	R ²	R ² -aj	R ² -pred
Bancada	$Y1 = 34,84 + 2039 X1 + 114 X2 - 251 X3 - 10435 X1^2 + 4422 X3^2 - 7925 X1 \cdot X2$	93,17	88,05	73,68
Estufa a 40 °C	$Y2 = 9,52 + 266,2 X1 + 11,4 X2 - 23,0 X3 - 2005 X1^2$	80,18	72,26	55,02

X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); Y1 - estabilidade do ácido ascórbico em bancada (dias); Y2 - estabilidade do ácido ascórbico em estufa a 40 °C (dias); R² – coeficiente de determinação (%); R²-aj – coeficiente de determinação ajustado (%); R²-pred – coeficiente de determinação de predição (%)

A partir dos modelos estatísticos obtidos foi possível prever o tempo máximo de estabilidade química das soluções de ácido ascórbico 5,0% (p/v), em uma abordagem pontual (**Tabela 17**). A solução de ácido ascórbico sem adjuvantes (A) apresentou estabilidade máxima de aproximadamente 39 dias quando na condição de bancada e de aproximadamente 7 dias quando na estufa a 40 °C. Na presença dos adjuvantes, o maior tempo de estabilidade predito em bancada foi de 164 dias para a solução contendo EDTA e desferroxamina (F) e o maior tempo predito em estufa foi de aproximadamente 21 dias para a solução contendo EDTA e metabissulfito nas concentrações intermediárias (CC).

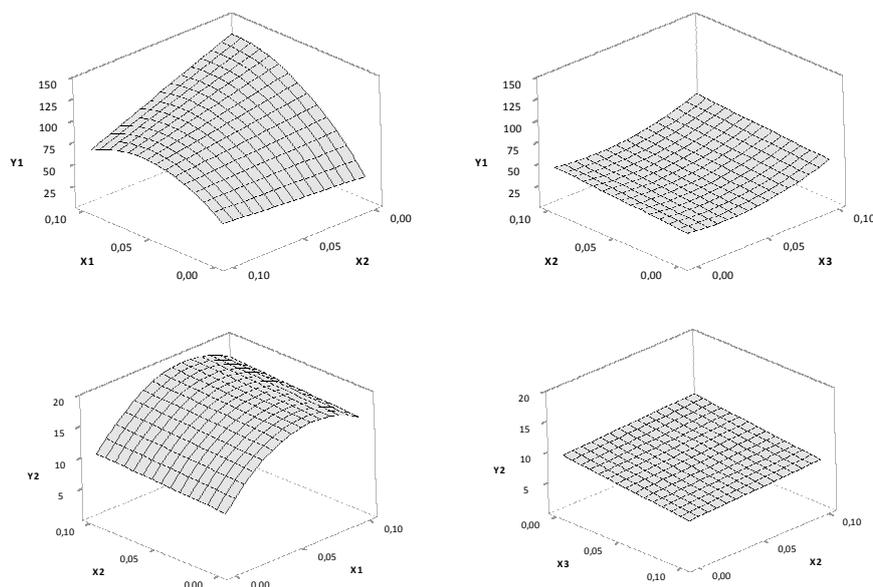
Tabela 17 – Tempo máximo predito da estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) para os diferentes sistemas adjuvantes e condições de exposição

Amostra	Adjuvantes			Condições de exposição	
	X1	X2	X3	Bancada	Estufa
A	0,00	0,00	0,00	38,56	6,82
B	0,10	0,00	0,00	120,12	17,12
C	0,10	0,10	0,00	79,10	14,56
D	0,00	0,00	0,10	50,89	7,97
E	0,00	0,10	0,10	66,78	6,71
F	0,10	0,00	0,10	164,00	15,24
G	0,00	0,10	0,00	47,06	13,95
H	0,10	0,10	0,10	76,95	15,14
BB	0,05	0,00	0,00	103,30	19,44
CC	0,05	0,05	0,00	89,87	20,58
DD	0,00	0,00	0,05	27,32	8,27
EE	0,00	0,05	0,05	30,98	11,34
FF	0,05	0,00	0,05	131,82	13,81
GG	0,00	0,05	0,00	51,87	8,10
HH	0,05	0,05	0,05	86,64	16,29

X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); Bancada - estabilidade do ácido ascórbico em bancada (dias); Estufa - estabilidade do ácido ascórbico em estufa a 40 °C (dias)

Para uma análise mais criteriosa da associação do quelante (desferroxamina ou EDTA) ao metabissulfito, gráficos tridimensionais de superfície de resposta foram obtidos a partir dos modelos estatísticos, a fim de comparar o efeito destas associações na estabilidade do ácido ascórbico (**Figura 25**).

Figura 25 - Superfície de resposta para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) em bancada e em estufa, em função das concentrações de ácido etilenodiamino tetra-acético, metabissulfito e desferroxamina



X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X2 - concentração de metabissulfito em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); Y1 - estabilidade do ácido ascórbico em bancada (dias); Y2 - estabilidade do ácido ascórbico em estufa a 40 °C (dias). Quando ausentes, os valores de X1 e X3 foram fixados em zero

No ambiente de bancada (Y1) verificou-se que a estabilidade do ácido ascórbico melhorou com o aumento da concentração de EDTA, sendo que o aumento da concentração de metabissulfito apresentou efeito muito reduzido na resposta (X1; X2). Por outro lado, a estabilidade do ácido ascórbico pouco se alterou em função do aumento das concentrações de desferroxamina e metabissulfito (X2; X3), observando-se uma atuação muito reduzida destes componentes na resposta (**Figura 25**).

Na condição de estufa a 40 °C (Y2) verificou-se que a estabilidade do ácido ascórbico melhorou progressivamente em poucos dias com o aumento da concentração de EDTA, seguindo-se o decaimento da resposta; observou-se também que o aumento da concentração de metabissulfito teve efeito muito

reduzido na resposta (X1; X2). Novamente, verificou-se que a estabilidade do ácido ascórbico praticamente não se alterou em função das concentrações de desferroxamina e de metabissulfito (X2; X3) associados na composição (**Figura 25**).

Os modelos estatísticos de estabilidade química da solução de ácido ascórbico foram aplicados para prever o efeito da desferroxamina em concentração equimolar ao EDTA. Para isto considerou-se uma quantidade teórica 1,8 vezes maior de desferroxamina nas composições (vide **Tabela 3**). Contudo, a análise mostrou diferença estatística entre EDTA e desferroxamina, tanto na condição de bancada como na estufa e independente da associação do metabissulfito (**Apêndice O**), indicando que a estabilidade do ácido ascórbico foi melhor na presença do EDTA.

Ressalta-se que estes resultados referem-se especificamente a uma formulação de ácido ascórbico, acondicionada em tubos de plástico tampados e submetida a variações de fatores externos, como temperatura e luminosidade. Há de se considerar que a formulação foi manipulada em um cenário de melhor caso quanto à estabilidade, ou seja, em meio acidificado e praticamente isento de impurezas metálicas.

Neste cenário constatou-se que o EDTA foi o fator mais relevante para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v). Entretanto, demonstrou-se anteriormente que a desferroxamina apresentou eficácia muito superior ao EDTA como agente quelante de ferro (vide item 5.1), o que pode ser particularmente interessante quando este metal é um contaminante de insumos e processos.

Sugere-se que a maior estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) na presença do EDTA possa estar relacionada com efeitos no pH da formulação, assumindo-se que a natureza ácida do EDTA provavelmente tenha melhor contribuído na manutenção da acidez da solução ao longo do tempo.

Segundo Stamford (2012), existem diversas estratégias para a estabilização do ácido ascórbico em formulações. As medidas mais comuns

consistem na redução do pH, na redução da porcentagem de água e na inclusão de antioxidantes. Outras estratégias que podem ser adotadas, porém desvantajosas quanto aos custos ou dificuldades operacionais são a exclusão do oxigênio durante o preparo, o emprego de matérias-primas encapsuladas e o emprego de embalagens impermeáveis ao oxigênio.

Além da estabilidade, a acidez é um fator especialmente importante para a permeação cutânea do ácido ascórbico em formulações de uso tópico. Isto porque o funcionamento máximo destas formulações somente é alcançado se o ácido ascórbico permanecer estável e disponível para ser absorvido pelo estrato córneo. Desse modo, as formulações aquosas devem apresentar pH abaixo do valor de pKa da molécula (4,2), o que reduz a densidade de carga e viabiliza uma permeação ótima da barreira epidérmica. Afirma-se que a fórmula padrão ouro é aquela que contém elevadas concentrações do ativo, entre 10 a 20%, e pH menor que 3,5 (PINNELL; MADEY, 1999; STAMFORD, 2012).

5.4 Otimização estatística dos resultados

Compor uma fórmula medicamentosa requer estudo criterioso de seus componentes, o que envolve não só os conhecimentos adquiridos na literatura, como experiências pessoais e criatividade. Neste processo, os adjuvantes escolhidos poderão ser associados e dar origem a diversas fórmulas. Logo, a aplicação de técnicas estatísticas de otimização permite a racionalização do processo de formulação. O planejamento fatorial é uma ferramenta eficiente para elucidar o efeito de diferentes fatores e suas interações, enquanto que modelos empíricos podem ser úteis para prever respostas, variando-se fatores independentes dentro de limites predeterminados (SAKUDA, 1993).

Com esse enfoque, a ferramenta de Qualidade por Design (*Quality by Design*, QbD) é uma abordagem sistemática baseada na análise científica do risco durante o desenvolvimento de um produto. Este conceito considera que a qualidade de um produto ou processo deve ser construída ao longo do seu desenvolvimento, de forma a garantir que os resultados sejam eficazes e seguros. A QbD tem como componente principal o Desenho de Experimentos

(*Design of Experiments*, DoE), o qual é capaz de fornecer melhores resultados com um menor número de experimentos (YU et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

Em vista das vantagens em utilizar ferramentas estatísticas para otimizar experimentos e predizer respostas, bem como para melhor compreender a relação entre múltiplas respostas, tal abordagem foi adotada neste trabalho. Assim, os modelos estatísticos previamente obtidos foram avaliados conjuntamente, com o objetivo de elaborar uma formulação que atenda especificações de qualidade relacionadas à estabilidade química e microbiológica da solução de ácido ascórbico.

A **Tabela 18** apresenta uma compilação dos coeficientes de determinação dos modelos estatísticos, isto é, os modelos de atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes para um meio rico em ferro, atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes frente às cepas padrão de bactérias e fungos e de estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) nas condições de bancada e de estufa. No geral, os modelos estatísticos apresentaram adequada capacidade de predição, como discutido nos itens 5.1, 5.2 e 5.3.

Tabela 18 - Coeficientes de determinação para os modelos estatísticos de atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes, atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes e estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v)

Coeficiente	Atividade antioxidante	Atividade antimicrobiana					Estabilidade química	
		Sa	Ec	Pa	Ca	Ab	Bancada	Estufa
R ²	98,69	95,57	98,22	99,89	98,80	99,50	93,17	80,18
R ² -aj	98,04	95,05	98,05	99,88	98,66	99,46	88,05	72,26
R ² -pred	96,65	93,83	97,83	99,87	98,39	99,38	73,68	55,02

R² – coeficiente de determinação (%); R²-aj – coeficiente de determinação ajustado (%); R²-pred – coeficiente de determinação de predição (%); Sa = *S. aureus* (ATCC 6538) 1,6 x 10⁵ UFC/poço; Ec = *E. coli* (ATCC 8739) 1,0 x 10⁶ UFC/poço; Pa = *P. aeruginosa* (ATCC 9027) 1,7 x 10⁵ UFC/poço; Ca = *C. albicans* (ATCC 10231) 2,2 x 10⁴ UFC/poço; Ab = *A. brasiliensis* (ATCC 16404) 1,3 x 10⁴ UFC/poço

O coeficiente de determinação R^2 é aquele que indica a proximidade dos dados experimentais ao modelo estatístico e sempre apresentará o maior valor dentre os coeficientes de determinação. O coeficiente de determinação ajustado (R^2 -aj) é um valor calculado em função do número de termos presentes no modelo. Por este motivo, o R^2 -aj sempre será inferior ao R^2 . A inclusão de um novo termo que conduza à redução do R^2 -aj significa que não houve contribuição deste termo para o melhor ajuste dos dados ao modelo. Por fim, o coeficiente de determinação de predição (R^2 -pred) é aquele que indica o grau de qualidade das predições. O R^2 -pred é sempre inferior ao R^2 -aj. Quanto mais elevado o R^2 -pred, maior a capacidade do modelo para fazer predições (FUKUDA et al., 2018).

Os modelos estatísticos do estudo foram ajustados para obter as melhores respostas quanto à taxa de oxidação do ácido ascórbico, inibição da carga microbiana e teor de ácido ascórbico, considerando-se concentrações máximas de 0,1% (p/v) de cada adjuvante, ou seja, EDTA, metabissulfito, desferroxamina e metilparabeno.

Funções de desejabilidade foram empregadas para minimizar a taxa de oxidação e para maximizar as respostas de atividade antimicrobiana e estabilidade química, a fim de prever a melhor composição que atenda todos os requisitos de qualidade predeterminados. A **Tabela 19** mostra os requisitos de qualidade estabelecidos para representar um cenário ideal de qualidade da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v).

