

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de
fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.

Bruna Galdorfini Chiari

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de
fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L.

Bruna Galdorfini Chiari

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 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 obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Araraquara – SP

2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Chiari, Bruna Galdorfini

C532d Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L / Bruna Galdorfini Chiari. – Araraquara, 2011
137 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Vera Lucia Borges Isaac

1. Fitocosmético. 2. Desenvolvimento. 3. *Psidium guajava* L.. 4. Citotoxicidade. I. Isaac, Vera Lucia Borges, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedicatória

*Dedico este trabalho à Deus,
que me deu vida, saúde e coragem para caminhar
a cada dia em busca de meus objetivos
e colocou em minha vida pessoas muito especiais.*

*Dedico também a meus pais, José Maria e Solange,
que sempre estiveram prontos a me apoiar,
oferecendo-me carinho, força, consolo, sendo
exemplos para minha vida e meu porto seguro.*

Muito obrigada por tudo!

*Também ao meu irmão, Caio,
por ser mais uma pessoa que tenho certeza
que sempre estará ao meu lado.*

*À meu namorado, Rogério,
por todo carinho, paciência e compreensão
que sempre me dedicou, além da grande ajuda na
realização deste trabalho.*

Muito obrigada por estar sempre presente!

De tudo, ficaram três coisas:
a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e
a certeza de que seria interrompido antes de terminar.
Fazer da interrupção um caminho novo,
fazer da queda um passo de dança,
do medo, uma escada,
do sonho, uma ponte
da procura um encontro,
E assim terá válido a pena existir!”

Fernando Sabino



Agradecimientos

Agradecimentos

À **Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac** por toda a orientação neste trabalho, prontidão em ajudar e amizade por todos esses anos.

Ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa** pelos valiosos ensinamentos e disposição em ajudar sempre.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de estudos concedida.

À **Indústria de Alimentos Predilecta** de São Lourenço do Turvo - SP pela doação das goiabas da variedade Paluma.

À **Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli** por ceder seu laboratório para os ensaios com culturas celulares.

À **Profa. Dra. Luisa L. Villa** (Instituto Ludwig) e **Profa. Dra. Ana Paula de M. Loureiro** (Universidade de São Paulo - USP) pela doação das células HaCaT e HepG2.

Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas)**, onde foram realizados os ensaios de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (small angle X-ray scattering - SAXS).

Aos **professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas**: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, Prof. Dr. Anselmo Gomes de Oliveira, Profa. Dra. Chung Man Chin, Dra. Edwil Ap. de Lucca Gattás, Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, Profa. Dra. Leila Ap. Chiavacci, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, Profa. Dra. Maria Célia de Sylos, Profa. Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Prof. Dr. Raul Cesar Evangelista e Prof. Dr. Wagner Wilegas por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Bruna Galdorfini Chiari

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho** e **Profa. Dra. Marilisa Guimarães Lara** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando das bancas de qualificação e defesa.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: **Ana Cristina, Angélica, Cláudia, Fátima, Eduardo, Laura, Marcia, Margarete, Mateus, Queila, Osmar, Sônia** e **Valéria** por estarem sempre prontos a ajudar.

À **Priscila Abackerli de Pauli** pelos auxílios nos ensaios para avaliação dos compostos fenólicos e flavonóides dos extratos.

À **Juliana Severi** pela importante colaboração na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos.

A todos meus **amigos do Laboratório de Cosmetologia**: Aline, Aline Barelli, Ana Paula, Bruna Fatori, Carol, Daniele, Danila, Eduardo, Fernanda, Gabriela, Giovani, Gisele, Guilherme, Hanako, Hannah, Ilza, Jemima, José Ricardo, Letícia, Luciana, Marina, Natália Galhardo, Paula e Priscila, por toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo, muitos mesmo não estando mais presentes no laboratório.

À **Raquel** e **Natália** pela companhia e conversas de todos os dias nas viagens de São Carlos à Araraquara.

E a todos os **amigos** que conheci na Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Obrigada a todos!

Bruna Galdorfini Chiari

SUMÁRIO

Resumo	14
Abstract	15
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DA LITERATURA	17
A pele	17
Epiderme	17
Derme	18
Hipoderme	18
Envelhecimento precoce da pele	19
Radicais livres	19
Cosméticos antioxidantes	21
<i>Psidium guajava</i> L.	22
Compostos fenólicos e flavonóides	23
Avaliação da segurança de cosméticos	24
OBJETIVOS	26
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
JUSTIFICATIVA	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
MATERIAL E EQUIPAMENTOS	28
MÉTODOS	29
1) Preparo do material vegetal	29
2) Caracterização do material vegetal	29
2.1) Determinação de perda por secagem	29
2.2) Determinação da granulometria da fruta seca e pulverizada	30
3) Preparo dos extratos de <i>Psidium guajava</i> L.	30
4) Caracterização dos extratos	30
4.1) Doseamento de compostos fenólicos totais	30
4.2) Doseamento de flavonóides	31
4.3) Avaliação do potencial antioxidante dos extratos	31
4.3.1) <i>Ensaio do radical DPPH</i>	31

