



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Helena Ponciano Lemes

Utilização de métodos não invasivos para avaliação da segurança de fitocosmético contendo extrato de goiaba para aplicação tópica.

Araraquara - SP

2015



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Campus de Araraquara

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Helena Ponciano Lemes

Utilização de métodos não invasivos para avaliação da segurança de fitocosmético contendo extrato de goiaba para aplicação tópica.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica, área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Vera Lucia Borges Isaac

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Bruna Galdorfini Chiari-Andréo

Araraquara - SP

2015

Dedicatória

Aos meus amados pai (João Lemes) e mãe (Darly Lemes) que me trouxeram com todo o amor e carinho a este mundo, dedicaram, cuidaram e me ensinaram qual é o significado do verdadeiro Amor, que é Deus.

Agradecimentos

Aos meus irmãos, Daniel e João Luis, e familiares, pelo imenso amor e momentos compartilhados durante essa etapa da minha vida.

Ao meu namorado, grande companheiro, Leonel, obrigada por tudo, pelo amor, carinho, confiança, ajuda e simplesmente por ser você.

Aos meus amigos, irmãos na amizade, que fizeram parte da minha formação, pelas risadas, companheirismo, ajudas e pelo dom da vida de cada um.

À minha querida co-orientadora Bruna Galdorfini Chiari-Andréo por toda orientação neste trabalho, pela prontidão em ajudar e ensinar sempre e pela amizade construída.

À Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac por todos esses anos que me recebeu no Laboratório e me ensinou e colaborou com a realização deste trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo esta vida valer cada vez mais a pena.

Gratidão a todos!

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivo	13
3. Justificativa	13
4. Material e Métodos	14
4.1. Preparo do material vegetal	14
4.2. Preparo do extrato vegetal	15
4.3. Preparo da formulação	16
4.4. Estudos de segurança	18
4.4.1. Avaliação do potencial mutagênico	18
4.4.2. Avaliação do potencial irritativo e alergênico em humanos	21
4.5. Estudo de eficácia	22
4.5.1. Avaliação do potencial antimutagênico	22
4.6. Análise estatística dos resultados	22
5. Resultados e discussão	22
5.1. Estudos de segurança	22
5.1.1. Avaliação do potencial mutagênico	22
5.1.2. Avaliação do potencial irritativo e alergênico em humanos	28
5.2. Estudo de eficácia	28
5.2.1. Avaliação do potencial antimutagênico	28
6. Conclusão	31
7. Referências	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore, flor e fruta de <i>P. guajava</i> L.....	11
Figura 2. Etapas de preparação do material vegetal.....	14
Figura 3. Imagem do processo extrativo	15
Figura 4. Imagem do extrato liofilizado	16
Figura 5. Esquema simplificado do teste de Ames.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual do fitocosmético.	17
Tabela 2. Atividade mutagênica (sem ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM).	24
Tabela 3. Atividade mutagênica (com ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM).	26
Tabela 4. Atividade antimutagênica (sem ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e a porcentagem de inibição da mutagenicidade (%InM) promovida pelo controle positivo.	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.....	19
Quadro 2. Conteúdo dos tratamentos do ensaio de mutagenicidade submetidos à pré-incubação.....	19

RESUMO

É bem conhecido que uma das consequências causada pela radiação ultravioleta gerada pela luz solar é o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de cânceres cutâneos por meio da ação dos radicais livres gerados sobre a pele. A utilização de uma formulação de uso tópico pela população que auxilie na prevenção do envelhecimento precoce e de doenças causadas pelos radicais livres à pele humana seria de grande valia, trazendo benefícios estéticos, que influenciariam diretamente a saúde psicológica do usuário e preveniriam a fotocarcinogênese. Este fato se torna ainda mais importante em um país tropical como o Brasil, onde a incidência de radiação UV é bastante elevada, assim como o desenvolvimento de cânceres de pele na população. Devido às evidências encontradas em estudos prévios que indicam o potencial antioxidante da goiaba, esta pesquisa teve por objetivo desenvolver estudos para avaliação da segurança *in vitro* e *in vivo* de fitocosmético antioxidante através da avaliação do potencial mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium*, além de avaliar seu potencial irritativo e alergênico na pele de voluntários saudáveis. Para isto foi utilizado o método de Ames, amplamente utilizado para esta finalidade, em que o extrato de *Psidium guajava* L. foi considerado não mutagênico para todas as cepas avaliadas e foi possível constatar que o extrato promoveu efeito antimutagênico moderado apenas na cepa TA 100. No ensaio para avaliação do potencial irritativo e alergênico realizado *in vivo*, foi comprovada a ausência de potencial irritante e alergênico de fitocosmético. Desta forma, os estudos realizados indicam a segurança em utilizar o extrato de *Psidium guajava* L. como antioxidante de uso tópico.

Palavras-chave: *Psidium guajava* L.; antioxidante, mutagenicidade, irritação, alergenicidade, segurança.

1. Introdução

A pele além de ser o maior órgão do corpo humano, é também o único cronicamente exposto ao ambiente (FISHER et al., 2008), agindo portanto, como uma fronteira ativa que se coloca entre o organismo e o ambiente. Sua principal função é agir como uma barreira protetora do organismo contra agressões do meio externo, que promovem, por exemplo, o envelhecimento.

O envelhecimento da pele, fenômeno biológico complexo, pode ser classificado em envelhecimento intrínseco e extrínseco. O envelhecimento intrínseco é controlado geneticamente e, ocorre também, devido à formação de espécies reativas de oxigênio, de origem intracelular, resultantes do metabolismo das células. Já o extrínseco é devido a fatores ambientais, entre eles, o fumo, o álcool, a má nutrição e, finalmente, a radiação solar, que merece amplo destaque (DRAELOS, 1999; BERRA et al., 2006; MCCULLOUGH & KELLY, 2006).