As funções de desejabilidade são ferramentas úteis para otimizar respostas múltiplas, visando o atendimento concomitante de diferentes critérios de qualidade, seja para respostas alvo, maximização ou minimização de respostas (CANDIOTI et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

Tabela 19 - Requisitos de qualidade estabelecidos para a solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v)

Especificação	Atividade antioxidante (ua/min)	Atividade antimicrobiana (% de inibição em 24 h)					Estabilidade química (dias)	
		Sa	Ec	Pa	Ca	Ab	Bancada	Estufa
Mínimo	0	30	30	30	30	30	90	7
Alvo	0	100	100	100	100	100	120	14
Máximo	250	100	100	100	100	100	120	14

Sa = *S. aureus* (ATCC 6538) $1,6 \times 10^5$ UFC/poço; Ec = *E. coli* (ATCC 8739) $1,0 \times 10^6$ UFC/poço; Pa = *P. aeruginosa* (ATCC 9027) $1,7 \times 10^5$ UFC/poço; Ca = *C. albicans* (ATCC 10231) $2,2 \times 10^4$ UFC/poço; Ab = *A. brasiliensis* (ATCC 16404) $1,3 \times 10^4$ UFC/poço; ua/min - intensidade de fluorescência por minuto

De acordo com a **Tabela 19**, definiu-se como alvo para a atividade antioxidante do sistema estabilizante uma taxa nula de oxidação, sendo a taxa máxima o valor de intensidade de fluorescência obtido experimentalmente, ou seja, 250 ua/min.

Para a atividade antimicrobiana do sistema de conservação adotou-se como critério uma redução de no mínimo 30% da carga microbiana a cada 24 horas, o que equivale a uma redução de aproximadamente quatro ciclos logarítmicos (99,99%) em 14 dias. Este critério foi baseado no teste farmacopeico de eficácia antimicrobiana, o qual preconiza redução de não menos que dois ciclos logarítmicos (99%) em 14 dias (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2017).

Para a estabilidade química da solução de ácido ascórbico em bancada definiu-se como critério um período de 90 a 120 dias, o que na prática corresponde a um período de validade rotineiramente adotado para formulações magistrais. Para a estabilidade química em estufa definiu-se um período de 7 a 14 dias, tendo como base os resultados experimentais. Neste último caso optou-se por um critério conservador, visto que este modelo foi o que apresentou a menor capacidade de predição (R^2 -pred) em relação aos demais (**Tabela 18**), como já mencionado (vide item 5.3).

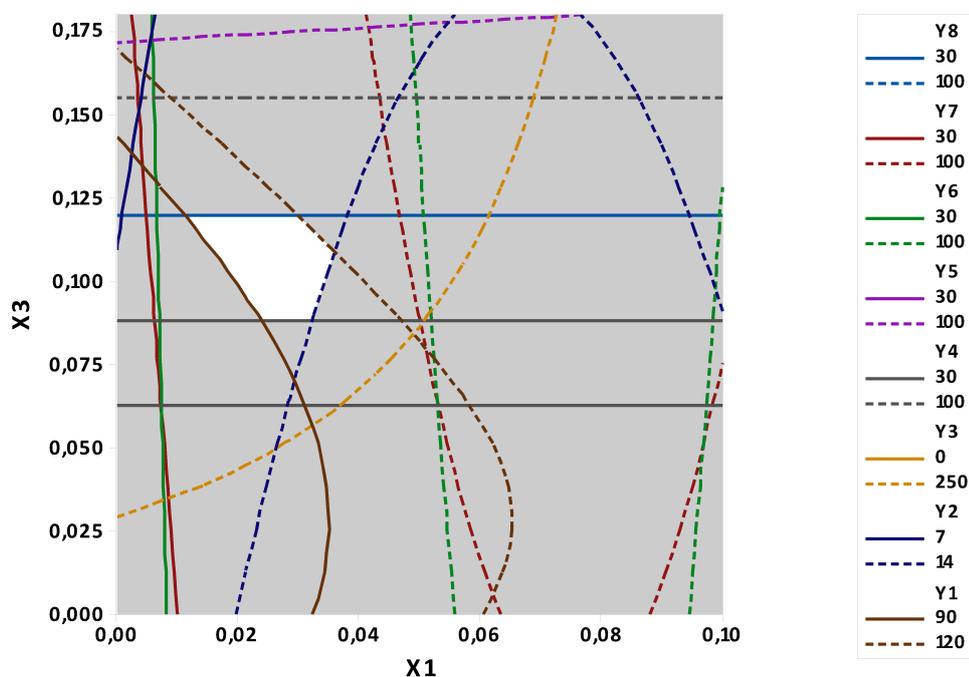
Por meio das funções de desejabilidade e tendo como meta a redução do EDTA e do metilparabeno na composição, verificou-se que a melhor proposta capaz de atender a todos os requisitos de qualidade foi a que manteve as concentrações máximas de desferroxamina, isto é, 0,10% (p/v), eliminou em 100% o metabissulfito da composição e manteve uma concentração de 0,025% (p/v) de EDTA e de metilparabeno, o que representa uma redução de 75% destes adjuvantes.

Como observado anteriormente, tanto o EDTA como o metilparabeno foram fatores importantes para a atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes (vide item 5.2). Além disso, o EDTA foi importante para a estabilidade química do ácido ascórbico (vide item 5.3). No entanto, verificou-se a possibilidade de reduzir estes agentes na composição, o que vai de encontro ao objetivo deste trabalho. Apesar do caráter teórico desta abordagem, tal achado é relevante, pois direciona a construção da qualidade, racionaliza o processo de desenvolvimento e traz novas perspectivas.

A ferramenta de Espaço de Concepção (*Design Space*) permite uma combinação multidimensional dos fatores investigados, sejam eles atributos críticos de materiais ou parâmetros críticos de processos, de modo que as especificações desejadas sejam alcançadas. O Espaço de Concepção consiste em uma representação gráfica que sobrepõe as respostas obtidas em função dos fatores avaliados (CANDIOTI et al., 2014; YU et al., 2014; FUKUDA et al., 2018).

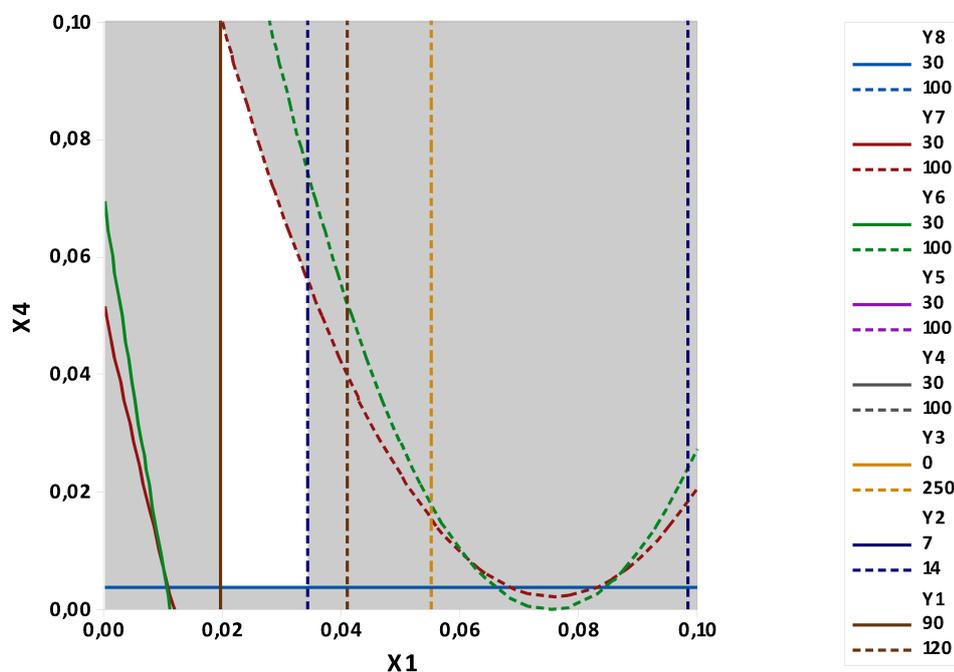
Neste estudo, a ferramenta de Espaço de Concepção foi aplicada na composição otimizada. A sobreposição dos modelos estatísticos resultou em gráficos de linha de contorno para diferentes associações dos adjuvantes (**Figuras 26 a 28**).

Figura 26 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de ácido etilenodiamino tetra-acético e desferroxamina na solução de ácido ascórbico



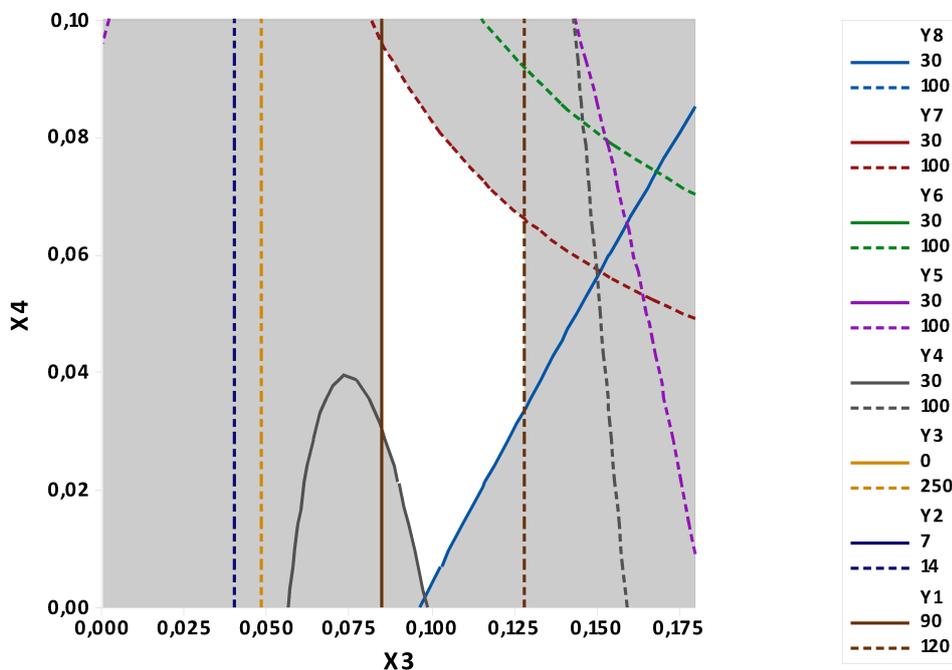
X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); valores fixados em: X2 (metabissulfito) = 0; X4 (metilparabeno) = 0,025% (p/v); Y1 - estabilidade química em bancada (dias); Y2 - estabilidade química em estufa a 40 °C (dias); Y3- taxa de oxidação (ua/minuto); Y4 – % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538); Y5 – % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739); Y6 – % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027); Y7 – % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231); Y8 – % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404)

Figura 27 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de ácido etilenodiamino tetra-acético e metilparabeno na solução de ácido ascórbico



X1 - concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); valores fixados em: X2 (metabissulfito) = 0; X3 (desferroxamina) = 0,1% (p/v); Y1 - estabilidade química em bancada (dias); Y2 - estabilidade química em estufa a 40 °C (dias); Y3- taxa de oxidação (ua/minuto); Y4 – % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538); Y5 – % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739); Y6 – % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027); Y7 – % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231); Y8 – % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404)

Figura 28 – Linha de contorno e espaço de concepção para a associação de desferroxamina e metilparabeno na solução de ácido ascórbico



X3 - concentração de desferroxamina em % (p/v); X4 - concentração de metilparabeno em % (p/v); valores fixados em: X1 (ácido etilenodiamino tetra-acético) = 0,025% (p/v); X2 (metabissulfito) = 0; Y1 - estabilidade química em bancada (dias); Y2 - estabilidade química em estufa a 40 °C (dias); Y3- taxa de oxidação (ua/minuto); Y4 – % de inibição de *S. aureus* (ATCC 6538); Y5 – % de inibição de *E. coli* (ATCC 8739); Y6 – % de inibição de *P. aeruginosa* (ATCC 9027); Y7 – % de inibição de *C. albicans* (ATCC 10231); Y8 – % de inibição de *A. brasiliensis* (ATCC 16404)

Os gráficos de linha de contorno demonstraram as regiões em que múltiplas respostas podem ser atendidas quanto aos critérios de aceitação, permitindo visualizar os intervalos de concentração ótima dos adjuvantes e limites que podem ser melhor trabalhados para alcançar a qualidade pretendida.

A otimização dos resultados mostrou que a desferroxamina pode contribuir na manutenção da estabilidade química e microbiológica da formulação e tais premissas são úteis em estudos de desenvolvimento de produtos. Consideramos ainda que esta proposta pode ser amplamente

explorada, seja para outros ingredientes ativos como para diferentes formas farmacêuticas.

Cabe mencionar que reconhecemos a necessidade de avaliar o desempenho da desferroxamina na estabilidade em longo prazo e na eficácia conservante de formulações farmacêuticas e cosméticas. Além disso, os aspectos toxicológicos e econômicos do uso da desferroxamina como agente adjuvante devem ser levados em conta.

Como discutido ao longo deste trabalho, o emprego de adjuvantes no desenvolvimento de formulações farmacêuticas e cosméticas é determinante para a qualidade do produto final, e conseqüentemente para a eficácia terapêutica pretendida e segurança durante o uso. Os agentes quelantes são adjuvantes importantes para prevenir a oxidação de componentes e evitar reações de degradação que possam ser altamente prejudiciais. A pesquisa de adjuvantes alternativos fundamenta-se basicamente no aprimoramento da estabilidade e desempenho da formulação. Ainda, é questão muito atual que estes ingredientes sejam ambientalmente aceitáveis e apresentem potencial reduzido em causar reações adversas ao usuário.