4.3.2) <i>Ensaio do radical ABTS</i> _____	32
4.4) Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos_____	33
5) Avaliação do potencial citotóxico_____	33
6) Validação da metodologia de quantificação do extrato através do método do DPPH_____	35
6.1) Linearidade_____	35
6.2) Exatidão_____	35
6.3) Limite de detecção_____	36
6.4) Limite de quantificação_____	36
6.5) Precisão_____	36
6.5.1) <i>Repetibilidade ou precisão intra-corrída</i> _____	37
6.5.2) <i>Precisão intermediária ou precisão inter-corrídas</i> _____	37
6.5.3) <i>Reprodutibilidade</i> _____	37
6.6) Especificidade e Seletividade_____	37
6.7) Robustez_____	38
6.8) Curvas analíticas com solventes diferentes_____	38
7) Desenvolvimento do creme base e do fitocosmético_____	38
8) Avaliação do perfil de liberação do extrato a partir do fitocosmético, e a permeação e retenção cutâneas do extrato_____	39
8.1) Avaliação da liberação do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	39
8.2) Avaliação da permeação cutânea do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	41
8.3) Avaliação da retenção na epiderme e derme do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	41
8.4) Avaliação da retenção no estrato córneo do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	42
9) Avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético_____	42
10) Caracterização das formulações_____	42
10.1) Classificação do tipo de emulsão_____	42
10.2) Caracterização reológica das formulações_____	43

10.3) Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas no creme base e no fitocosmético	44
10.3.1) <i>Avaliação das formulações utilizando microscopia de luz polarizada</i>	44
10.3.2) <i>Avaliação das formulações pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</i>	44
10.4) Avaliação da estabilidade das formulações	45
11) Análise estatística dos resultados	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
1) Preparo do material vegetal	47
2) Caracterização do material vegetal	48
2.1) Determinação de perda por secagem	48
2.2) Determinação da granulometria da fruta seca e pulverizada	48
3) Preparo dos extratos de <i>Psidium guajava</i> L.	49
4) Caracterização dos extratos	50
4.1) Doseamento de compostos fenólicos totais	50
4.2) Doseamento de flavonóides	53
4.3) Avaliação do potencial antioxidante dos extratos	56
4.3.1) <i>Ensaio do radical DPPH</i>	57
4.3.2) <i>Ensaio do radical ABTS</i>	59
4.4) Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos	61
5) Avaliação do potencial citotóxico	66
6) Validação da metodologia de quantificação do extrato através do método do DPPH	69
6.1) Linearidade	70
6.2) Exatidão	73
6.3) Limite de detecção	74
6.4) Limite de quantificação	74
6.5) Precisão	75
6.5.1) <i>Repetibilidade ou precisão intra-corrída</i>	75
6.5.2) <i>Precisão intermediária ou precisão inter-corrídas</i>	76
6.5.3) <i>Reprodutibilidade</i>	76

6.6) Especificidade e Seletividade_____	77
6.7) Robustez_____	78
6.8) Curvas analíticas com solventes diferentes_____	78
7) Desenvolvimento do creme base e do fitocosmético_____	79
8) Avaliação do perfil de liberação do extrato a partir do fitocosmético, e a permeação e retenção cutâneas do extrato_____	82
8.1) Avaliação da liberação do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	83
8.2) Avaliação da permeação cutânea do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	87
8.3) Avaliação da retenção na epiderme e derme do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético _____	89
8.4) Avaliação da retenção no estrato córneo do extrato de <i>P. guajava</i> L. contido no fitocosmético_____	90
9) Avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético_____	93
10) Caracterização das formulações_____	93
10.1) Classificação do tipo de emulsão_____	93
10.2) Caracterização reológica das formulações_____	94
10.3) Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas no creme base e no fitocosmético_____	104
10.3.1) <i>Avaliação das formulações utilizando microscopia de luz polarizada</i> _____	104
10.3.2) <i>Avaliação das formulações pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)</i> _____	106
10.4) Avaliação da estabilidade das formulações_____	108
CONCLUSÃO _____	120
REFERÊNCIAS_____	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore, flor e fruta de <i>P. guajava</i> L. _____	22
Figura 2. Cultura de células em placa de 96 poços _____	34
Figura 3. Procedimento para avaliação da citotoxicidade do extrato de <i>P. guajava</i> L. E70 _____	34
Figura 4. Célula de Franz modificada _____	39
Figura 5. Equipamento para avaliação da liberação, permeação e retenção cutâneas _____	40
Figura 6. Membrana biológica para o ensaio de permeação: orelha de porco íntegra (a), e pele da orelha de porco dissecada (b) _____	41
Figura 7. Etapas de preparação do material vegetal _____	47
Figura 8. Curva analítica de ácido gálico _____	51
Figura 9. Concentração de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos avaliados (Resultados expressos em: mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 mg de extrato) _____	52
Figura 10. Curva analítica de quercetina _____	53
Figura 11. Curva analítica de rutina _____	54
Figura 12. Concentração de compostos fenólicos e de flavonóides equivalentes quercetina/rutina nos extratos E70 e EAq _____	56
Figura 13. Percentagem de inibição do radical DPPH por ácido ascórbico, uma substância de referência _____	57
Figura 14. Atividade seqüestrante do radical DPPH pelos extratos de <i>P. guajava</i> L.: etanólico 70° GL, etanólico 90° GL, etanólico absoluto e aquoso _____	58
Figura 15. Percentagem de inibição do radical ABTS por ácido ascórbico, uma substância de referência _____	60
Figura 16. Percentagem de inibição do radical ABTS pelo extrato E70 _____	60
Figura 17. Perfis cromatográficos dos extratos E70, E90, E100 e EAq _____	62
Figura 18. Perfis cromatográficos dos extratos E70, E90, E100 e EAq _____	63
Figura 19. Perfil cromatográfico do extrato E70 _____	65
Figura 20. Espectros de absorção dos picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do cromatograma do extrato E70 _____	65