A radiação ultravioleta, produzida pelo sol, é uma importante fonte de formação de radicais livres no organismo, sendo a gravidade do dano causado, proporcional ao tempo de exposição (THIELE et al., 1997; FUCHS et al., 1998; FISHER et al., 2002; MIYAMURA et al., 2007).

As alterações observadas na pele envelhecida pelo tempo são: *secura*, palidez, rugas finas, certo grau de flacidez e uma variedade de neoplasias benignas. Quando ocorre o fotoenvelhecimento, ou seja, o envelhecimento agravado pela ação da luz solar, a pele apresenta-se seca, com pigmentação irregular, com sulcos profundos e lesões pré-malignas (YAAR & GILCHREST, 2001; YAAR et al., 2002). É por este motivo que as áreas do corpo mais expostas, como face, pescoço, antebraço e mãos, sofrem alterações mais dramáticas do que áreas protegidas (FISHER et al., 2008), onde podem surgir anomalias clínicas, como as queratoses actínicas e a elastose solar (DE RIGAL et al., 1989).

A maioria das alterações que afetam a pele são atribuídas à idade e são devidas ao dano acumulativo produzido pela exposição à luz ultravioleta, por meio dos radicais livres (MAGALHÃES, 2000). Por este motivo, cosméticos antioxidantes têm sido cada vez mais estudados. Os antioxidantes são substâncias com função de reproduzir proteção natural e capacidade de limitar as reações químicas oxidativas. Com esta finalidade os principais exemplos de substâncias antioxidantes utilizadas em preparações cosméticas são as vitaminas C e E, extratos vegetais, flavonóides, entre outros.

Neste contexto, extratos de plantas medicinais com ação antioxidante são cada vez mais procurados para o desenvolvimento de cosméticos antienvhecimento. A atual preocupação com a ação dos antioxidantes e a sua relação com os radicais livres tem se tornado essencial à compreensão do envelhecimento celular. Cosméticos com atividade antioxidante têm se apresentado cada vez mais eficientes, capazes não só de prevenir, mas também de amenizar os efeitos do tempo sobre a pele, minimizando rugas e linhas de expressão (RODRIGUES, 2003).

O consumo de frutas e vegetais está associado à diminuição da incidência de câncer e doenças cardiovasculares, sendo que numerosos compostos bioativos são benéficos para a saúde humana. Existem evidências recentes de que específicas combinações fitoquímicas são mais eficientes na proteção contra doenças quando comparadas a compostos isolados (DE KOK et al., 2008), indicando a necessidade do estudo do efeito sinérgico de todos os compostos ativos presentes em plantas como, por exemplo, por meio de avaliações dos extratos vegetais.

A goiaba, fruta reconhecidamente antioxidante (CHIARI et al., 2012a), foi escolhida para este estudo visando seu emprego em um fitocosmético, potencialmente capaz de prevenir os efeitos danosos do tempo e de influências ambientais, como a luz solar, na pele humana.

A *Psidium guajava* L., denominada popularmente de goiabeira, é uma espécie arbustiva arbórea de pequeno porte, pertencente à família Myrtaceae e nativa da América tropical (Figura 1) (DUARTE & PAULA, 2005).

Figura 1. Árvore, flor e fruts de *P. guajava* L.



Disponível em: http://www.vilamada.com.br/conteudo/vila_viva/arvores_praca.htm.

O Brasil é o segundo produtor mundial de goiabas, com uma produção em torno de 300 mil toneladas anuais. As cultivares mais plantadas são: Kumagai, Pedro Sato, Sassaoka, Paluma, que é a variedade mais utilizada no processamento industrial (EL-BULUK et al., 1995; IEA – SP, 2010).

A goiaba é um dos frutos tropicais e subtropicais de maior valor nutricional (LIMA et al., 2002). Tem como principais produtos processados o suco, a polpa, a compota, a geléia e a goiabada. Possui açúcares, ferro, cálcio, fósforo e vitaminas A, B e C em concentrações superiores à maioria das frutas e é rica em fibras e carotenóides, em especial o licopeno (representando mais de 85%), uma substância importante na prevenção de alguns tipos de

câncer (PADULA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986; LIMA *et al.*, 2002; ESCOBAR & SYLOS, 2006; MONTEIRO, 2006).

Segundo resultados obtidos por Iha *et al.* (2008), o extrato etanólico das frutas de *P. guajava* L., contém taninos e flavonóides, apresentando atividade antioxidante que pode ser devida aos flavonóides.

Dentre os compostos presentes em frutas e vegetais de maior importância na prevenção da ação de radicais livres no organismo humano e, portanto, com capacidade de prevenir o câncer e auxiliar na prevenção do envelhecimento cutâneo precoce estão os flavonóides e a vitamina C, ambos potentes antioxidantes presentes na goiaba (MARTIN *et al.*, 1996; MARTÍNEZ *et al.*, 1999).

Além disso, a goiaba é uma fruta de grande disponibilidade no território brasileiro, podendo ser usada em grande escala (LIMA *et al.*, 2002).

Segundo Melo *et al.* (2008b), o extrato aquoso de polpa congelada de goiaba apresentou forte poder antioxidante (superior a 90%), semelhante à capacidade antioxidante do butilhidroxitolueno (BHT) e do ácido ascórbico.

Assim a aplicação pela população de um produto tópico com esta atividade antioxidante e talvez quimioprotetora consistiria em um grande aliado na prevenção dos efeitos deletérios da radiação solar sobre a pele, com a possibilidade até de evitar a formação de células cancerosas na pele, que é o tecido mais exposto do organismo humano.

Neste âmbito, para o lançamento de um produto no mercado é imprescindível que haja a avaliação da eficácia e segurança durante a elaboração de novos cosméticos.

Pontualmente, esse trabalho apresenta como finalidade avaliar a segurança do fitocosmético através da avaliação do seu potencial mutagênico, do seu potencial irritativo e alergênico em humanos. Além disso, a atividade antimutagênica, relacionada à sua eficácia foi avaliada.