Ilustra-se que Desai et al. (2005) propuseram como objeto de patente o emprego da desferroxamina como agente adjuvante de uma emulsão injetável de propofol, anestésico geral. Neste caso, a desferroxamina foi considerada um transportador farmacêuticamente aceitável e um agente auxiliar na redução de efeitos indesejáveis decorrentes da administração do medicamento. Além disso, os autores relataram que a desferroxamina demonstrou eficiência na redução do nível de oxidação do propofol e que a quantidade adicionada na composição foi eficaz para inibir o crescimento microbiano (AMERICAN BIOSCIENCE, 2005).

6 CONCLUSÃO

Nas condições testadas foi possível estabelecer as seguintes conclusões relativas ao potencial do mesilato de desferroxamina (DFO) como adjuvante farmacêutico ou cosmético:

- O DFO foi altamente eficaz para bloquear a atividade pró-oxidante do ferro, com atividade muito superior ao EDTA;
- O DFO contribuiu na inibição das bactérias gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Além disso, apresentou sinergia com o metilparabeno, melhorando a resposta inibitória da maioria dos micro-organismos testados, isto é, a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), a bactéria gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) e o bolor *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404);
- Em formulação de solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) exposta a condições críticas de armazenamento, o DFO não foi fator determinante para a estabilidade química;
- Na análise estatística de otimização, o DFO a 0,1% (p/v) possibilitou o cumprimento de critérios desejáveis de qualidade físico-química e microbiológica da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v) e redução considerável nas concentrações de EDTA, metabissulfito de sódio e metilparabeno na composição.

7 REFERÊNCIAS

ABTURYN, E.S. Deciphering chelating agent formulas. *Cosmetics & Toiletries*, July 17, 2013. Disponível em: <<https://www.cosmeticsandtoiletries.com/>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. 1 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. 52p.

AGUILERA, A.; BERMUDEZ, Y.; MARTÍNEZ, E.; MARRERO, M.A.; MUÑOZ, L.; PÁEZ, R.; TAMARGO, B.; HERNÁNDEZ, L.F.; GARCÍA, O. Formulation development of a recombinant Streptokinase suppository for hemorrhoids treatment. *Biotecnología Aplicada*, v.30, n.3, p.182-186, 2013.

AHMAD, S.; RAO, G.S. EDTA: an alternative spectrophotometric reagent for iron estimation. *Journal of Analytical Toxicology*, v.21, n.2, p.172-173, 1997.

AHMED, E.; HOLMSTRÖM, J.M. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology*, v.7, n.3, p.196-208, 2014.

ALAKOMI, H-L.; PAANANEN, A.; SUIHKO, M-L.; HELANDER, I.M.; SAARELA, M. Weakening effect of cell permeabilizers on gram-negative bacteria causing biodeterioration. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.7, p.4695-4703, 2006.

ALI, S.S.; VIDHALE, N.N. Bacterial siderophore and their application: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v.2, n.12, p.303-312, 2013.

AMERICAN BIOSCIENCE, Inc. (US). Neil P. Desai, Andrew Yang, Sherry Xiaopei Ci, Tapas De, Vuong Trieu, Patrick Soon-Shiong, Beals Grim, Bridget, Yao, Qiang. **Composições e métodos de liberação de agentes farmacológicos**. BR n. PI 0317134-5, 09 dez. 2003, 22 nov. 2005.

AQUINO, J.S.; FELIPE, D.F. Avaliação da estabilidade acelerada de diferentes formulações contendo vitamina C. *Revista Saúde e Pesquisa*, v.7, n.1, p.119-128, 2014.

ARCH CHEMICALS, Inc. (US). George Polson, Jody Jourden, Qi Zheng, Regina M. Prioli, Diana Ciccognani, Sungmee Choi. **Biocidals compositions comprising iron chelators**. WO2014059417 A1, 12 out. 2012, 17 abr. 2014.

AYDINOK, Y.; COKER, C.; KAVAKLI, K.; POLAT, A.; NISLI, G.; CETINER, N.; KANTAR, M.; ÇETİNGÜL, N. Urinary zinc excretion and zinc status of patients with beta-thalassemia major. *Biological Trace Element Research*, v.70, n.2, p. 165-172, 1999.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: uma resposta dos microorganismos. *Química Nova*, v.25, n.6b, p.1155-1164, 2002.

BENSON, E.E.; LYNCH P.T.; JONES, J. The use of the iron chelating agent desferrioxamine in rice cell cryopreservation: a novel approach for improving recovery. *Plant Science*, v.110, n.2, p.249-258, 1995.

BHUSHAN, M.; BECK, M.H. Allergic contact dermatitis from disodium ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) in a local anaesthetic. *Contact Dermatitis*, v.38, n.3, p.183, 1998.

BOCCA, B.; PINO, A.; ALIMONTI, A.; FORTE, G. Toxic metals contained in cosmetics: a status report. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.68, n.3, p.447-467, 2014.

BOGDAN, A.R.; MIYAZAWA, M.; HASHIMOTO, K.; TSUJI, Y. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, v.41, n.3, p.274-286, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 jul. 2017. Item 1, p.87.

BRAUN, V.; HANTKE, K. Recent insights into iron import by bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.15, n.2, p.328-334, 2011.

BYRNE, S.L.; KRISHNAMURTHY, D.; WESSLING-RESNICK, M. Pharmacology of iron transport. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.53, 2013, p.17-36, 2013.

CANDIOTI, L.V.; ZAN, M.M.D.; CÁMARA, M.S.; GOICOECHEA, H.C. Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, v.124, p.123-138, 15 June 2014.

CHATURVEDI, S.; DAVE, P.N. Removal of iron for safe drinking water. *Desalination*, v.303, p.1-11, 1 October 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada**. 6. ed. Brasília: ANVISA, 2003. 81p.

de GROOT, A.C. Contact allergy to EDTA in a topical corticosteroid preparation. *Contact Dermatitis*, v.15, n.4, p.250-252, 1986.

DESFERAL. Bula do profissional. São Paulo: Novartis Biociências S.A., Data do expediente 13/07/2018. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp>. Acesso em: 16 fev. 2019.

DEZA, G.; GIMÉNEZ-ARNAU, A.M. Allergic contact dermatitis in preservatives: current standing and future options. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology*, v.17, n.4, p.263-268, 2017.

D'ONOFRIO, A.; CRAWFORD, J.M.; STEWART, E.J.; WITT, K.; GAVRISH, E.; EPSTEIN, S.; CLARDY, J.; LEWIS, K. Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chemistry & Biology*, v.17, n.3, p.254-264, 2010.

DUSCHER, D.; NEOFYTOU, E.; WONG, V.W.; MAAN, Z.N.; RENNERT, R.C.; INAYATHULLAH, M.; JANUSZYK, M.; RODRIGUES, M.; MALKOVSKIY, A.V.; WHITMORE, A.J.; WALMSLEY, G.G.; GALVEZ, M.G.; WHITTAM, A.J.; BROWNLEE, M.; RAJADAS, J.; GURTNER, G.C. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.112, n.1, p.94-99, 2015.

ELDER, D.P.; KUENTZ, M.; HOLM, R. Pharmaceutical excipients - quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.87, p.88-99, 25 May 2016.

ESPOSITO, B.P.; BREUER, W.; SIRANKAPRACHA, P.; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z.I. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*, v.102, n.7, p.2670-2677, 2003.

FARDEAU, S.; MULLIÉ, C.; DASSONVILLE-KLIMPT, A.; AUDIC, N.; SASAKI, A.; SONNET, P. Bacterial iron uptake: a promising solution against multidrug resistant bacteria. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances Vol. 2**. Microbiology Series Nº 3. Badajoz: Formatex Research Center, 2011. cap. Antimicrobial resistance, p.695-705.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Fiocruz, 2010. pt.1 e 2.

FARRIS, P.K. Topical vitamin C: a useful agent for treating photoaging and other dermatologic conditions. *Dermatologic Surgery*, v.31, n.7, p.814-818, 2005.

FAZARY, A.E.; AL-SHIHRI, A.S. Deferoxamine B from *Streptomyces pilosus*; Bioproduction, Characterization, Complexation, and Biodegradation Studies. Conference Paper. In: BIOENGINEERING CONFERENCE PROCEEDING, 2014, Istanbul. ENG '14: DAKAM Publishing, 2014. p.87-93.

FLEMING, R.E.; PONKA, P. Iron overload in human disease. *The New England Journal of Medicine*, v.366, n.4, p.348-359, 2012.

FORNARO, A.; COICHEV, N. Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova*, v.21, n.5, p.642-650, 1998.

FUKUDA, I.M.; PINTO, C.F.F.; MOREIRA, C.S.; SAVIANO, A.M.; LOURENÇO, F.R. Design of Experiments (DoE) applied to Pharmaceutical and Analytical Quality by Design (QbD). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.54, sp. iss., p.1-16, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902018000001006>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

GENUIS, S.J.; BIRKHOLZ, D.; CURTIS, L.; SANDAU, C. Paraben levels in an urban community of Western Canada. *ISRN Toxicology*, v.2013, Article ID 507897, p.1-8, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2013/507897>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

GIORGIO, A.; MIELE, L.; BONIS, S.D.; CONFORTI, I.; PALMIERO, L.; GUIDA, M.; LIBRALATO, G.; ALIBERTI, F. Microbiological stability of cosmetics by using challenge test procedure. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v.12, n.1, p. 23-28, 2018.

GOKARN, K.; PAL, R.B. Preliminary evaluation of anti-tuberculosis potential of siderophores against drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by mycobacteria growth indicator tube-drug sensitivity test. *BMC Complementary Alternative Medicine*, v.17:161, p.1-8, 21 March 2017.

GOKARN, K.; PAL, R.B. Activity of siderophores against drug-resistant Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Infection and Drug Resistance*, v.11, p.61-75, 9 January 2018.

GÓRSKA, A.; SLODERBACH, A.; MARSZATT, M.P. Siderophore-drug complexes: potential medicinal applications of the 'Trojan horse' strategy. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.35, n.9, p.442-449, 2014.

GOSWAMI, D.; MACHINI, M.T.; SILVESTRE, D.M.; NOMURA, C.S.; ESPOSITO, B.P. Cell penetrating peptide (CPP)-conjugated desferrioxamine for enhanced neuroprotection: synthesis and *in vitro* evaluation. *Bioconjugate Chemistry*, v.25, n.11, p.2067-2080, 2014.

HALLA, N.; FERNANDES, I.P.; HELENO, S.A.; COSTA, P.; BOUCHERIT-OTMANI, Z.; BOUCHEIRT, K.; RODRIGUES, A.E.; FERREIRA, I.C.F.R.; BARREIRO, M.F. Cosmetics preservation: a review on present strategies. *Molecules*, v.23, n.7, p.1-41, 2018.

HAMAN, C.; DAUCHY, X.; ROSIN, C.; MUNOZ, JF. Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. *Water Research*, v.68, p.1-11, 1 January 2015.

HARRISON, F.; BUCKLING, A. Siderophore production and biofilm formation as linked social traits. *The ISME Journal*, v.3, n.5, p.632-634, 2009.

HART, J.R. EDTA-type chelating agents in everyday consumer products: Some medicinal and personal care products. *Journal of Chemical Education*, v.61, n.12, p.1060-1061, 1984.

HARTZEN, S.H.; FRIMODT-MØLLER, N.; THOMSEN, V.F. The antibacterial activity of a siderophore. 1. *In vitro* activity of deferoxamine alone and in combination with ascorbic acid on *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.97, n.5; p.419-424, 1989.

HARTZEN, S.H.; FRIMODT-MØLLER, N.; THOMSEN, V.F. The antibacterial activity of a siderophore. 2. The influence of deferoxamine alone and combined with ascorbic acid on the activity of antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.99, n.10; p.879-886, 1991.

HARTZEN, S.H.; FRIMODT-MØLLER, N.; THOMSEN, V.F. The antibacterial activity of a siderophore. 3. The activity of deferoxamine *in vitro* and its influence on the effect of antibiotics against *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* and coagulase-negative staphylococci. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v.102, n.3, p.219-226, 1994.

HELI, H.; MIRTORABI, S.; KARIMIAN, K. Advances in iron chelation: an update. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v.21, n.6, p.819-856, 2011.

HERMAN, A. Antimicrobial ingredients as preservative booster and components of self-preserving cosmetic products. *Current Microbiology*, p 1-11, 12 April 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00284-018-1492-2>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

HIDER, R.C.; KONG, X. Chemistry and biology of siderophores. *Natural Product Reports*, v.27, n.5, p.637-657, 2010.

HIDER, R. Recent developments centered on orally active iron chelators. *Thalassemia Reports*, v.4, n.2261, p.19-27, 2014.

HOLBEIN, B.E.; ORDUÑA, R.M. Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*. *FEMS Microbiology Letters*, v.307, n.1, p.19-24, 2010.

HOU, Z.; NIE, C.; SI, Z.; MA, Y. Deferoxamine enhances neovascularization and accelerates wound healing in diabetic rats via the accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α . *Diabetes Research and Clinical Practice*, v.101, n.1, p.62-71, 2013.