Figura 21. Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações do extrato E70 _____	67
Figura 22. Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações do extrato E70 _____	67
Figura 23. Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método _____	71
Figura 24. Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método _____	71
Figura 25. Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método _____	72
Figura 26. Média das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método _____	72
Figura 27. Curva analítica para quantificação do extrato de <i>P.guajava</i> L. utilizando metanol como solvente _____	78
Figura 28. Curva analítica para quantificação do extrato de <i>P.guajava</i> L. utilizando tampão fosfato (pH=7,4) como solvente _____	79
Figura 29. Fitocosmético e creme base _____	82
Figura 30. Porcentagem de liberação do extrato das formulações contendo 5, 10 e 20% do extrato nos tempos 2, 4 e 8h _____	83
Figura 31. Quantidade em mg de extrato liberado das formulações contendo 5, 10 e 20% por unidade de área (cm ²) nos tempos 2, 4 e 8h _____	85
Figura 32. Porcentagem de liberação do extrato das formulações contendo 5, 10 e 20% do extrato nos tempos 2, 4 e 8h _____	87
Figura 33. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato das formulações (5, 10 e 20%) que permeou a membrana biológica nos tempos 2, 4 e 8h _____	88
Figura 34. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato das formulações (5, 10 e 20%) que ficou retido na epiderme/derme da membrana biológica nos tempos 2, 4 e 8h _____	89
Figura 35. Quantidade (mg) de extrato retido na epiderme/derme por área de pele (cm ²) _____	90
Figura 36. Fotomicrografia do creme base com o corante lipofílico (marrom) (Aumento de 400 vezes e 100 vezes, respectivamente) _____	94
Figura 37. Fotomicrografia do creme base com o corante hidrofílico (amarelo) (Aumento de 400 e 100 vezes, respectivamente) _____	94
Figura 38. Curvas de fluxo do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3) _____	95

Figura 39. Limite de escoamento estático do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3) _____	97
Figura 40. Gráfico do limite de escoamento estático do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3) em menor escala _____	98
Figura 41. Avaliação do limite de escoamento dinâmico nas curvas de fluxo do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3) _____	99
Figura 42. Varredura de tensão do creme base (n=3) _____	100
Figura 43. Varredura de tensão do fitocosmético (n=3) _____	100
Figura 44. Varredura de frequência do creme base (n=3) _____	101
Figura 45. Varredura de frequência do fitocosmético (n=3) _____	102
Figura 46. Ensaio de fluência e relaxação do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3) _____	103
Figura 47. Fotomicrografia do creme base _____	105
Figura 48. Fotomicrografia do fitocosmético _____	105
Figura 49. Resultados do ensaio de SAXS para o creme base _____	106
Figura 50. Resultados do ensaio de SAXS para o fitocosmético _____	106
Figura 51. Valores de pH do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	107
Figura 52. Valores de pH do fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	110
Figura 53. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	113
Figura 54. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) do fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	114
Figura 55. Valores de densidade aparente do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	115
Figura 56. Valores de densidade aparente do fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	115
Figura 57. Concentração do extrato E70 contido no fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise _____	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Massa em gramas dos extratos secos obtidos e rendimento das extrações com etanol 70 e 90° GL, etanol absoluto e água _____	50
Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos avaliados (Resultados expressos em: mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 mg de extrato) _____	51
Tabela 3. Concentração de flavonóides equivalentes a quercetina nos extratos avaliados (mg de flavonóides/100 mg de extrato) _____	54
Tabela 4. Concentração de flavonóides equivalentes a rutina nos extratos avaliados _____	54
Tabela 5. Valores de IC ₅₀ dos extratos avaliados (mg de extrato/mL) _____	59
Tabela 6. Gradiente dos solventes A e B utilizados na avaliação do perfil cromatográficos dos extratos de <i>P. guajava</i> _____	61
Tabela 7. Valores de IC ₅₀ para as células HepG2 e HaCat tratadas com o extrato E70 _____	69
Tabela 8. Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	73
Tabela 9. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	74
Tabela 10. Avaliação da repetibilidade do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	75
Tabela 11. Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	76
Tabela 12. Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	76
Tabela 13. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	77
Tabela 14. Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do extrato E70 _____	78
Tabela 15. Composição percentual da formulação cosmética (creme base) _____	80