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo estudar a eficácia e segurança de um fitocosmético contendo extrato de goiaba (*Psidium guajava* L.).

Cabe ressaltar que este estudo vem sendo desenvolvido por nosso grupo de pesquisa há 5 anos, sendo que a segurança deste produto vem sendo avaliada *in vitro* e *in vivo*.

Objetivos específicos:

Avaliar a segurança do fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. por método *in vitro* (potencial mutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium*) e por meio de ensaio clínico para avaliação do potencial irritativo e alergênico (*Human repeat insult patch test* – HRIPT).

Avaliar a eficácia do fitocosmético por meio do método *in vitro* (potencial antimutagênico em cepas de *Salmonella typhimurium*).

3. Justificativa

Os radicais livres gerados sobre a pele através da radiação ultravioleta, produzida pelo sol, causam o fotoenvelhecimento e o desenvolvimento de cânceres cutâneos. O uso de um produto tópico, produzido com uma fruta presente em abundância no Brasil, capaz de auxiliar na prevenção desses aspectos é, portanto, de grande valia, trazendo benefícios estéticos e à saúde da pele, que influenciam diretamente na autoestima do usuário. Além disso, a utilização da goiaba, fruta empregada essencialmente na indústria alimentícia, poderia significar aumento na renda de produtores devido ao maior valor agregado do produto.

Um cosmético seguro e eficaz, produzido à base de uma fruta abundante no Brasil poderá representar maior acesso da população a um cosmético de qualidade.

4. Material e Métodos

4.1. Preparo do material vegetal

As frutas foram lavadas em água corrente e submersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% durante 2 horas para desinfecção. Após esse período, foram novamente lavadas com água destilada e secas. No dia seguinte, pela manhã, cortou-se em pedaços menores e submetidas à temperatura de 60° C em estufa de ar circulante, até que o peso se mantivesse estável.

O material seco passou por trituração em moinho de facas. A fruta pulverizada foi submetida à passagem por tamises com abertura de malha de 0,59 mm, para assegurar que todo o material vegetal apresentasse esta granulometria máxima (Figura 2).

O material foi acondicionado em embalagens de vidro, vedadas com plástico e estocadas a $-5\pm 2^\circ\text{C}$.

Figura 2. Etapas de preparação do material vegetal.



Fonte: CHIARI, 2011.

4.2.Preparo do extrato vegetal

A extração efetuou-se através do método de percolação (SIMÕES *et al.*, 2007).

Para extração de 50 gramas de fruta seca e pulverizada foram utilizados 1500 mL de etanol 70 °GL, em fluxo contínuo sob a amostra durante 96 horas. O procedimento foi realizado a temperatura ambiente e ao abrigo da luz (Figura 3).

Figura 3. Imagem do processo extrativo.



Fonte: Imagem do autor.

Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e estocados a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, para posterior processo de secagem.

Para a redução do volume, os extratos foram submetidos ao evaporador rotativos à temperatura máxima de 60°C e, em seguida liofilizados (Figura 4). Após liofilização mantiveram-se em frascos de vidro âmbar a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ (CHIARI *et al.*, 2012b).

Figura 4. Imagem do extrato liofilizado (Imagem do autor).



Fonte: Imagem do autor.

4.3.Preparo da formulação

A formulação contendo o extrato de *Psidium guajava* L., denominada fitocosmético, foi preparada, pesando separadamente, a fase aquosa e a fase oleosa, com exceção do extrato de *Psidium guajava* L. (Tabela 1). Em seguida, estas fases da emulsão, sob aquecimento em banho-Maria, foram deixadas até atingirem $75 \pm 2^\circ$ C. Após isso, a fase aquosa foi vertida sobre a oleosa, mantendo o sistema sob agitação até o resfriamento. Neste momento, o pH da formulação foi corrigido para $6,5 \pm 0,5$.

Separadamente, o extrato foi solubilizado, em parte da água, que é utilizada na manipulação da formulação e também foi neutralizado ($6,5 \pm 0,5$). Essa solução do extrato foi, então, incorporada à formulação.

Tabela 1. Composição percentual do fitocosmético.

Matéria-prima	INCI name	Função	Composição percentual
Álcool cetosteárico etoxilado 20 OE	Ceteareth - 20	tensoativo não-iônico	1,00
Álcool cetílico	Cetyl alcohol	agente de consistência	4,00
Monoestearato de glicerila	Glyceryl stearate	agente de consistência	1,40
Adipato de diisopropila	Diisopropyl adipate	Emoliente	1,30
Estearato de octila	Ethylhexyl stearate	Emoliente	0,80
Óleo mineral	Mineral oil	Emoliente	1,00
BHT	BHT	antioxidante	0,02
Metilparabeno	Methylparaben	conservante microbiano	0,20
Propilparabeno	Propylparaben	conservante microbiano	0,18
EDTA	EDTA	sequestrante	0,02
Propilenoglicol	Propylene glycol	umectante e solubilizante	3,00
Carbopol® 940 (Dispersão a 2%)	Carbomer	espessante hidrofílico	7,00
Água q.s.p	Aqua		100,00
Trietanolamina q.s.p.	Trietanolamine	neutralizante	pH 6,00
Extrato de <i>Psidium guajava</i> L.	-	ativo cosmético	5,00

4.4. Estudos de segurança

4.4.1. Avaliação do potencial mutagênico

As cepas de *Salmonella typhimurium* empregadas foram: TA97a, TA98, TA100 e TA102.

O ensaio foi realizado como descrito por MARON e AMES (1983), utilizando apenas o extrato de *Psidium guajava* L. como tratamento e, também, utilizando o sistema de ativação metabólica S9, um homogenato de fígado de ratos, que é convenientemente empregado, pois muitas substâncias só são capazes de se ligar covalentemente ao DNA celular, causando uma mutação, após ativação metabólica (HAKURA *et al.*, 1999).