HUAYHUAZ, J.A.A.; VITORINO, H.A.; CAMPOS, O.S.; SERRANO, S.H.P.; KANEKO, T.M.; ESPÓSITO, B.P. Desferrioxamine and desferrioxamine-caffeine as carriers of aluminum and gallium to microbes via the Trojan Horse Effect. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.41, p.16-22, May 2017.

IHNAT, P.M.; VENNERSTROM, J.L.; ROBINSON, D.H. Solution equilibria of deferoxamine amides. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.91, n.7, p.1733-1741, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. ZENEON, O.; PASCUET, N.S.; TIGLEA, P. (Coord.). 1 ed. digital. São Paulo: SES-CCD-IAL, 2008. cap.364/IV, p.670-672.

JUNGMAN, E.; LAUGEL, C.; BAILLET-GUFFROY, A. Assessing the safety of parabens: percutaneous penetration and risk analysis. *Cosmetics & Toiletries*, November 14, 2013. Disponível em: <<https://www.cosmeticsandtoiletries.com/>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

JUZENIENE, A.; JUZENAS, P.; IANI, V.; MOAN, J. Topical applications of iron chelators in photosensitization. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v.6, n.12, p.1268-1274, 2007.

KHAN, M.R.; ALOTHMAN, Z.A.; NAUSHAD, M.; GHFAR, A.A.; WABAIDUR, S.M. Simultaneous analysis of vitamin C and aspirin in aspirin C effervescent tablets by high performance liquid chromatography-photodiode array detector. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v.35, n.17, p.2454-2461, 2012.

KIKUCHI, T.; SUZUKI, M.; KUSAI, A.; ISEKI, K.; SASAKI, H. Synergistic effect of EDTA and boric acid on corneal penetration of CS-088. *International Journal of Pharmaceutics*, v.16, n.290 (1-2), p.83-89, 2005.

KIMURA, M.; KAWADA, A. Contact dermatitis due to trisodium ethylenediaminetetra-acetic acid (EDTA) in a cosmetic lotion. *Contact Dermatitis*, v.41, n.6, p.341, 1999.

KLINE, T.; FROMHOLD, M.; MCKENNON, T.E.; CAI, S.; TREIBERG, J.; IHLE, N.; SHERMAN, D.; SCHWAN, W.; HICKEY, M.J.; WARRENER, P.; WITTE, P.R.; BRODY, L.L.; GOLTRY, L.; BARKER, L.M.; ANDERSON, S.U.; TANAKA, S.K.; SHAWAR, R.M.; NGUYEN, L.Y.; LANGHORNE, M.; BIGELOW, A.; EMBUSCADO, L.; NAEEMI, E. Antimicrobial effects of novel siderophores linked to beta-lactam antibiotics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.8, n.1, p.73-93, 2000.

KOBAYAKAWA, F.; KODANI, S. Screening of Streptomyces for production of desferrioxamines. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v.6, n.4, p.1553-1558, 2012.

KONTOGHIORGHES, G.J.; KOLNAGOU, A.; SKIADA, A.; PETRIKKOS, G. The role of iron and chelators on infections in iron overload and non iron loaded conditions: prospects for the design of new antimicrobial therapies. *Hemoglobin*, v.34, n.3, p.227-239, 2010.

KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v.1778, n.9, p.1781-1804, 2008.

KROKIDIS, A.A.; MEGOULAS, N.C.; KOUPPARIS, M.A. EDTA determination in pharmaceutical formulations and canned foods based on ion chromatography with suppressed conductimetric detection. *Analytica Chimica Acta*, v.535, n.1-2, p.57-63, 2005.

KRUYSWIJK, M.R.J.; POLAK, B.C.P. Contactallergie na toepassing van oogdruppels en oogzalven. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, v.124, p.1449-1452, 1980. *apud* de GROOT, A.C. Contact allergy to EDTA in a topical corticosteroid preparation. *Contact Dermatitis*, v.15, n.4, p.250-252, 1986.

KUVICHKINA, T.N.; KAPARULLINA, E.N.; DORONINA, N.V.; TROTSENKO, IuA.; RESHETILOV, A.N. Degradation of the EDTA and EDTA complexes with metals by immobilized cells of chelativorans oligotrophicus LPM-4 bacteria. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v.48, n.6, p.564-568, 2012.

LABORDE-CASTÉROT, H.; VILLA, A.F.; ROSENBERG, N.; DUPONT, P.; LEE, H.M.; GARNIER, R. Occupational rhinitis and asthma due to EDTA-containing detergents or disinfectants. *American Journal of Industrial Medicine*, v.55, n.8, p.677-682, 2012.

LAI, Y.W.; CAMPBELL, L.T.; WILKINS, M.R.; PANG, C.N.; CHEN, S.; CARTER, D.A. Synergy and antagonism between iron chelators and antifungal drugs in *Cryptococcus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.48, n.4, p.388-394, 2016.

LANIGAN, R.S.; YAMARIK, T.A. Final report on the safety assessment of EDTA, calcium disodium EDTA, Diammonium EDTA, Dipotassium EDTA, Disodium EDTA, TEA-EDTA, Tetrasodium EDTA, Tripotassium EDTA, Trisodium EDTA, HEDTA, and Trisodium HEDTA. *International Journal of Toxicology*, v.21, n.2, p.95-142, 2002.

LEE, W.; van BAALEN, M.; JANSEN, V.A. An evolutionary mechanism for diversity in siderophore-producing bacteria. *Ecology Letters*, v.15, n.2, p.119-125, 2012.

LI, B.; ESPÓSITO, B.P.; WANG, S.; ZHANG, J.; XU, M.; ZHANG, S.; ZHANG, Z.; LIU, S. Desferrioxamine-caffeine shows improved efficacy in chelating iron and depleting cancer stem cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.52, p.232-238, March 2019.

LUIZA, V.L.; CASTRO, C.G.S.O.; NUNES, J.M. Aquisição de medicamentos no setor público: o binômio qualidade-custo. *Cadernos de Saúde Pública*, v.15, n.4, p.769-776, 1999.

LUNA, I.R.P.; DIAS, D.R.C.; LUZ, M.C.L.; PETRBU, M.M.V.; CABRAL, P.C. Consumo de vitamina C e risco de escorbuto em universitários. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, v.26, n.3, p.153-157, 2011.

LUNDOV, M.D.; MOESBY, L.; ZACHARIAE, C.; JOHANSEN, J.D. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis*, v.60, n.2, p.70-78, 2009.

MALIK, Z.; KOSTENICH, G.; ROITMAN, L.; EHRENBERG, B.; ORENSTEIN, A. Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v.28, n.3, p.213-218, 1995.

MARTELL, A.E.; MOTEKAITIS, R.J.; CHEN, D.; HANCOCK, R.D.; MCMANUS, D. Selection of new Fe(III)/Fe(II) chelating agents as catalysts for the oxidation of hydrogen sulfide to sulfur by air. *Canadian Journal of Chemistry*, v.74, n.10, p.1872-1879, 1996.

MARX, J.J.M. Iron and infection: competition between host and microbes for a precious element. *Best Practice & Research in Clinical Haematology*, v.15, n.2, p.411-426, 2002.

MATTOS, A.L.C.; CONSTANTINO, V.R.L.; COUTO, R.A.A.; PINTO, D.M.L.; KANEKO, T.M.; ESPÓSITO, B.P. Desferrioxamine-cadmium as a 'Trojan horse' for the delivery of Cd to bacteria and fungi. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.27, n.2, p.103-108, 2013.

MICROMEDEX [Micromedex 2.0 Internet database]. Micromedex Solutions, Truven Health Analytics LLC, Michigan, Estados Unidos, 2018. Disponível em: <<http://www.micromedexsolutions.com/micromedex2/librarian/CS/469>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

NAGOBA, B.; VEDPATHAK, D. Medical applications of siderophores. *European Journal of General Medicine*, v.8, n.3, p.229-235, 2011.

NARAYANAN, M.; SEKAR, P.; PASUPATHI, M.; MUKHOPADHYAY, T. Self-preserving personal care products. *International Journal of Cosmetic Science*, v.39, n.3, p.301-309, 2017.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3. ed. Campinas: Editora Unicamp, 2007. 480p.

NEUFELD, E.J. Oral chelators deferasirox and deferiprone for transfusional iron overload in thalassemia major: new data, new questions. *Blood*, v.107, n.9, p.3436-3441, 2006.

OSTROSKY, E.A.; MARCONDES, E.M.; NISHIKAWA, S.O.; LOPES, P.S.; VARCA, G.H.; PINTO, T.J.A; CONSIGLIERI, T.V.; BABY, A.R.; VELASCO, M.V.; KANEKO, T.M. *Rubus rosaefolius* extract as a natural preservative candidate in topical formulations. *AAPS PharmSciTech*, v.12, n.2, p.732-737, 2011.

OVIEDO, C.; RODRÍGUEZ, J. EDTA: the chelating agent under environmental scrutiny. *Química Nova*, v.26, n.6, p.901-905, 2003.

PAGE, M.G.P. Siderophore conjugates. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1277, n.1, p.115-126, 2013.

PAHWA, R.; PIPLANI, M.; SHARMA, P.C.; NANDA, A. Validation aspects of water treatment systems for pharmaceutical products. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, v.9, n.1, p.81-90, 2010.

PIERWOLA, A.; KRUPINSKI, T.; ZALUPSKI, P.; CHIARELLI, M.; CASTIGNETTI, D. Degradation pathway and generation of monohydroxamic acids from the trihydroxamate siderophore deferoxamine B. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, n.2, p.831-836, 2004.

PIFFERI, G.; SANTORO, P.; PEDRANI, M. Quality and functionality of excipients. *Il Farmaco*, v.54, n.1-2, p.1-14, 1999.

PIFFERI, G.; RESTANI, P. The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco*, v.58, n.8, p.541-550, 2003.

PINNELL, S.R.; MADEY, D.L. The benefits of topical vitamin C (L-ascorbic acid) for skin care and UV protection. *Journal of Applied Cosmetology*, v.18, n.4, p.126-134, 1999.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; PINTO, A.F. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 780p.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica, II volume**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. 663p.

PRUITT, C.; WARSHAW, E.M. Allergic contact dermatitis from ethylenediaminetetraacetic acid. *Dermatitis*, v.21, n.2, p.121-122, 2010.

QIU, D.H.; HUANG, Z.L.; ZHOU, T.; SHEN, C.; HIDER, R.C. *In vitro* inhibition of bacterial growth by iron chelators. *FEMS Microbiology Letters*, v.314, n.2, p.107-111, 2011.

RAJAN, J.P.; CORNELL, R.; WHITE, A.A. A case of systemic contact dermatitis secondary to edetate disodium. *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, v.3, n.4, p.607-608, 2015.

RAYMOND, J.Z.; CROSS, P.R. EDTA: preservative dermatitis. *Archives of Dermatology*, v.100, n.4, p.436-438, 1969. *apud* de GROOT, A.C. Contact allergy to EDTA in a topical corticosteroid preparation. *Contact Dermatitis*, v.15, n.4, p.250-252, 1986.

RUSSO, P.A.; BANOVIC, T.; WIESE, M.D.; WHYTE, A.F.; SMITH, W.B. Systemic allergy to EDTA in local anesthetic and radiocontrast media. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, v.2, n.2, p.225-229, 2014.

SAHU, G.K.; SINDHU, S.S. Disease control and plant growth promotion of green gram by siderophore producing *Pseudomonas* sp. *Research Journal of Microbiology*, v.6, n.10, p.735-749, 2011.

SAKUDA, T.M. **Otimização de suspensões de benzoilmetronidazol**. 1993. 128 p. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1993.

SÁNCHEZ-PEDREÑO, P.; GARCÍA-BRAVO, B.; FRÍAS-INIESTA, J. Contact allergy to tetrasodium EDTA in a sunscreen. *Contact Dermatitis*, v.61, n.2, p.125-126, 2009.

SCHALK, I.J.; HANNAUER, M.; BRAUD, A. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. *Environmental Microbiology*, v.13, n.11, p.2844-2854, 2011.

SCHMIDT, C.K.; BRAUCH, H.J. Impact of aminopolycarboxylates on aquatic organisms and eutrophication: overview of available data. *Environmental Toxicology*, v.19, n.6, p.620-637, 2004.

SIEGERT, W. Boosting the antimicrobial efficiency of multifunctional additives by chelating agents. *SOFW Journal*, v.140, n.1/2, p.1-6, 2014.

SOGA, F.; IZAWA, K.; INOUE, T.; KATOH, N.; KISHIMOTO, S. Contact dermatitis due to disodium ethylenediamine-tetraacetic acid in cosmetics and shampoo. *Contact Dermatitis*, v.49, n.2, p.105, 2003.

STAMFORD, N.P.J. Stability, transdermal penetration, and cutaneous effects of ascorbic acid and its derivatives. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v.11, n.4, p.310-317, 2012.

SULTAN, S.; IRFAN, S.M.; KAKAR, J.; ZEESHAN, R. Effect of iron chelator desferrioxamine on serum zinc levels in patients with beta thalassemia major. *The Malaysian Journal of Pathology*, v. 37, n.1, p.35-38, 2015.

THOMPSON, M.G.; COREY, B.W.; SI, Y.; CRAFT, D.W.; ZURAWSKI, D.V. Antibacterial activities of iron chelators against common nosocomial pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, n.10, p.5419-5421, 2012.