Tabela 16. Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos fitocosméticos contendo 5, 10 e 20% de extrato _____	85
Tabela 17. Equações obtidas por meio da aplicação dos modelos de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi aos dados de liberação _____	87
Tabela 18. Porcentagem de inibição do radical DPPH causada pelo fitocosmético _____	93
Tabela 19. Tixotropia das formulações em Pa/s _____	96
Tabela 20. Parâmetros que descrevem o creme base e o fitocosmético de acordo com o modelo reológico de Herschel-Bulkley _____	97
Tabela 21. Valores iniciais de G' e G'' para o creme base (B) e para o fitocosmético (F) _____	102
Tabela 22. Parâmetro determinados pelo ensaio de SAXS para o creme base e fitocosmético _____	107
Tabela 23. Média e desvio padrão (DP) dos valores de pH durante o estudo de estabilidade do creme base _____	111
Tabela 24. Média e desvio padrão (DP) dos valores de pH durante o estudo de estabilidade do fitocosmético _____	112
Tabela 25. Média e desvio padrão (DP) da viscosidade aparente mínima durante o estudo de estabilidade do creme base _____	113
Tabela 26. Média e desvio padrão (DP) da viscosidade aparente mínima durante o estudo de estabilidade do fitocosmético _____	114
Tabela 27. Média dos valores da densidade aparente do creme base e do fitocosmético durante o estudo de estabilidade, no intervalo de 90 dias _____	116
Tabela 28. Média da concentração (mg/mL) e porcentagem de redução do E70 no fitocosmético durante o estudo de estabilidade _____	118



Resumo

Resumo

O Brasil apresenta a flora mais diversificada do mundo e, por este motivo, os centros de pesquisa brasileiros devem se aproveitar desta riqueza vegetal existente no país para buscar tratamentos alternativos, fazendo com que a população se beneficie deste bem natural. A Cosmetologia atual tem como importante objetivo a prevenção de enfermidades, principalmente as que acometem a pele. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo utilizar uma fruta de grande disponibilidade no território brasileiro, a goiaba, para a obtenção de um fitocosmético com atividade antioxidante. Este cosmético visa evitar o envelhecimento precoce da pele e a formação de cânceres cutâneos, ambos causados pelos radicais livres, gerados a partir da radiação ultravioleta proveniente da luz solar, que estamos expostos diariamente. Para isto, foi obtido um extrato da fruta, contendo significativo teor de compostos fenólicos, inclusive flavonóides. Em seguida, foi preparado um fitocosmético estável contendo concentração adequada deste extrato, determinada através da avaliação da atividade antioxidante, citotoxicidade e retenção cutânea do ativo vegetal. Os resultados obtidos mostraram que o extrato etanólico 70° GL apresenta considerável atividade antioxidante, é seguro, e incorporado no fitocosmético desenvolvido, é capaz de ficar retido no estrato córneo, na epiderme e derme.

Palavras-chave: fitocosmético, desenvolvimento, *Psidium guajava* L., citotoxicidade



Abstract

Abstract

Brazil has the most diversified flora in the world, for this reason, the Brazilian research centers should take advantage of this rich plant species existing in the country to seek alternative treatments, allowing the population to benefit from this natural patrimony. In addition to substances found in plants for the treatment of serious diseases affecting the population, nature can also offer us substances that could help to prevent these diseases, thus avoiding the suffering of people who might be sick, and even avoiding that the government spends with the treatment of these citizens. The modern Cosmetology has as an important objective the prevention of diseases, especially those that involve the skin. In this context, this work aimed to use a fruit widely available in Brazil, called guava, to develop a phytocosmetic with antioxidant activity. This cosmetic is intended to avoid premature aging of the skin, and the formation of skin cancers, both caused by free radicals, generated from the ultraviolet radiation from sunlight, that we are exposed to daily. For this, we obtained an extract of the fruit containing a significant content of phenolic compounds, including flavonoids. Next, we prepared a stable phytocosmetic containing an appropriate concentration of the extract, determined by evaluating the antioxidant activity, cytotoxicity and skin retention of the vegetal active. The results showed that the ethanolic 70° GL extract presents important antioxidant activity, is safe, and when incorporated in the phytocosmetic developed, is able to be retained in the corneum stratum, epidermis and dermis.