Inicialmente, o inóculo de cada uma das cepas utilizadas foi preparado. Para isto, com uma alça de inoculação, 10 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2) foi semeado a partir de culturas estoques de cada uma das cepas da bactéria (mantidas em freezer -80° C). Em seguida, os inóculos foram incubados em *shaker* a 37° C por 14 horas e 160 rpm.

Após este período, soluções do extrato de *Psidium guajava* L. foram preparadas. O extrato foi avaliado no teste de Ames em sua máxima concentração solúvel em água (1,253 g/mL) e utilizado nos experimentos nos volumes de 12,5; 25; 50; 100 e 200 µL. Esta concentração inicial do extrato apenas foi reduzida quando foi verificada toxicidade do extrato às cepas de bactérias, o que foi avaliado previamente à realização dos estudos de mutagenicidade propriamente ditos.

Além do tratamento com extrato, foram preparadas placas de controle negativo (utilizando água destilada estéril, ou seja, o veículo), controle de revertência espontânea (para verificação da taxa de revertência das bactérias) e placas de controle positivo (contendo mutágeno (Quadro 1), para verificação da reversão da dependência à histidina).

Quadro 1. Substâncias mutagênicas utilizadas como controle positivo.

Cepas	Sem fração S9		Com fração S9	
	Mutágeno	Concentração	Mutágeno	Concentração
TA 97a	Nitrofenildiamino	0,2 mg/mL	2-antramina	0,03 mg/mL
TA 98	Nitrofenildiamino	0,2 mg/mL	2-antramina	0,03 mg/mL
TA 100	Azida sódica	0,5 mg/mL	2-antramina	0,03 mg/mL
TA 102	Mitomicina-C	0,01 mg/mL	Aminofluoreno	0,2 mg/mL

Estes tratamentos foram realizados em placas de Petri contendo ágar mínimo glicosado previamente solidificado. Porém, as bactérias foram submetidas à pre-incubação antes de serem semeadas sobre as placas. Os tratamentos utilizados foram preparados em tubos de ensaio estéreis e estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Conteúdo dos tratamentos do ensaio de mutagenicidade submetidos à pré-incubação.

	CP	CN	CRE	T1
Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Tratamento	50 µL de mutágeno	200 µL de água destilada	-	12,5 µL de SE
	T2	T3	T4	T5
Tampão fosfato	500 µL	500 µL	500 µL	500 µL
Inóculo	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
Tratamento	25 µL de SE	50 µL de SE	100 µL de SE	200 µL de SE

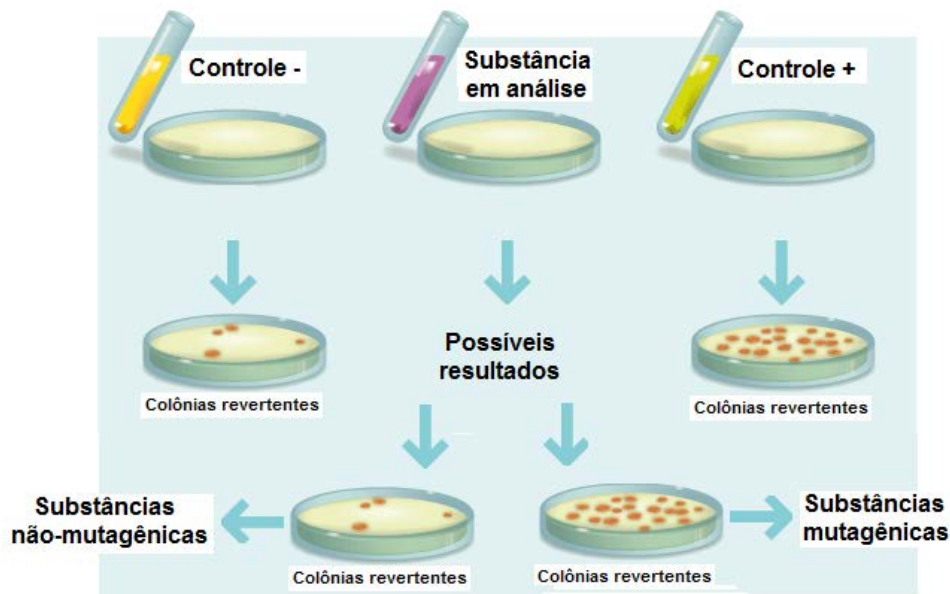
CP: Controle positivo
 CN: Controle negativo
 CRE: Controle de revertência espontânea
 T: tratamento
 SE: solução de extrato

Após pre-incubação por 20 minutos a 37° C, a cada tubo de ensaio foram adicionados 2 mL de top ágar (suplementado com traços de histidina e biotina), rapidamente agitado em vórtex e o conteúdo vertido sobre as placas de ágar mínimo glicosado.

Quando o top ágar apresentou-se solidificado, as placas foram incubadas invertidas por 48 horas a 37° C. Em seguida, o número de colônias revertentes foi quantificado manualmente, com auxílio de contador de colônias.

Um esquema simplificado do teste de Ames pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Esquema simplificado do teste de Ames



Modificado de: <http://www.prc.cnrs-gif.fr/spip.php?rubrique98&lang=fr>.

Como foi dito anteriormente, este ensaio também foi realizado utilizando a fração microsomal S9. Neste caso, no lugar dos 500 µL de tampão fosfato adicionados ao tubo de ensaio para o preparo dos tratamentos, foram adicionados 500 µL de solução da fração S9.

Esta solução da fração S9, sistema de ativação metabólica, foi preparada em banho de gelo e sua composição foi 4% de fração S9, 1% de cloreto de magnésio (0,4 M), 1% de cloreto de potássio (1,65 M), 0,5% de glicose-6-fosfato (1 M), 4% de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (0,1 M), 50% de tampão fosfato pH 7,4 (0,2 M) e 39,5% de água destilada estéril. Esta solução foi preparada no momento do uso.