UNITED STATES PATENT. Dennis F. Gross. Skin care products containing multiple enhancers. US 8,980,344 B2, May 7, 2009, Mar. 17, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. 37th. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention, 2017.

van ASBECK, B.S.; MARCELIS, J.H.; MARX, J.J.; STRUYVENBERG, A.; van KATS, J.H.; VERHOEF, J. Inhibition of bacterial multiplication by the iron chelator deferoxamine: potentiating effect of ascorbic acid. *European Journal of Clinical Microbiology*, v.2, n.5, p.426-431, 1983a.

van ASBECK, B.S.; MARCELIS, J.H.; van KATS, J.H.; JAARSMA, E.Y.; VERHOEF, J. Synergy between the iron chelator deferoxamine and the antimicrobial agents gentamicin, chloramphenicol, cefalothin, cefotiam and cefsulodin. *European Journal of Clinical Microbiology*, v.2, n.5, p.432-438, 1983b.

VARVARESOU, A.; PAPAGEORGIOU, S.; TSIRIVAS, E.; PROTOPAPA, E.; KINTZIOU, H.; KEFALA, V.; DEMETZOS, C. Self-preserving cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, v.1, n.3, p.163-167, 2009.

VILLELA, G.G.; PECCI, J.D. Nota sobre a dosagem iodométrica da vitamina C nos frutos cítricos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.39, n.3, p.291-295, 1943.

VISCA, P.; BONCHI, C.; MINANDRI, F.; FRANGIPANI, E.; IMPERI, F. The dual personality of iron chelators: growth inhibitors or promoters? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.57, n.5, p.2432-2433, 2013.

WINKELMANN, G.; SCHMIDTKUNZ, K.; RAINEY, F.A. Characterization of a novel *Spirillum*-like bacterium that degrades ferrioxamine-type siderophores. *Biometals*, v.9, n.1, p.78-83, 1996.

WINKELMANN, G.; BUSCH, B.; HARTMANN, A.; KIRCHHOF, G.; SÜSSMUTH, R.; JUNG, G. Degradation of desferrioxamines by *Azospirillum irakense*: assignment of metabolites by HPLC/electrospray mass spectrometry. *Biometals*, v.12, n.3, p.255-264, 1999.

WOLLEIN, U.; BAUER, B.; HABERNEGG, R.; SCHRAMEK, N. Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products - A market surveillance study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.77, p.100-105, 18 September 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Edetic acid (EDTA) in Drinking-water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Geneva: World Health Organization, 1998. 15p. Disponível em: <https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/edeticacid.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2019.

XU, B.; KONG, X.; ZHOU, T.; QIU, D.; CHEN, Y.; LIU, M.; YANG, R.; HIDER, R.C. Synthesis, iron(III)-binding affinity and *in vitro* evaluation of 3-hydroxypyridin-4-one hexadentate ligands as potential antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.21, n.21, p.6376-6380, 2011.

YAMAMOTO, H.; TAMURA, I.; HIRATA, Y.; KATO, J.; KAGOTA, K.; KATSUKI, S.; YAMAMOTO, A.; KAGAMI, Y.; TATARAZAKO, N. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: individual and additive approach. *Science of The Total Environment*, v.410-411, p.102-111, 1 December 2011.

YU, L.X.; AMIDON, G.; KHAN, M.A.; HOAG, S.W.; POLLI, J.; RAJU, G.K.; WOODCOCK, J. Understanding pharmaceutical quality by design. *The AAPS Journal*, v.16, n.4, p.771-783, 2014.

8 APÊNDICES

Esta seção contém na sequência o material suplementar citado nos seguintes itens de resultados e discussão:

- **5.1 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes**

Apêndice A – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

Apêndice B – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

- **5.2 Avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes**

Apêndice C – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

Apêndice D – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Escherichia coli* (ATCC 8739)

Apêndice E – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

Apêndice F – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Candida albicans* (ATCC 10231)

Apêndice G – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

Apêndice H – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538)

Apêndice I – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Escherichia coli* (ATCC 8739)

Apêndice J – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027)

Apêndice K – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Candida albicans* (ATCC 10231)

Apêndice L – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404)

▪ **5.3 Avaliação da estabilidade química das soluções de ácido ascórbico**

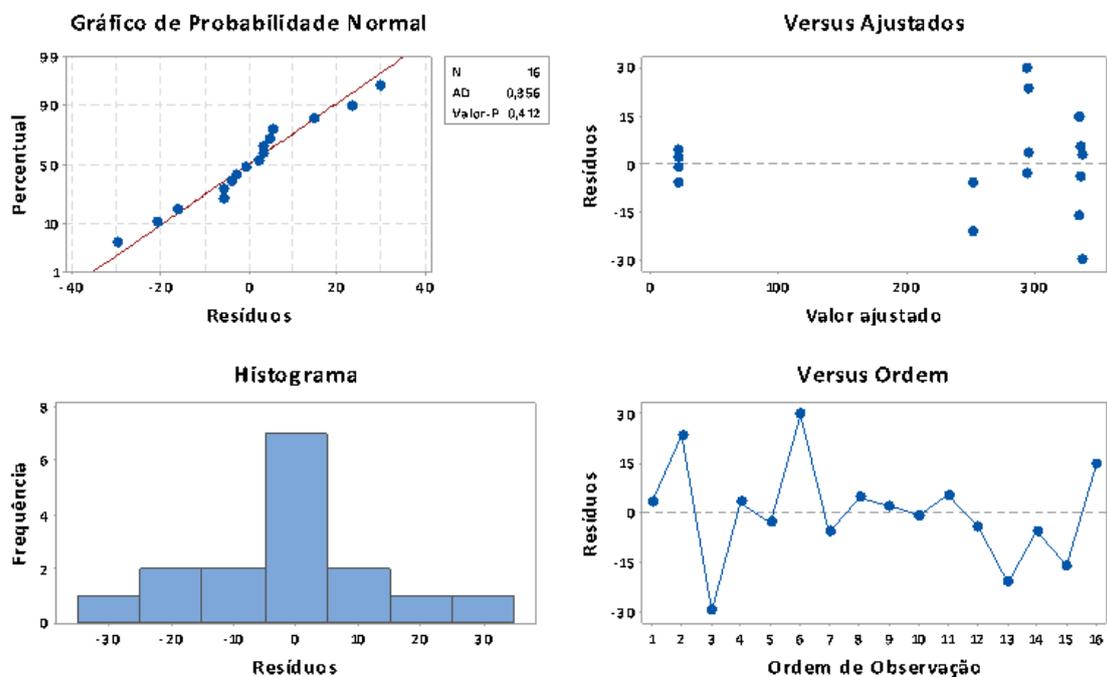
Apêndice M – Resíduo de resposta referente ao estudo de estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v), na condição de bancada

Apêndice N – Resíduo de resposta referente ao estudo de estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v), na condição de estufa

Apêndice O – Estabilidade do ácido ascórbico em bancada e em estufa para concentrações equimolares de EDTA e desferroxamina, na ausência ou presença de metabissulfito de sódio

Apêndice A – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

Gráficos de Resíduo de Fluor/Min



Fluor/Min = atividade antioxidante em intensidade de fluorescência por minuto

Apêndice B – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antioxidante dos sistemas adjuvantes

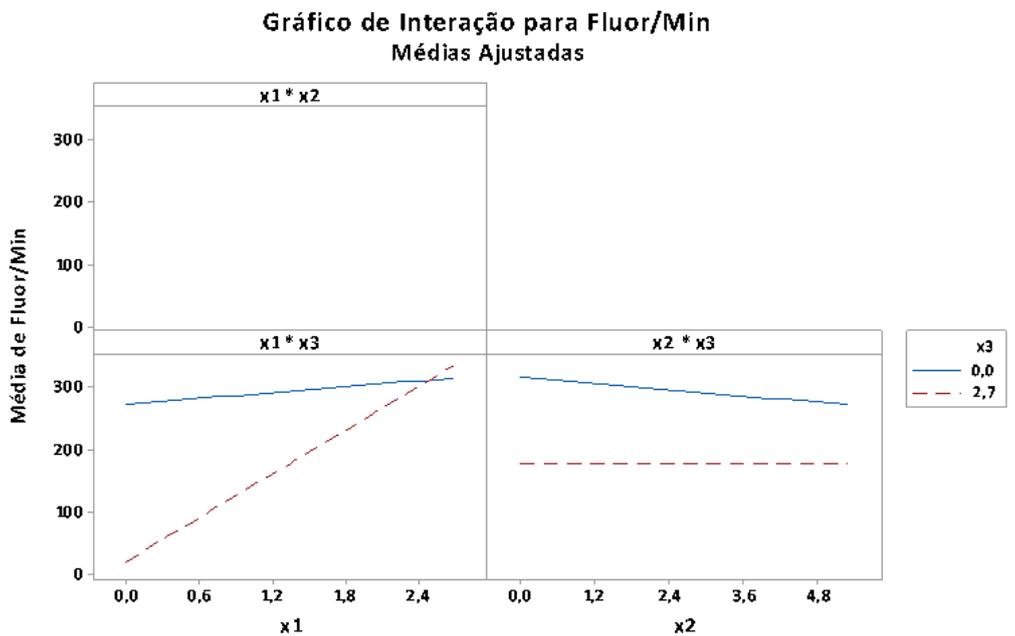
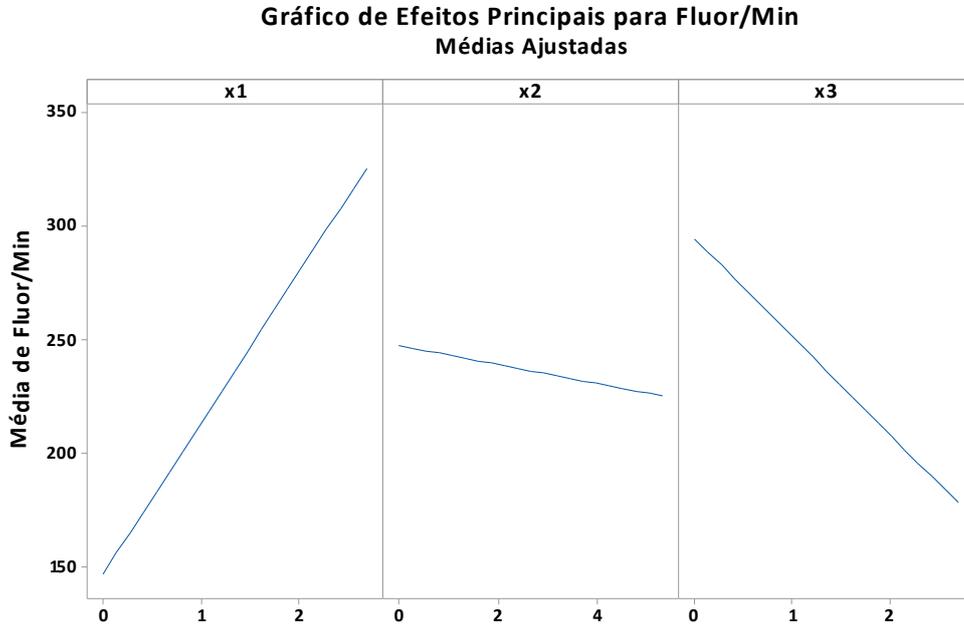
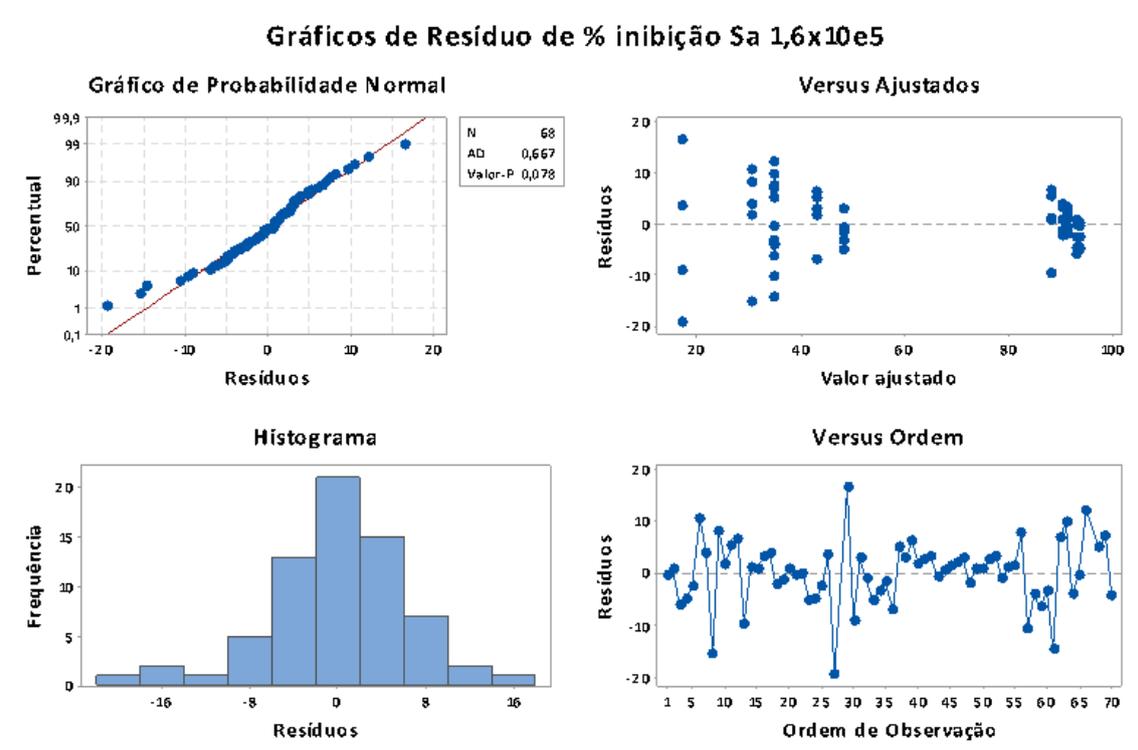