Key-words: phytocosmetic, development, *Psidium guajava* L., cytotoxicity



Introdução

O Brasil apresenta a flora mais diversificada do mundo. Um bioma importante é o Cerrado Central Brasileiro, com vegetação predominante de savana, que representa uma das maiores regiões biogeográficas do mundo, com mais de 7000 espécies nativas de plantas vasculares (HIRUMA-LIMA et al., 2006). Comumente muitas dessas plantas são usadas como remédios naturais pelos moradores da região para tratar doenças (ALMEIDA et al., 1998; HIRUMA-LIMA et al., 2006), entretanto, ainda são escassos os estudos que visam um melhor conhecimento dessas plantas, para posterior aplicação em benefício da saúde humana.

É sabido também que 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. Recentemente, existem evidências 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 é um dos frutos tropicais e subtropicais de maior valor nutricional (LIMA *et al.*, 2002). Tem como resultado do processamento industrial, 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%), substância importante na prevenção de alguns tipos de câncer (PADULA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1986; LIMA *et al.*, 2002; MONTEIRO, 2006; ESCOBAR & SYLOS, 2006).

Segundo resultados obtidos por Iha et al. (2008), o extrato etanólico de *P. guajava* L., contém taninos e flavonóides. Estes metabólitos secundários são substâncias de interesse para a indústria cosmética, podendo apresentar diversas aplicabilidades, inclusive na obtenção de um fitocosmético para a prevenção do envelhecimento cutâneo e, até, de doenças causadas pela ação de radicais livres sobre a pele, uma vez que apresenta potencial antioxidante comprovado (KUSKOSKI et al., 2006; IHA et al., 2008; MELO et al., 2008a,b).

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



Revisão

da Literatura

A pele

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. É constituída por duas camadas principais: a epiderme e a derme (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Para a Cosmetologia, o conhecimento das estruturas e funcionamento da pele é essencial, pois tem como objetivo melhorar sua aparência com a utilização de ativos ou prevenir possíveis danos (WILKINSON & MOORE, 1990).

Epiderme

A epiderme é constituída um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, com função de revestimento cutâneo, cobrindo a totalidade do corpo humano. É formada por quatro tipos celulares: os queratinócitos, os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merckel (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Os queratinócitos são as mais numerosas células epidérmicas. A epiderme é repartida em seis camadas desde a profundidade até a periferia: camada basal germinativa (estrato germinativo), camada filamentosa de Malpighi (estrato espinhoso), camada granulosa (estrato granuloso), camada clara (estrato lúcido), camada córnea (estrato córneo) e camada descamante (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

A principal função da epiderme é produzir o estrato córneo (MADISON, 2003), uma camada fina e protetora, considerada impermeável, que evita a perda de água, auxiliando na manutenção da hidratação cutânea e, que controla a penetração de substâncias do ambiente (BLANK, 1969; ELIAS & FRIEND, 1975). A função barreira do estrato córneo é obtida por lamelas lipídicas presentes nos espaços extracelulares entre os cornéocitos (MADISON, 2003).

Os melanócitos contém melanossomos. É nessas organelas onde se inicia a síntese de melanina, responsável pela pigmentação da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

As células de Langerhans são células dendríticas que pertencem à família dos macrófagos, são similares aos melanócitos, mas isentas de pigmento. São células

móveis que se deslocam entre a derme e epiderme. Estas células atuam na regulação das mitoses; na maturação das células epidérmicas e na queratinização; tem função protetora, sendo capazes de fagocitar partículas estranhas; e agem nos fenômenos imunitários epidérmicos, estimulando a produção de certos linfócitos (WILKINSON & MOORE, 1990; HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

Finalmente, as células de Merckel estão situadas na camada basal germinativa. Estas células mantêm contato com fibras nervosas não-mielinizadas, formando o disco de Merckel, que é um corpúsculo que age na inervação da pele (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

Derme

A derme é o elemento de sustentação e nutrição da epiderme e seus anexos. É um tecido essencialmente fibroso, constituído de fibras colágenas e elásticas, imersas em um gel mucopolissacarídico, onde o elemento celular principal é o fibroblasto (PRUNIERAS, 1994). Contém entre 20 e 40% da água total do corpo graças, em parte, às propriedades hidrofílicas dos proteoglicanos, responsáveis pela elasticidade e flexibilidade da pele. Sua espessura aumenta no decorrer da infância e da adolescência, para manter-se e diminuir depois dos cinquenta anos (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

Hipoderme

É um tecido conjuntivo frouxo, de espessura variável conforme a localização, que une a derme aos órgãos profundos, mas que não é considerada constituinte da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Tem duas grandes funções: a reserva de gorduras, e a mobilização de gorduras ou lipólise (sob controle hormonal). Também apresenta função energética (a lipólise libera ácidos graxos em caso de necessidade), age na termogênese, além de ter função de proteção mecânica (HERNANDEZ & MERCIER-FRESNEL, 1999).