4.4.2. Avaliação do potencial irritativo e alergênico em humanos

A avaliação do potencial irritativo e alergênico em humanos foi realizada através do teste de contato repetitivo em humanos (*Human repeat insult patch test – HRIPT*).

Duas formulações emulsionadas contendo 5% de extrato etanólico de goiaba foram avaliadas. As formulações diferiam em relação ao polímero utilizado como espessante hidrofílico, sendo uma acrescida de Carbomer (assim como descrito na Tabela 1) e a outra de Hydroxiethylcellulose. Desta forma, a primeira passou por neutralização do pH (6,5), enquanto a segunda foi mantida levemente ácida (devido à acidez do extrato adicionado, pH 4,5). A alteração do polímero foi realizada para permitir a avaliação da segurança em utilizar o extrato na formulação sem prévia neutralização.

A avaliação da segurança das formulações foi realizada de acordo com protocolo descrito por MARZULLY & MAIBACH (1976). Este estudo foi desenvolvido em parceria com a Faculdade de Farmácia, da Universidade de Lisboa, Portugal (*Research Institute for Medicines and Pharmaceutical Sciences - iMed.UL*).

Cada uma das formulações foi aplicada sobre o dorso de 50 voluntários saudáveis, que informaram seu consentimento por meio de documento. O período de contato dos voluntários com o produto foi, inicialmente, de 3 semanas, no período denominado de indutivo.

Os produtos (20 mg) foram mantidos em contato com a pele dos usuários por um período de 48 horas e, em seguida, removidos para análise da pele. Este procedimento foi repetido por 9 vezes durante as 3 semanas de aplicação.

As reações foram graduadas de acordo com o *International Contact Dermatitis Research Group* (FREGERT & BANDMANN, 1975).

Em seguida, a pele foi mantida sem aplicação de qualquer produto por um período de 2 semanas, para que, então fossem novamente aplicadas, em um período denominado de desafio. Após 48 horas, o produto foi removido e a pele avaliada por 48, 72 e 96 horas.

Este protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. O estudo foi conduzido com a participação de um dermatologista, responsável pela avaliação das reações de irritação e sensibilização da pele às formulações.

4.5. Estudo de eficácia

4.5.1. Avaliação do potencial antimutagênico

A avaliação do potencial antimutagênico foi realizada por meio do teste de Ames, da mesma forma como descrito para o estudo da mutagenicidade do extrato de *Psidium guajava* L., entretanto, aos tratamentos que continham o extrato foram adicionados 50 µL do mutágeno, permitindo a verificação da capacidade do extrato em evitar mutações nas cepas de *Salmonella typhimurium*.

Os mutágenos utilizados foram os mesmos utilizados como controle positivo nos estudos de mutagenicidade utilizando o método de Ames.

4.6. Análise estatística dos resultados

Para os ensaios de mutagenicidade realizados com cepas da bactéria *S. typhimurium* foi realizada a análise estatística utilizando o software Salanal (*U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA*).

5. Resultados e discussão

5.1. Estudos de segurança

5.1.1. Avaliação do potencial mutagênico

A atividade mutagênica do extrato de *Psidium guajava* L. foi avaliada em cepas de *Salmonella typhimurium* de acordo com metodologia descrita por MARON e AMES (1983).

Foram avaliados os efeitos mutagênicos nas cepas TA97a, TA98, TA100 e TA 102, primariamente recomendadas para testes padrões de mutagenicidade. São utilizadas quatro cepas diferentes, pois cada uma delas sofreu um tipo diferente de mutação no *operon* de histidina, oferecendo resultados mais completos ao pesquisador (MARON e AMES, 1983).

Os resultados foram expressos na forma de média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa, além do índice de mutagenicidade, cujos dados estão apresentados na Tabela 2.

O índice de mutagenicidade (IM) é calculado pela razão entre o número de colônias revertentes verificadas no tratamento com o composto em análise (extrato de *Psidium guajava* L.) e o número de colônias revertentes verificadas no controle negativo (água destilada) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Estes resultados são importantes, pois como as cepas bacterianas utilizadas foram modificadas de forma a serem dependentes da adição de histidina para o seu desenvolvimento em meio de cultura, elas só se desenvolvem quando reverterem esta condição de dependência de histidina por meio de algum tipo de mutação (MARON e AMES, 1983). É comum que haja uma pequena taxa de revertência espontânea nas culturas, mas é considerado resultado significativo apenas quando o índice de mutagenicidade for igual ou superior a 2 ou quando for verificada relação dose resposta entre o número de colônias revertentes e a concentração testada (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

A análise estatística utilizando o programa Salanal, adotando o modelo de BERNSTEIN *et al.* (1982), indica quais valores são estatisticamente significativos para a mutagenicidade.

Em todos os experimentos foram empregados substâncias reconhecidamente mutagênicas como controle positivo. Este procedimento é realizado para confirmar a capacidade de reversão da mutação em cada cepa bacteriana (MARON e AMES, 1983).

Tabela 2. Atividade mutagênica (sem ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM).