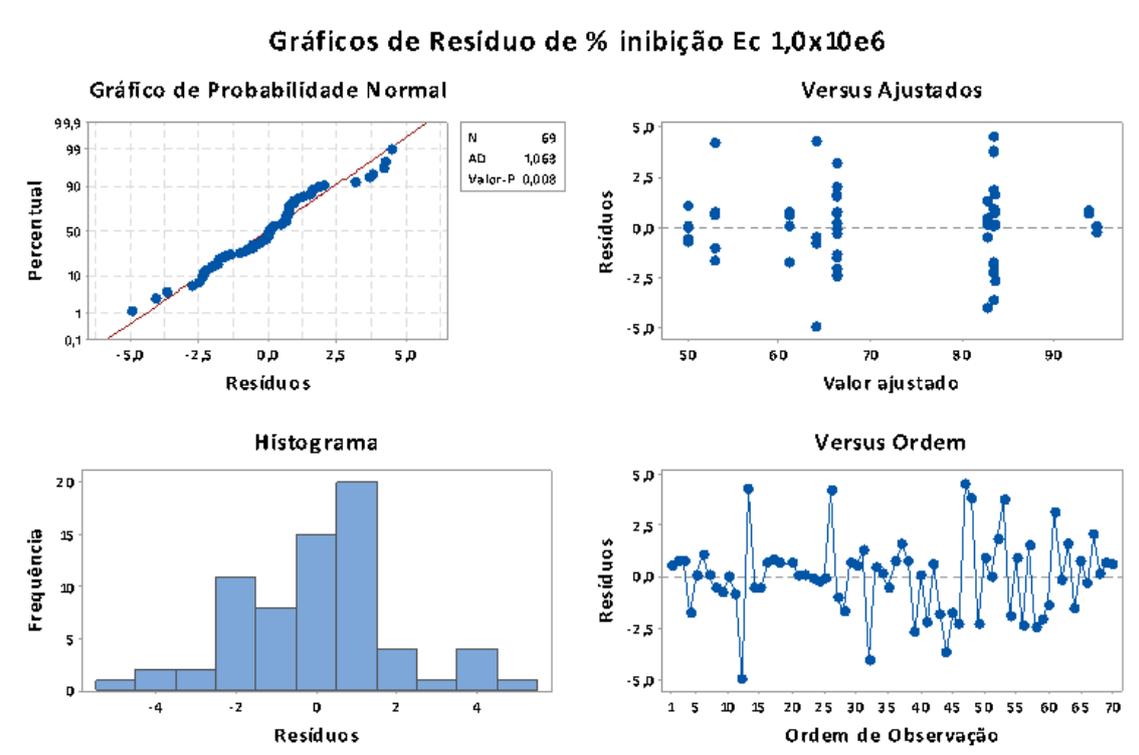
Gráfico da Concentração (μM) x Atividade antioxidante (intensidade de fluorescência/minuto); x1 = EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); x2 = metabissulfito; x3 = desferroxamina

Apêndice C – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



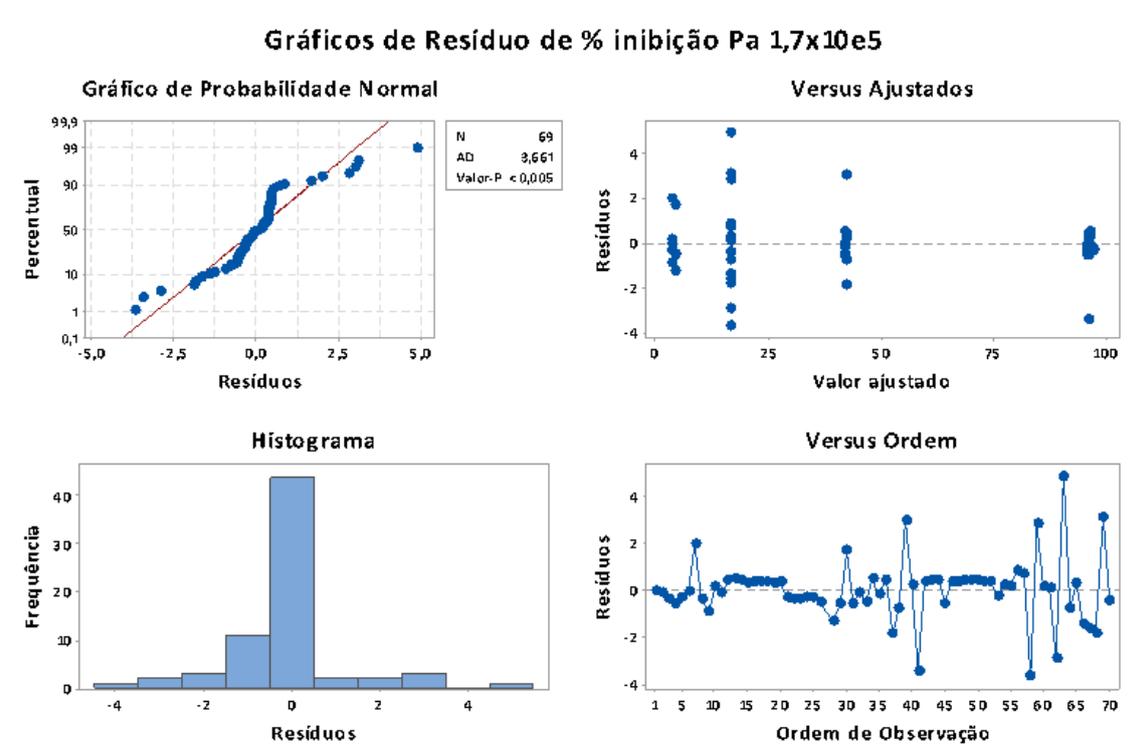
Sa $1,6 \times 10^5$ = % de inibição de *S. aureus* $1,6 \times 10^5$ UFC/poço

Apêndice D – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Escherichia coli* ATCC 8739



Ec 1,0x10e6 = % de inibição de *E. coli* 1,0 x 10⁶ UFC/poço

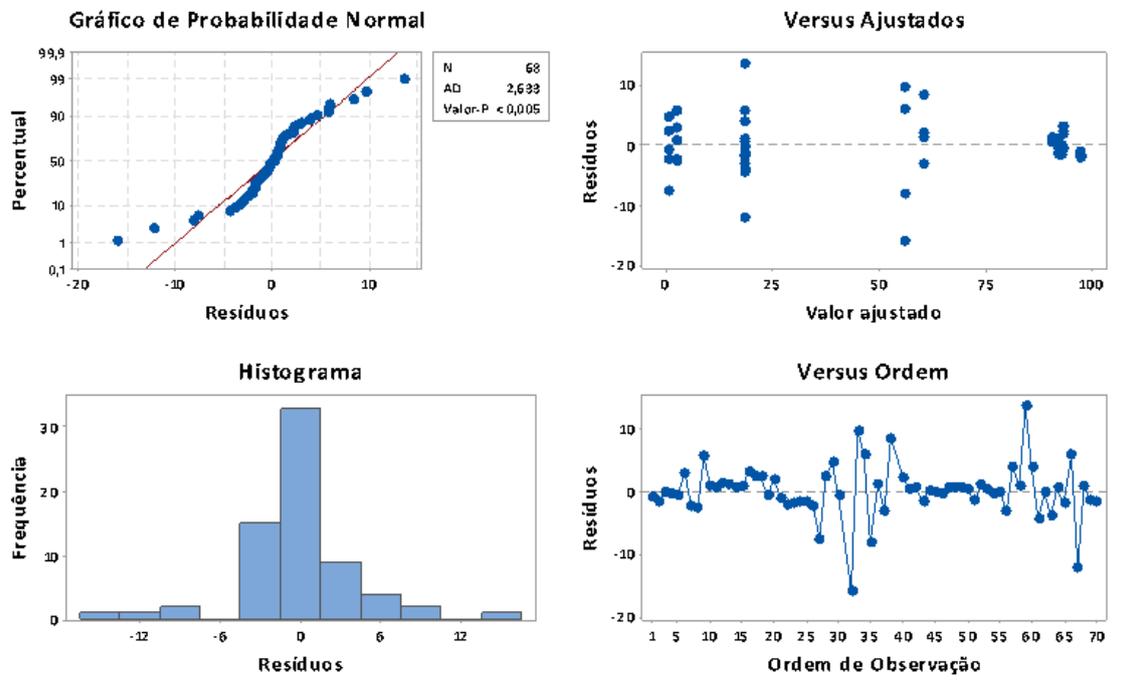
Apêndice E – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027



Pa 1,7x10e5 = % de inibição de *P. aeruginosa* $1,7 \times 10^5$ UFC/poço

Apêndice F – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Candida albicans* ATCC 10231

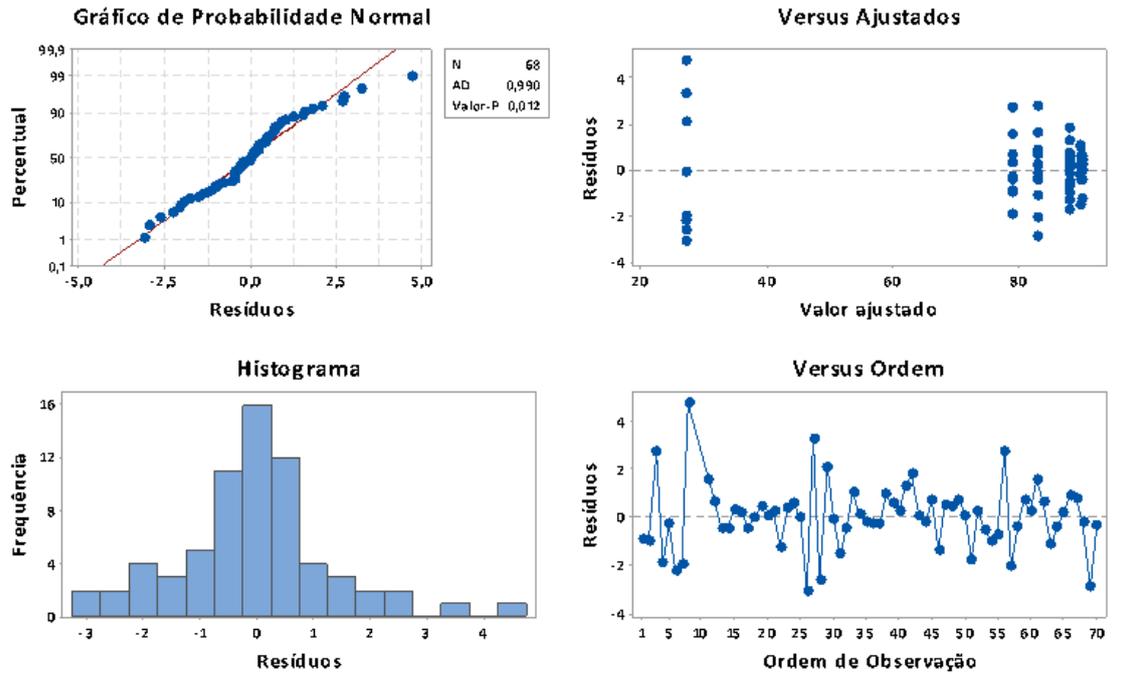
Gráficos de Resíduo de % inibição Ca $2,2 \times 10^4$



Ca $2,2 \times 10^4$ = % de inibição de *C. albicans* $2,2 \times 10^4$ UFC/poço

Apêndice G – Resíduo de resposta referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

Gráficos de Resíduo de % inibição Ab 1,3x10e4



Ab 1,3x10e4 = % de inibição de *A. brasiliensis* $1,3 \times 10^4$ UFC/poço

Apêndice H – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Gráfico de Efeitos Principais para Sa 1,6x10e5
Médias Ajustadas