Envelhecimento precoce da pele

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, o sol, que merece 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).

Radicais livres

Um radical livre é um átomo ou uma associação de átomos que possuem elétrons emparelhados e livres em sua órbita externa, o que lhes confere grande instabilidade energética e cinética (MAGALHÃES, 2000).

O principal produtor de radicais livres é o oxigênio. As células vivas, presentes em uma atmosfera rica em oxigênio, estão constantemente expostas aos possíveis danos causados por espécies reativas de oxigênio (BERRA et al., 2006). O oxigênio consumido pelos tecidos é metabolizado em água e ânion superóxido (O_2^-). Este ânion é

o iniciador das principais formas reativas de oxigênio, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH[•]) (MAGALHÃES, 2000).

Existem também numerosos radicais livres que não estão centrados sobre o oxigênio, sendo formados secundariamente em uma reação do oxigênio com moléculas biológicas (MAGALHÃES, 2000).

Para que as condições fisiológicas do organismo se encontrem em um funcionamento adequado, é necessário que haja um equilíbrio entre os oxidantes e os antioxidantes (LIU, 2003).

Devido a evolução, as células desenvolveram mecanismos antioxidantes para protegerem-se da toxicidade promovida pelo oxigênio. Os agentes considerados como antioxidantes compreendem: enzimas que removem cataliticamente radicais e espécies reativas como, por exemplo, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalases; proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes, tais como íons ferro e íons cobre como, por exemplo, as transferrinas, ferritinas, metalotioneínas e haptoglobinas; proteínas que protegem processos celulares contra danos oxidativos através de outros mecanismos não enzimáticos como, por exemplo, as proteínas de estresse (“stress proteins”); moléculas de baixo peso molecular que possuem a capacidade de captar espécies reativas de oxigênio via auto-oxidação como, por exemplo, glutathione e aquelas que possuem grupo tiol (SH), ou vitaminas como α -tocoferol, ácido ascórbico e β -caroteno (CADENAS, 1989; BERRA et al., 2006).

Apesar da existência desses agentes e mecanismos antioxidantes, quando há um desequilíbrio entre a formação de radicais livres e os sistemas de defesa antioxidante, pode haver a geração do estresse oxidativo (BIRCH – MACHIN & SWALWELL, 2010).

Através do exposto, é possível notar que o organismo humano não é capaz de bloquear completamente a ação dos radicais livres e que isto pode gerar diversos problemas à saúde.

Os radicais livres estão diretamente relacionados com lesões provocadas na pele através da ação solar. Entre os três tipos de radiação ultravioleta, a radiação ultravioleta A (UVA) é a maior responsável pelo fotoenvelhecimento (LAVKER et al., 1995). Esta radiação gera estresse oxidativo por ser absorvida por cromóforos da pele, como o ácido

trans-urocânico, gerando espécies reativas de oxigênio capazes de causar danos ao material genético, proteínas e lipídeos celulares (HANSON & SIMON, 1998; MCCULLOUGH & KELLY, 2006).

Sendo assim, para prevenir ou minimizar o efeito dos radicais livres, quantidades suficientes de antioxidantes precisam ser consumidas diariamente (LIU, 2003).

Cosméticos antioxidantes

Da mesma forma como ocorre em todo o nosso organismo, os radicais livres também agem sobre o tecido cutâneo, sendo formados principalmente por ações exógenas, como é o caso da radiação ultravioleta. Dependendo da dose, tempo de exposição, comprimento de onda e região exposta, a radiação ultravioleta pode causar desde queimaduras na pele e envelhecimento cutâneo precoce até danos ao DNA celular cutâneo e câncer de pele (SCHARFETTER-KOCHANNEK et al., 1997; MATSUMURA & ANANTHASWAMY, 2002).

A maioria das alterações que afetam a pele e são atribuídas à idade, 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. São produtos com função de reproduzir a proteção natural e limitar as reações químicas oxidativas. Para esta finalidade, são utilizados em formulações cosméticas substâncias antioxidantes como vitaminas (Vitaminas E e C), 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).

Em um trabalho de Kim et al. (1997) foram testados cem extratos de plantas quanto à atividade antioxidante por diferentes metodologias para a aplicação em

cosméticos. Quando aplicaram o ensaio do DPPH, os extratos com atividade mais significativa apresentaram capacidade de sequestro do radical livre superior a 60% na concentração de 1000 µg/mL, e foram considerados extratos de grande potencial antioxidante.