TA 97a			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	148,00	49,50	-
3,19 mg	229,00	3,61	1,55
6,38 mg	110,50	41,72	0,75
12,76 mg	146,67	11,50	0,99
25,52 mg	166,00	74,95	1,12
51,04 mg	184,50	4,95	1,25
CP	1059,33	277,29	7,16
TA 98			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	21,33	1,53	-
15,66 mg	35,67	11,59	1,67
31,325 mg	37,00	11,27	1,73
62,65 mg	37,00	4,36	1,73
125,3 mg	33,00	0,00	1,55
250,6 mg	98,00	2,65	4,59
CP	1310,67	204,21	61,45
TA 100			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	92,67	22,05	-
15,66 mg	107,67	17,39	1,16
31,325 mg	102,33	4,73	1,10
62,65 mg	94,00	13,00	1,01
125,3 mg	106,33	5,86	1,15
250,6 mg	53,66	10,60	0,58
CP	1262,33	227,36	13,62
TA 102			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	421,00	25,52	-
7,83125 mg	491,33	91,10	1,17
15,6625 mg	524,00	58,92	1,24
31,325 mg	516,00	24,98	1,23
62,65 mg	532,00	38,16	1,26
125,3 mg	522,67	95,44	1,24
CP	2386,67	22,52	5,67

*Todos os tratamentos foram avaliados pelo método de Bernstein e em nenhum dos tratamentos foi verificada diferença significativa em relação ao controle negativo.

CN: controle negativo

CP: controle positivo

Como pode ser observada na Tabela 2, a massa de extrato analisada variou de acordo com as cepas bacterianas. Esta quantidade foi definida de acordo com estudos prévios de

toxicidade e, quando foi verificada toxicidade às cepas bacterianas (redução da viabilidade), a massa de extrato utilizada foi reduzida para os estudos de mutagenicidade.

Além da análise do extrato de *Psidium guajava* L. em solução aquosa, também foi avaliado o potencial mutagênico do extrato submetido à ativação metabólica, conforme dados da Tabela 3. A ativação metabólica é obtida adicionando, ao extrato, soluções de um sistema de ativação metabólica reconhecido como S9. Este sistema de ativação metabólica é preparado a partir de um homogenato de fígado de ratos e, por isso, contém enzimas hepáticas capazes de promover a metabolização do extrato (MARON e AMES, 1983).

Tabela 3. Atividade mutagênica (com ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e o índice de mutagenicidade (IM).

TA 97a			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	124,33	17,21	-
3,19 mg	158,33	17,21	1,27
6,38 mg	171,33	8,62	1,38
12,76 mg	175,00	4,58	1,41
25,52 mg	173,00	4,24	1,39
51,04 mg	221,5	16,26	1,78
CP	2205,33	236,28	17,74
TA 98			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	19,5	4,95	-
15,66 mg	27,66	1,53	1,42
31,325 mg	33,00	3,46	1,69
62,65 mg	25,67	1,15	1,32
125,3 mg	33,33	8,33	1,71
250,6 mg	54,50	0,71	2,79
CP	1850,67	228,71	94,91
TA 100			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	125,33	18,15	-
15,66 mg	181,67	16,92	1,45
31,325 mg	166,67	36,36	1,33
62,65 mg	126,00	16,52	1,01
125,3 mg	142,67	32,96	1,14
250,6 mg	203,66	9,24	1,62
CP	2080,00	204,12	16,60
TA 102			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	IM
CN	336,67	72,04	-
7,83125 mg	444,67	30,29	1,32
15,6625 mg	405,33	63,79	1,20
31,325 mg	362,00	46,86	1,08
62,65 mg	404,00	20,30	1,20
125,3 mg	424,66	7,57	1,26
CP	528,67	13,32	1,57

*Todos os tratamentos foram avaliados pelo método de Bernstein e em nenhum dos tratamentos foi verificada diferença significativa em relação ao controle negativo.

O extrato de *Psidium guajava* L. foi considerado não mutagênico para todas as cepas avaliadas, de acordo com o método de BERNSTEIN *et al.* (1982). Este resultado é de grande importância considerando que o teste de Ames é um ensaio utilizado mundialmente para o

screening de novas substâncias químicas e, inclusive, de novos fármacos (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Os resultados do teste de Ames são utilizados, também, para a submissão de dados às agências regulatórias para o registro ou aceitação de substâncias químicas, como fármacos ou biocidas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Na maior massa testada (250,6 mg) do extrato de *Psidium guajava* L. foi verificado um índice de mutagenicidade superior a 2 para a linhagem TA98.

As mutações evidenciadas na cepa TA98 de *S. typhimurium* são mutações do tipo *frameshift* (adição ou deleção de uma ou mais bases) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

Este comportamento se manteve quando houve ativação metabólica (adição de S9), porém em menor intensidade. Este resultado é um indicativo de potencial mutagenicidade do extrato de *Psidium guajava* L. se utilizado em concentrações bastante elevadas.

Esta concentração foi definida como bastante elevada porque, considerando que a concentração proposta para uso do extrato de *Psidium guajava* L. em um fitocosmético é de 5%, para que fosse atingida a massa de 250 mg de extrato seria necessária uma massa de 5 g de fitocosmético. Se considerarmos um uso rotineiro, de um produto para uso facial, geralmente comercializado em embalagens de 30 g, sendo destinado ao uso em, aproximadamente, 30 dias. Assim, a massa aproximada de uso diário seria de 1g, quantidade 5 vezes menor do que a considerada mutagênica pelo teste de Ames.

Além disso, é preciso considerar que, nem toda a substância ativa incorporada em uma formulação será capaz de ser liberada e, em seguida, atingir o estrato córneo, a epiderme e a derme. De acordo com estudos prévios realizados por nosso grupo de pesquisa (CHIARI, 2011) o fitocosmético contendo 5% de extrato de *Psidium guajava* L. é capaz de liberar em torno de 4 mg/cm² de extrato após 8 horas de aplicação do produto, quantidade 62,5 vezes

menor que a considerada mutagênica, indicando segurança ainda maior no uso deste composto ativo.

5.1.2. Avaliação do potencial irritativo e alergênico em humanos

Este estudo comprovou a ausência de potencial irritante e alergênico das formulações avaliadas, mesmo depois de repetidas aplicações sob oclusão, o que potencializa a possibilidade de aparecimento destas reações.

Desta forma, foi verificado que as formulações contendo extrato de *P. guajava* L. estão aptas, em relação à segurança, para serem utilizadas topicamente pela população.