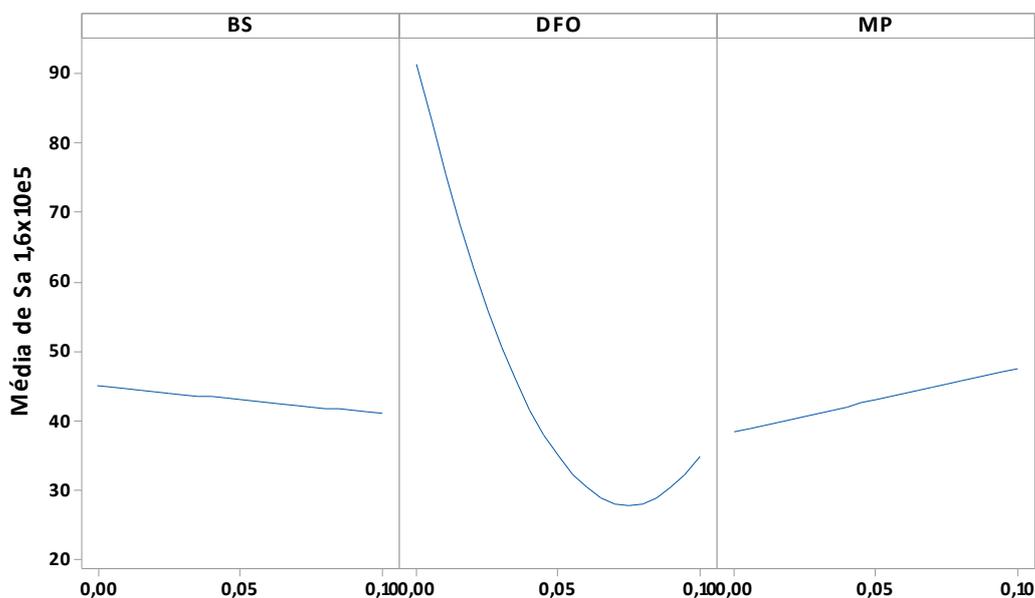


Gráfico de Interação para Sa 1,6x10e5
Médias Ajustadas

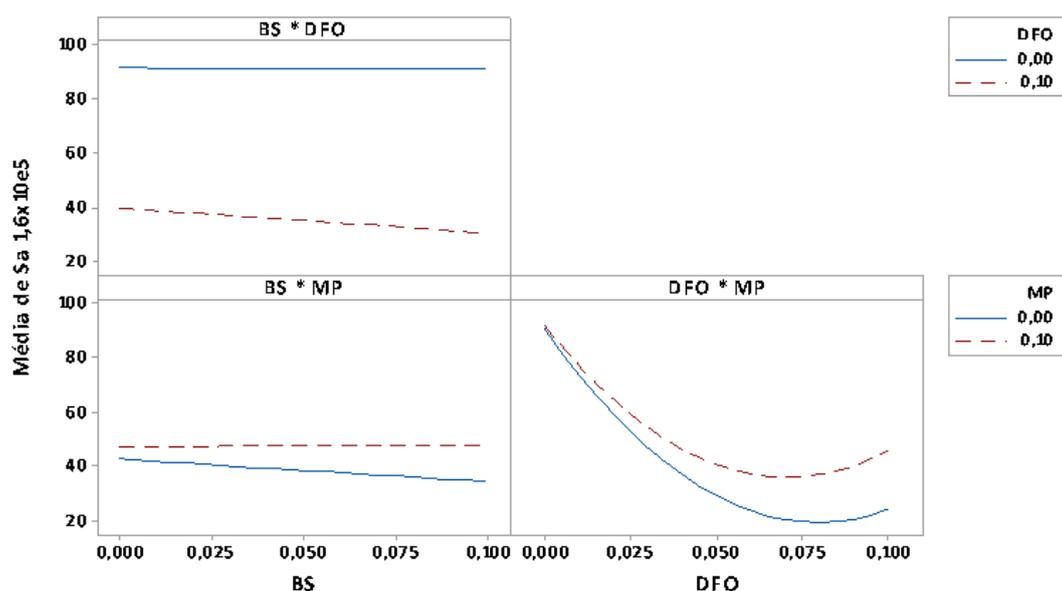


Gráfico da Concentração em % (p/v) x Inibição do crescimento microbiano (%); Sa 1,6x10e5 = *S. aureus* 1,6 x 10⁵ UFC/poço; BS = metabissulfito; DFO = desferroxamina; MP = metilparabeno

Apêndice I – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Escherichia coli* ATCC 8739

Gráfico de Efeitos Principais para Ec 1,0x10e6
Médias Ajustadas

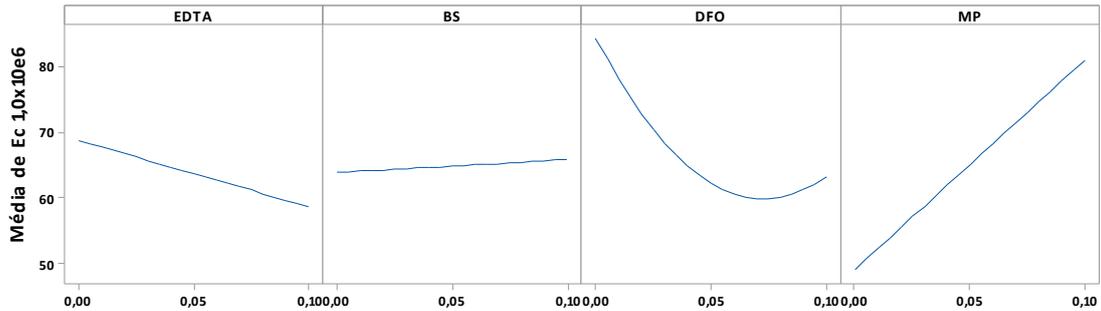


Gráfico de Interação para Ec 1,0x10e6
Médias Ajustadas

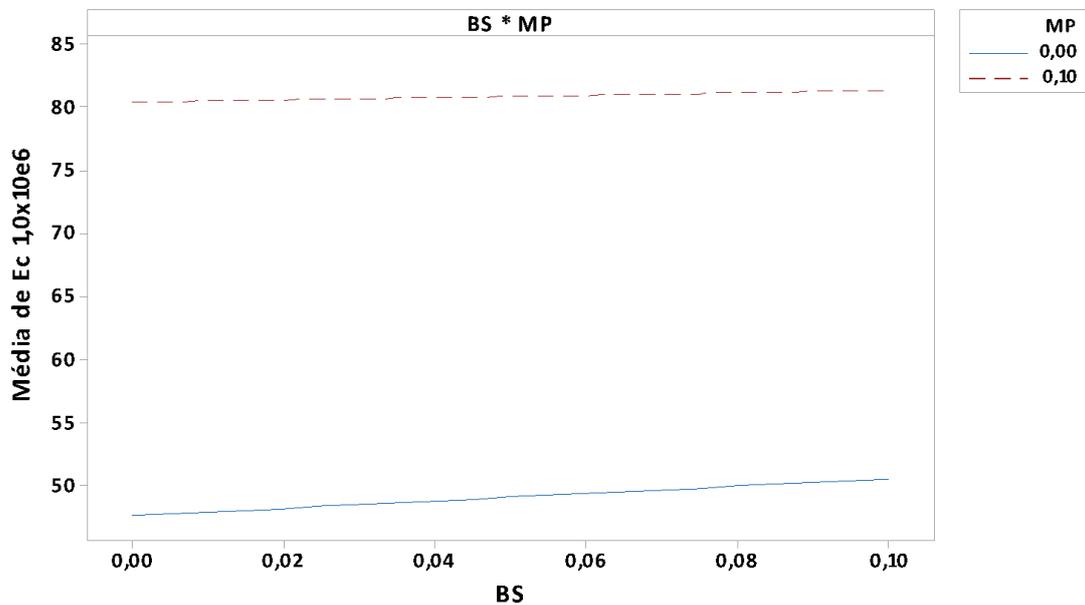


Gráfico da Concentração em % (p/v) x Inibição do crescimento microbiano (%); Ec 1,0x10e6 = *E. coli* 1,0 x 10⁶ UFC/poço; EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético; BS = metabissulfito; DFO = desferroxamina; MP = metilparabeno

Apêndice J – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Gráfico de Efeitos Principais para Pa 1,7x10e5
Médias Ajustadas

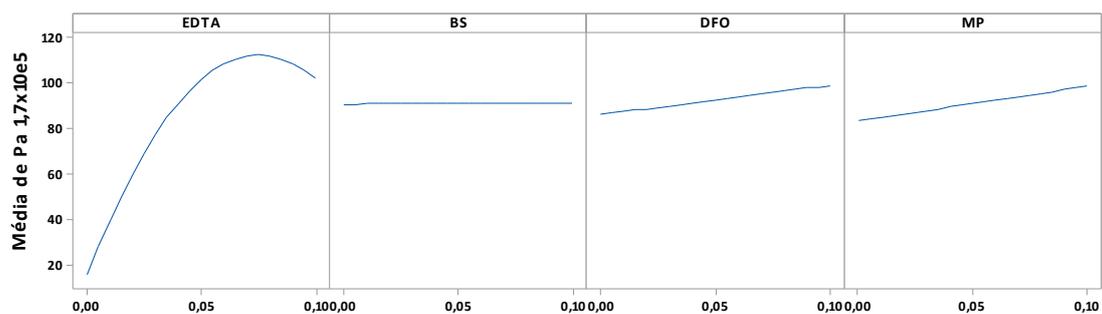


Gráfico de Interação para Pa 1,7x10e5
Médias Ajustadas

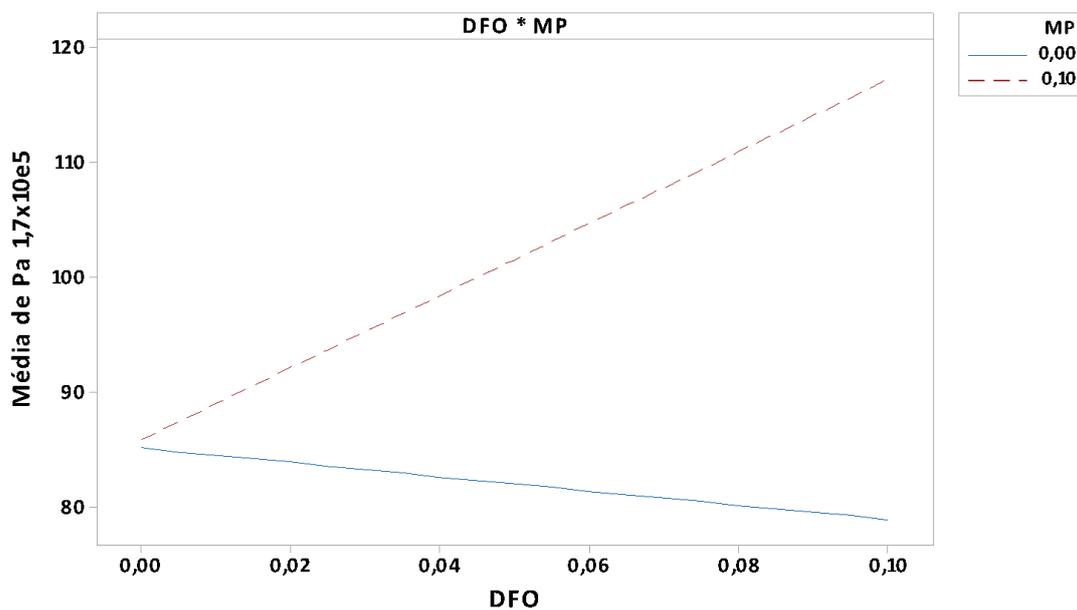


Gráfico da Concentração em % (p/v) x Inibição do crescimento microbiano (%); Pa 1,7x10e5 = *P. aeruginosa* 1,7 x 10⁵ UFC/poço; EDTA = ácido etilenodiamino tetraacético; BS = metabisulfito; DFO = desferroxamina; MP = metilparabeno

Apêndice K – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Candida albicans* ATCC 10231

Gráfico de Efeitos Principais para Ca 2,2x10⁴
Médias Ajustadas

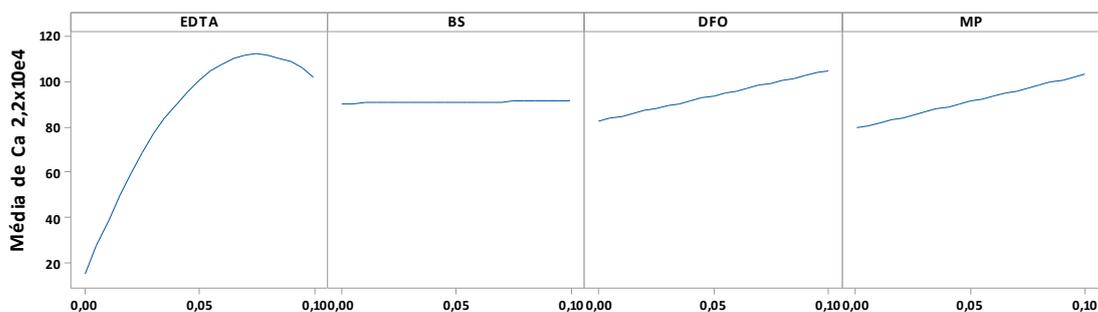


Gráfico de Interação para Ca 2,2x10⁴
Médias Ajustadas

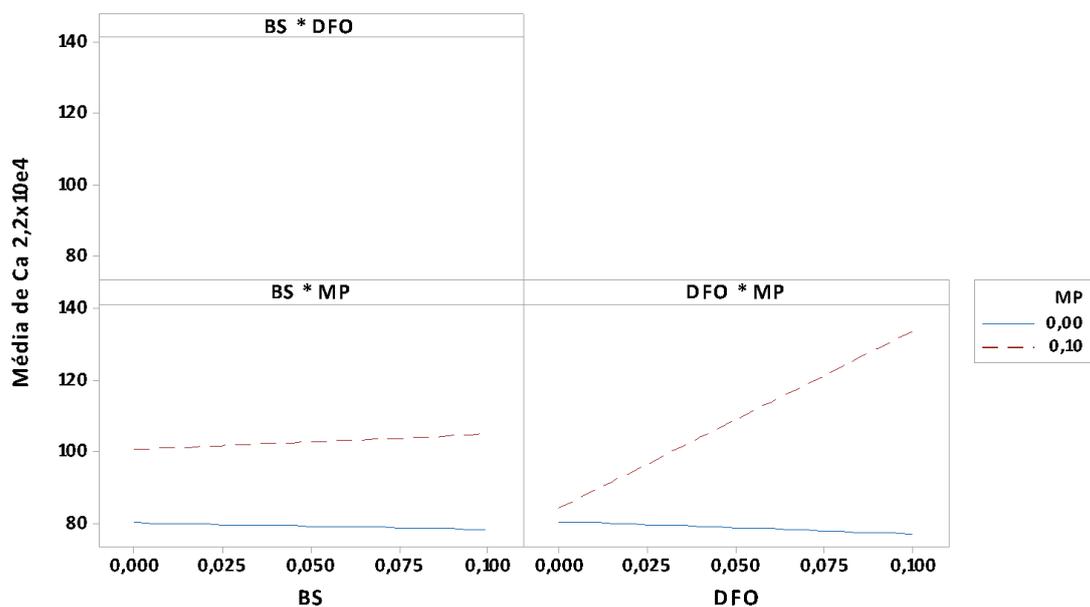


Gráfico da Concentração em % (p/v) x Inibição do crescimento microbiano (%); Ca 2,2x10⁴ = *C. albicans* 2,2 x 10⁴ UFC/poço; EDTA = ácido etilendiamino tetraacético; BS = metabissulfito; DFO = desferroxamina; MP = metilparabeno