***Psidium guajava* L.**

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



Figura 1. Árvore, flor e fruta 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; Rica, Século XXI, IAC-4 (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 em nosso organismo 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).

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.

Compostos fenólicos e flavonóides

Compostos polifenólicos naturais, como os flavonóides, são potentes antioxidantes devido à sua propriedade de sequestrar diferentes tipos de radicais livres, colaborando para a atividade quimioprotetora (ETCHEVERRY *et al.*, 2008).

Existem aproximadamente oito mil compostos fenólicos que ocorrem naturalmente, dentre eles, os flavonóides são o grupo mais diversificado (HEIM *et al.*, 2002; BALASUNDRAM *et al.*, 2005).

As propriedades relacionadas à saúde humana, exercidas pelos compostos fenólicos são baseadas, principalmente, na sua atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres (PRIOR & CAO, 2000) e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (SILVA *et al.*, 1998; TERAO & PISKULA, 1999). Devido a essas propriedades, os extratos das plantas que os contém são muito utilizados em cosmética para retardar o envelhecimento da pele (PROENÇA DA CUNHA *et al.*, 2004). Além disso, estudos indicam efeitos benéficos à saúde, principalmente na prevenção de doenças degenerativas, como câncer e doenças

cardiovasculares, através da prevenção de danos iniciais no DNA pelos flavonóides (WILMS et al., 2005; ETCHEVERRY et al., 2008; HUBER et al., 2008).

Estão presentes em diversas plantas e frutas, utilizadas como alimentos e, além da propriedade antioxidante, tem sido demonstrado que podem ter a capacidade de reduzir a toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade de diversos produtos químicos (BARTSCH et al., 1988; AMES & GOLD, 1991; AGARWAL et al., 1993).

Avaliação da segurança de cosméticos

Está claro que os consumidores buscam, cada vez mais, cosméticos mais eficientes, que se aproximem da definição de cosmecêuticos, ou seja, apresentando realmente algum efeito biológico, principalmente na prevenção do envelhecimento precoce, e de doenças como cânceres causados pela ação dos radicais livres no material genético celular. Portanto, assim como medicamentos, estes produtos devem também oferecer segurança ao consumidor.

Recentemente, a indústria cosmética e pesquisadores têm procurado utilizar experimentos *in vitro*, em substituição a modelos animais, para o desenvolvimento de testes de eficácia e segurança de matérias-primas cosméticas, bem como as formulações cosméticas.

Adicionalmente, a diretiva da Comunidade Européia (93/95/EC) determinou que os produtos cosméticos produzidos e comercializados nos países membros, não devem utilizar animais para a realização de ensaios toxicológicos (AUGUSTIN et al., 1996). Entretanto, apesar dos esforços da comunidade científica em reduzir e/ou substituir a utilização de animais de laboratório na experimentação biológica, diversos estudos utilizam animais em ensaios pré-clínicos (MARONA, 2003).

Como alternativa para a experimentação em animais, ensaios com cultivo celular têm sido propostos com o objetivo de prever o potencial tóxico de produtos químicos e formulações (LIVNY et al., 2003; VIRAVAIIDYA et al., 2004; RABACHINI, 2007). Dessa forma, os experimentos em cultura de células permitem o estudo do comportamento celular em microambiente controlado, utilizando células epiteliais humanas não-tumorais (BEDONI et al., 2007; HEISE et al., 2006). Cultura de células primárias como, por exemplo, os queratinócitos, explantes de pele, culturas de órgãos

ou células organotípicas têm sido utilizadas nos ensaios pré-clínicos de produtos naturais (BOTHAM et al., 1998; MEDINA, 2000; ABU-YOUSIF et al., 2008).

De acordo com esta tendência de substituição dos ensaios *in vivo* em cosméticos, este estudo utilizou técnicas *in vitro* para a avaliação da segurança e eficácia do produto desenvolvido.



Objetivos

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento, estudo da eficácia e segurança de fitocosmético antioxidante contendo extrato de *Psidium guajava* L.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o material vegetal para posterior obtenção de extratos
- Caracterizar o material vegetal
- Preparar extratos de *P. guajava* L. a partir de diferentes sistemas solventes
- Caracterizar os extratos vegetais obtidos, objetivando a determinação do extrato mais adequado para o desenvolvimento do fitocosmético antioxidante
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato etanólico 70° GL de *P. guajava* L.
- Validar a metodologia analítica para a quantificação do extrato etanólico 70° GL de *P. guajava* L.
- Desenvolver a formulação do fitocosmético
- Caracterizar a formulação do creme base e do fitocosmético quanto ao tipo de emulsão, comportamento reológico, formação de estruturas líquido-cristalinas e estabilidade físico-química
- Avaliar a atividade antioxidante do fitocosmético
- Avaliar o perfil de liberação do extrato a partir do fitocosmético, a permeação e a retenção cutâneas do extrato



Justificativa

É sabido que a maior consequência 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 (BRASH, 1997; KRAEMER, 1997).