Este resultado está de acordo com resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa, que avaliou o extrato de *P. guajava* L. em formulações o contendo por meio de ensaios *in vitro* e em animais.

5.2. Estudo de eficácia

5.2.1. Avaliação do potencial antimutagênico

O ensaio antimutagênico teve por objetivo verificar se o extrato de *Psidium guajava* L. seria capaz de evitar a ocorrência de mutações no material genético celular, quando as células humanas são expostas a agentes ambientais mutagênicos.

O ensaio foi realizado de maneira bastante semelhante ao teste de Ames para estudo da mutagenicidade, diferindo apenas na adição do agente mutagênico concomitantemente ao tratamento com o extrato de *Psidium guajava* L.

A porcentagem de inibição da mutagenicidade foi calculada através da seguinte equação:

$$\%InM = \left[\frac{n^{\circ} \text{ revertentes CP} - n^{\circ} \text{ revertentes AMOSTRA}}{n^{\circ} \text{ revertentes CP}} \right] * 100$$

Em que, n° revertentes *CP*: número de colônias revertentes obtidas com o tratamento do controle positivo (agente mutagênico), n° revertentes *AMOSTRA*: número de colônias revertentes obtidas com o tratamento da amostra.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Considerando que porcentagens de inibição da mutagenicidade inferiores a 25% de inibição não devem ser consideradas como efeito antimutagênico, entre 25 e 45% o efeito antimutagênico é considerado moderado e, acima de 40%, o efeito antimutagênico é considerado forte (NEIGI *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2008), foi possível constatar que o extrato promoveu efeito antimutagênico moderado apenas na cepa TA 100.

Tabela 4. Atividade antimutagênica (sem ativação metabólica) expressa pela média e desvio padrão do número de colônias revertentes por placa e a porcentagem de inibição da mutagenicidade (%InM) promovida pelo controle positivo.

TA 97a			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	%InM
CN	117,33	28,04	-
1,595 mg	830,00	226,12	5,68
3,19 mg	949,33	164,21	-
6,38 mg	737,33	186,60	16,21
12,76 mg	753,33	44,06	14,39
25,52 mg	954,66	255,36	-
CP	880,00	176,51	-
TA 98			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	%InM
CN	20,33	2,31	-
15,66 mg	1925,33	324,40	-
31,325 mg	1532,67	87,00	-
62,65 mg	1509,33	340,57	1,22
125,3 mg	1416,00	159,80	7,33
250,6 mg	1421,33	140,07	6,98
CP	1528,00	237,72	-
TA 100			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	%InM
CN	129,00	17,10	-
7,83125 mg	2024,00	11,31	5,24
15,6625 mg	2296,00	441,23	-
31,325 mg	1626,67	339,16	23,84
62,65 mg	1781,33	275,43	16,60
125,3 mg	1525,33	245,32	28,59
CP	2136,00	298,15	-
TA 102			
Tratamentos	Média	Desvio padrão	%InM
CN	518,67	43,47	-
7,83125 mg	2469,33	74,33	-
15,6625 mg	2914,67	256,66	-
31,325 mg	2761,33	212,58	-
62,65 mg	2349,33	325,78	-
125,3 mg	2557,33	1063,08	-
CP	1765,33	560,59	-

CN: controle negativo

CP: controle positivo

Com o progresso da ciência, cada vez mais se constata, de modo detalhado, os benefícios que os vegetais promovem à saúde humana. RASKIN *et al.*, em 2002, afirmaram que existe a necessidade de redescobrir a conexão entre plantas e saúde para o lançamento de

uma nova geração de produtos terapêuticos de origem botânica, onde são incluídos medicamentos derivados de plantas, suplementos alimentares, alimentos funcionais e proteínas recombinantes obtidas a partir de plantas.

Esses autores ainda acreditam que, em breve, estes produtos serão capazes de complementar os tratamentos convencionais com medicamentos, a prevenção e até mesmo o diagnóstico de doenças, assim como esse processo será capaz de valorizar a agricultura (RASKIN *et al.*, 2002).

Portanto, para auxiliar na prevenção do envelhecimento precoce e de doenças causadas pelos radicais livres à pele humana, o uso de um fitocosmético é de grande relevância, além de ajudar diretamente na saúde psicológica do usuário. Sendo interessante evidenciar que vivemos em um país tropical, lugar em que a incidência da luz UV tem se tornado cada vez maior, assim como o desenvolvimento de cânceres de pele na população.

6. Conclusão

Este trabalho apresentou uma alternativa segura e efetiva, obtida a partir de uma fruta de elevada disponibilidade no Brasil, para a prevenção e amenização dos efeitos do envelhecimento da pele.

O extrato de *Psidium guajava* L. apresenta elevada margem de segurança quando sua concentração ativa é comparada à citotóxica. Nas concentrações sugeridas para efeito cosmético, o extrato vegetal não é mutagênico, resultado de grande notoriedade, já que o teste de Ames é um ensaio mundialmente utilizado.

Para muitos tratamentos, a porcentagem de inibição de mutagenicidade foi inferior a 25%, mas, ainda assim, o uso prolongado do extrato de *Psidium guajava* L. de forma preventiva é de grande valia, associando ao fato do seu efeito quimioprotetor.

O HRIPT permitiu a comprovação da ausência de potencial irritante e alergênico das formulações contendo extrato de *P. guajava* L.

7. Referências

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, M. C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat Res**, v. 97, p. 267–281, 1982.

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

CHIARI, B.G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2011, 137p.

CHIARI, B.G.; MARTINI, P.C.; MORAES, J.D.D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; ISAAC, V.L.B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **International Journal of Research in Cosmetic Science**, v.2, n.2, p.8-14, 2012a.

CHIARI, B.G.; SEVERI, J.A.; PAULI-CREDENDIO, P.A.; SYLOS, C.M.; VILEGAS, W.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Assessment of the chemical profile, polyphenol content and antioxidant activity in extracts of *Psidium guajava* L. fruits. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 331-336, 2012b.