Apêndice L – Efeitos principais e de interação, referente à avaliação da atividade antimicrobiana dos sistemas adjuvantes contra *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404

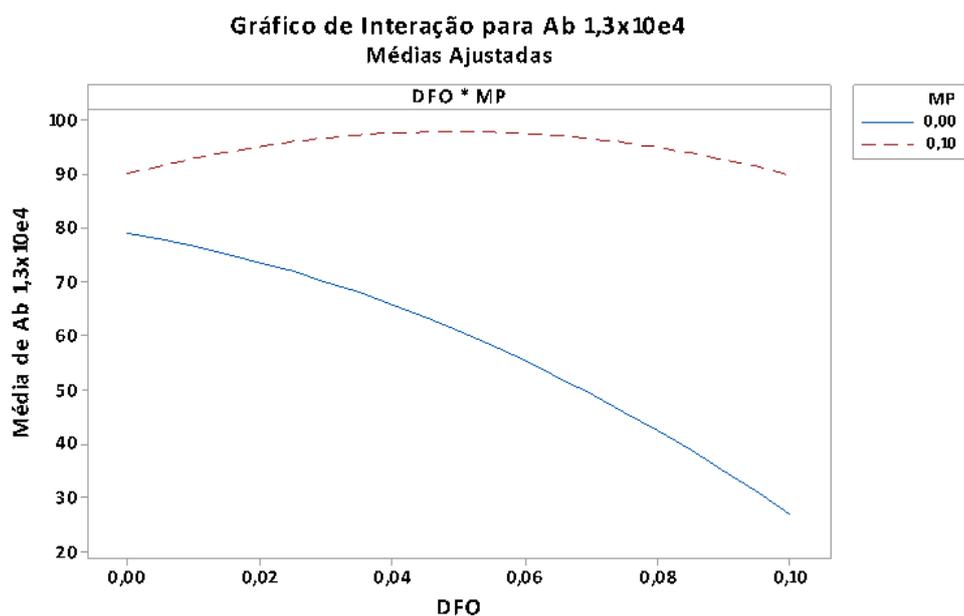
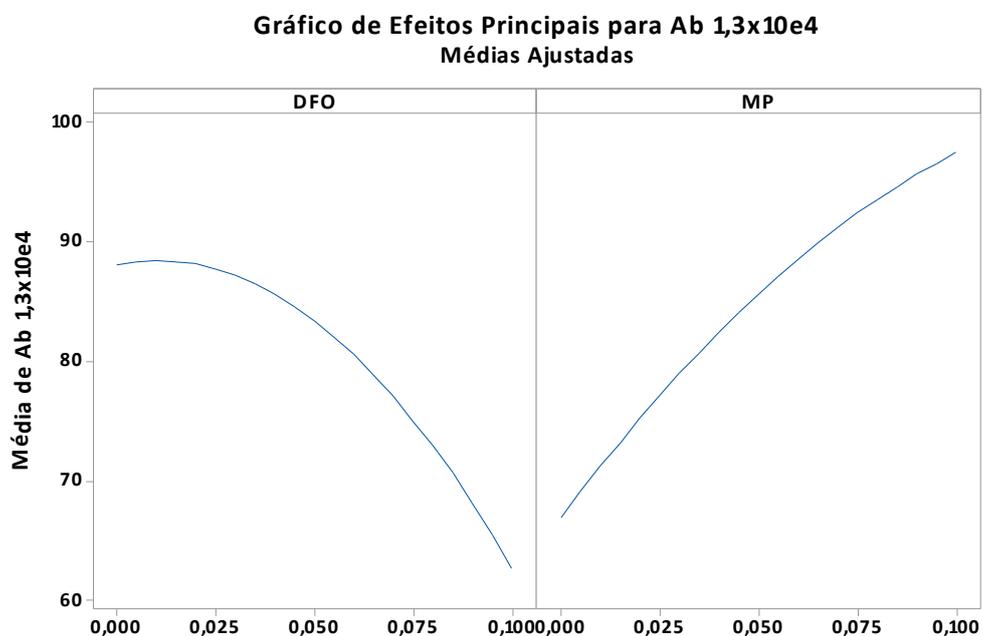
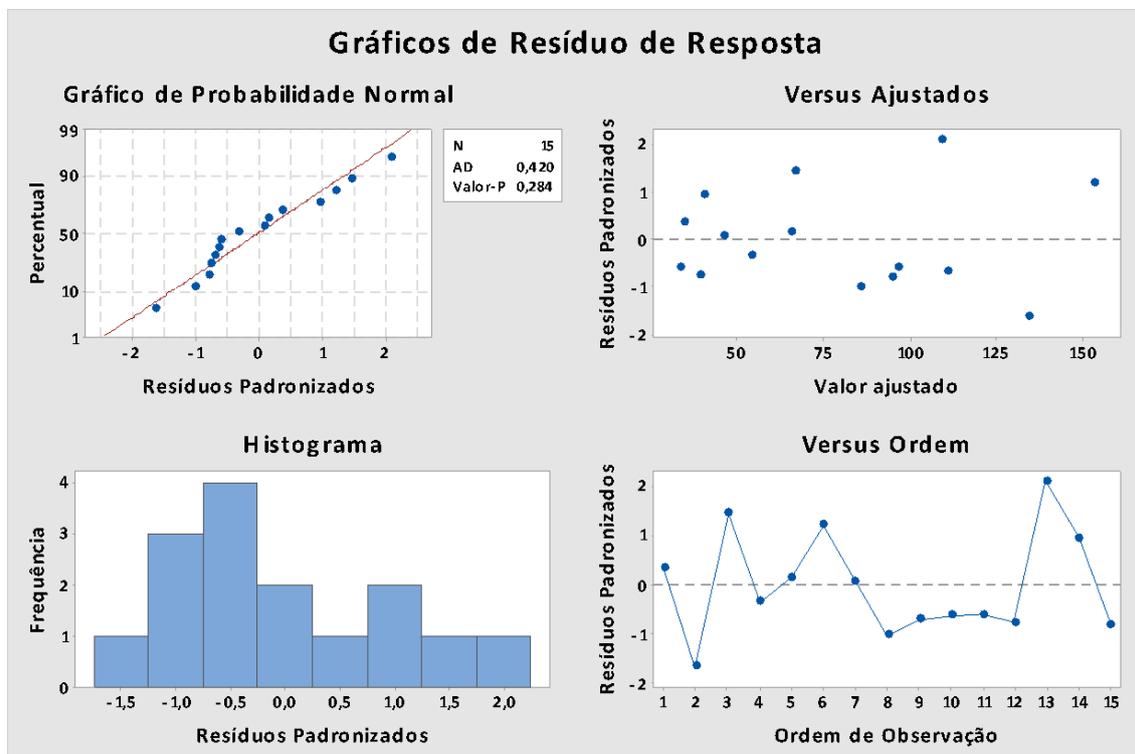


Gráfico da Concentração em % (p/v) x Inibição do crescimento microbiano (%); Ab 1,3x10e4 = *A. brasiliensis* 1,3 x 10⁴ UFC/poço; DFO = desferroxamina; MP = metilparabeno

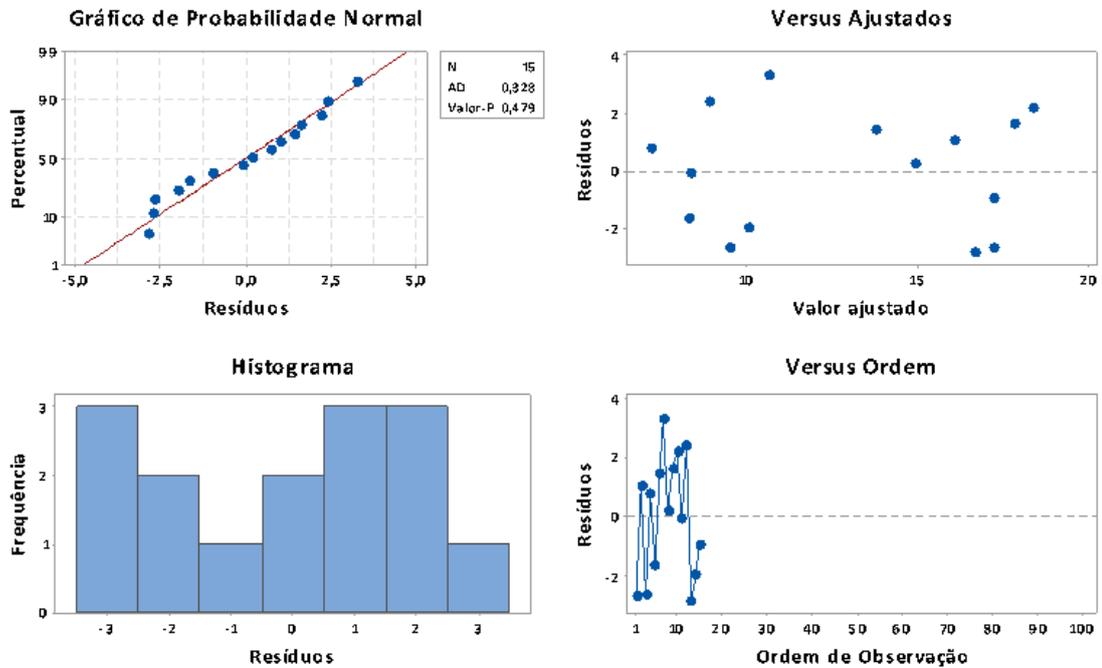
Apêndice M – Resíduo de resposta referente ao estudo de estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v), na condição de bancada



Resposta = teor de ácido ascórbico ao longo do tempo (dias), na condição de bancada

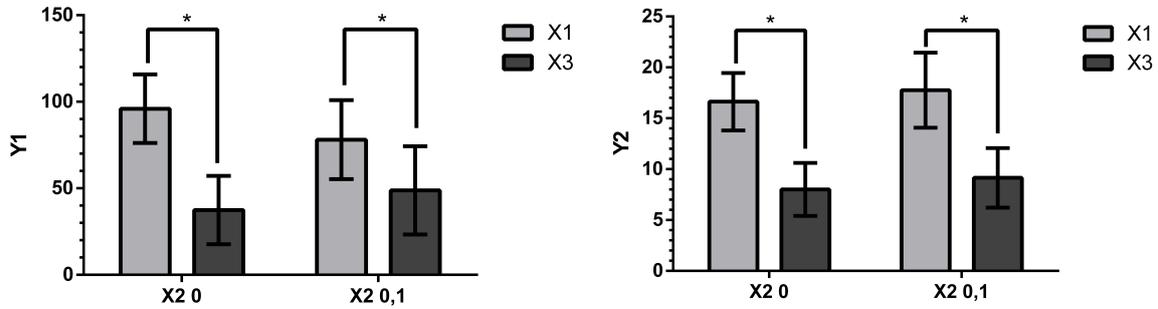
Apêndice N – Resíduo de resposta referente ao estudo de estabilidade química da solução de ácido ascórbico 5,0% (p/v), na condição de estufa

Gráficos de Resíduo de Y2



Y2 = teor de ácido ascórbico ao longo do tempo (dias), na condição de estufa

Apêndice O – Estabilidade do ácido ascórbico em bancada e em estufa para concentrações equimolares de EDTA e desferroxamina, na ausência ou presença de metabissulfito de sódio



Y1 = estabilidade do ácido ascórbico em bancada (dias)

Y2 = estabilidade do ácido ascórbico em estufa a 40 °C (dias)

X1 = concentração de ácido etilenodiamino tetra-acético em % (p/v)

X3 = concentração de desferroxamina em % (p/v)

X2 0 = ausência de metabissulfito de sódio (X2)

X2 0,1 = presença de metabissulfito de sódio (X2) a 0,1% (p/v)

9 ANEXOS

Esta seção contém o seguinte documento:

Anexo 1 - Cópia da ficha do aluno