DE KOK, T.M.; VAN BREDA, S.G.; MANSON, M.M. Mechanisms of combined action of different chemopreventive dietary compounds: a review. **Eur. J. Nutr.**, v.47 Suppl, n.2, p.51-9, 2008.

DE RIGAL, J.; ESCOFFIER, C.; QUERLEUX, B.; FAIVRE, B.; AGACHE, P.; LÉVÊQUE, J. Assessment of aging of the human skin by in vivo ultrasonic imaging. **J. Investigative Dermatol.**, v. 93, n.5, p. 621-625, 1989.

DRAELOS, Z.D. **Cosméticos em dermatologia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

DUARTE, M.R.; PAULA, F.M. Morfodiagnose de *Psidium guajava* L., Myrtaceae. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.6, n.2, 2005.

EL-BULUK, R.E.; BABIKER, E.E.; EL TINAY, A.H. Biochemical and physical changes in fruits of four guava cultivars during growth and development. **Food Chem.** v.54, p.279- 282, 1995.

ESCOBAR, A.P.; SYLOS, C.M. Efeito do processo de obtenção de polpa de goiaba e goiabada sobre os teores de licopeno e de beta-caroteno. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006. 65f. Dissertação (Mestrado em Análise de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

FISHER, G.J.; KANG, S.; VARANI, J.; BATA-CSORGO, Z.; WAN, Y.; DATTA, S.; VOORHEES, J.J. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Arch. Dermatol.**, v. 138, p. 1462- 1470, 2002.

FISHER, G.J.; VARANI, J.; VOORHEES, J.J. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. **Arch Dermatol.**, v. 144, n. 5, p. 666-672, 2008.

FREGERT S, BANDMANN H-J. International Contact Dermatitis Research Group patch testing. New York: Springer-Verlag, 1975, pp 8-10.

FUCHS, J. Potential and limitations of the natural antioxidants RRR- α -tocopherol, L-ascorbic acid and β -carotene in cutaneous photoprotection. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.848-873, 1998.

HAKURA, A.; SUZUKI, S.; SATOH, T. Advantage of the use of human liver S9 in the Ames test. **Mutation Research**, v.438, p.29–36, 1999.

IHA, S.M.; MIGLIATO, K.F.; VELLOSA, J.C.R.; SACRAMENTO, L.V.S.; PIETRO, R.C.L.R.; ISAAC, V.L.B.; BRUNETTI, I.L.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 18, n.3, p. 387-393, 2008.

LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity

of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J Med Food**, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LIMA, M.A.C.; ASSIS, J.S.; NETO, L.G. Caracterização dos frutos de goiabeira e seleção de cultivares na região do submédio São Francisco. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 1, p. 273-276, 2002.

MAGALHÃES, J. **Cosmetologia**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2000.

MARON, D.M.; AMES, B.N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v.113, n.3-4, p. 173-215, 1983.

MARTIN, K.R.; FAILLA, M.L.; SMITH JR., J.C. β -carotene and lutein protect HepG2 human liver cells against oxidant induced damage. **J. Nutr.**, v.126, n.9, p.2098-2106, 1996.

MARTÍNEZ, A.; IKKEN, Y.; CAMBERO, M.I.; MARÍN, M.L.; HAZA, A.I.; CASAS, C.; MORALES, P. Mutagenicity and cytotoxicity of fruits and vegetables evaluated by the Ames test and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. **Food Sci. Tech. Int.**, v.5, n.5, p. 431-437, 1999.

MARZULLI, F.N. AND H.I. MAIBACH. *Contact allergy: predictive testing in man*. Contact Dermatitis, 1976. **2**(1): p. 1-17.

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

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; ARAÚJO, C.R. Teor de fenólicos totais e capacidade antioxidante de polpas congeladas de frutas. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 67-72, 2008b.

MIYAMURA, Y.; COELHO, S.G.; WOLBER, R.; MILLER, S.A.; WAKAMATSU, K.; ZMUDZKA, B.Z.; ITO, S.; SMUDA, C.; PASSERON, T.; CHOI, W.; BATZER, J.; MONTEIRO, S. Esperança das goiabas. **Rev. Frutas Derivados**, n. 03. p. 27–30, 2006.

NEIGI, P.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chem**, v. 80, p. 393 – 397, 2003.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat Res**, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.

PADULA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of brasilian guavas (*Psidium guajava* L.). **Food Chem.**, v.20, p.11-19, 1986.

RODRIGUES, H.G.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; ALMEIDA, J.A.; FERNANDES, A.A.H.; NOVELLI, E.L.B. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 3, p.315-320, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2007.p. 595, 596, 600, 601, 634.

THIELE, J.J.; TRABER, M.G.; TSANG, K.G. *In vivo* exposure to ozone depletes vitamins C and E and induces lipid peroxidation in epidermal layers of murine skin. **Free Rad. Biol. Med.**, v.23, p. 385 -391, 1997.

YAAR, M.; ELLER, M.; GILCHREST, B. Fifty years of skin aging. **J. Investig Dermatol. Symp. Proc.**, v. 7, n. 1, p. 51-58, 2002.

YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Skin aging: postulated mechanisms and consequent changes in structure and function. **Clin. Geriatr. Med.**, v.17, p.617-630, 2001.

YAMAGUCHI, Y.; BEER, J.Z.; HEARING, V.J. Regulation of human skin pigmentation and responses to ultraviolet radiation. **Pigment Cell Res.**, v.20, n.1, p.2-13, 2007.

Araraquara, _____ de _____ de 2015.

Helena Ponciano Lemes

Aluna

De acordo,

Prof.^a Dr.^a. Vera Lucia Borges Isaac

Orientadora

Prof.^a Dr.^a. Bruna Galdorfini Chiari-Andréo

Co-Orientadora