O desenvolvimento de uma formulação de uso tópico que auxilie na prevenção do envelhecimento precoce e de doenças, causados pelos radicais livres à pele humana é de grande valia, trazendo benefícios estéticos, que influenciam diretamente a saúde psicológica do usuário e previnem a fotocarcinogênese. Deve ficar claro que este cosmético não visa a substituição de filtros solares mas, sim, a ação conjunta, oferecendo à população a possibilidade de proteger a pele e evitar os danos que podem ser causados pela exposição diária ao sol. Este fato se torna ainda mais importante em um país tropical como o Brasil, onde a incidência de radiação UV tem se tornado cada vez maior, assim como o desenvolvimento de cânceres de pele na população. Além disso, a importância deste produto é evidenciada no fato de que a prevenção de doenças crônicas é uma estratégia mais efetiva que o próprio tratamento e isto pode ser feito com a utilização de produtos contendo compostos bioativos, com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides.



Material

e Métodos

MATERIAL E EQUIPAMENTOS

Material: hipoclorito de sódio a 0,2%, água destilada, etanol (Synth e Chemis), reagente Folin-Ciocalteu (Imbralab), carbonato de sódio (Na₂CO₃), ácido gálico (Sigma), nitrito de sódio (NaNO₂), cloreto de alumínio (AlCl₃), hidróxido de sódio (NaOH), rutina (Sigma), quercetina (Sigma), radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH) (Sigma-Aldrich), metanol PA e grau HPLC (Merck, Chemis), ácido ascórbico (Galena), ABTS (Sigma), persulfato de potássio (Synth), cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa (C18) com 200 mg/3 mL (Phenomenex), coluna Phenomenex C18-Hydro (250 mm x 4,6 mm x 250 mm x 3,5 µm), discos de 0,45 µm de poro (Millipore), acetonitrila grau ultra-resíduo (Mallinckrodt, Baker Inc), Ácido trifluoracético (Riedel-deHaën), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma), meio de cultura MEM (Cultilab), soro fetal bovino (Cultilab), antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL) (Sigma), tripsina (Gibco), PBS (phosphate buffer saline), dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), álcool isopropílico (Merck), tampão fosfato pH7,4, placas de 96 poços para cultura celular (estéreis) (TPP), Cetareth – 20, Cetyl alcohol, Glyceryl stearate, Diisopropyl adipate, Ethylhexyl stearate, Mineral oil, BHT, Methylparaben, Propylparaben, EDTA, Propylene glycol, Carbomer, tubos de 15 mL estéreis (TPP), garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm² (TPP), membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich), fita adesiva (Scotch - 3M), corante hidrofílico amarelo de tartrazina, corante lipofílico F. Brown.

Equipamentos: pipetadores automáticos com volume variável de 10-100 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL (Eppendorf), estufa de ar circulante (Soc Fabel modelo 170), moinho de facas (Tecnal), tamises, liquidificador doméstico (Arno), evaporador rotativo (Marconi MA-120), liofilizador (Moduloyd Freeze Dryer – Thermo Scientific), espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi U-2001), espectrofotômetro UV/Vis (Beckman DU530), cromatógrafo Jasco, modelo PU 2089 de gradiente quaternário acoplado a um detector do tipo arranjo de foto diodos (PDA) MD-2010 e um detector de dicroísmo circular CD-2995, centrífuga (Eppendorf 5810 R), centrífuga Fanem-Baby, leitor de

placas (Bio-rad Model 550), equipamento de permeação Microette (Hanson Research), ultra-som (Unique Ultrasonic Clear), agitador de tubos (Phoenix AP56), dermatômetro (Nouvag TCM300), microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000), microscópio óptico (Motic BA310), câmera digital (Sony DSC-S500), reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1, sensor do tipo cone-placa (C35/2°Ti), estufa de CO₂ (Shel Lab), estufa (Quimis), peagômetro digital (Gehaka PG 1800), balança analítica (Bel Engineering).

MÉTODOS

1) Preparo do material vegetal

As goiabas da variedade Paluma foram colhidas no dia 16 de março de 2009, no período da manhã, por volta das 10 h. Em seguida, ainda no mesmo dia, as frutas foram lavadas em água corrente e submersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,2% durante 2 horas para desinfecção. Foram novamente lavadas com água destilada e secas. No dia seguinte, pela manhã, foram cortadas em pedaços menores e dispostas em estufa de ar circulante a 60° C até que o peso se mantivesse estável.

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

Foram utilizados 27.356,46 gramas de goiaba fresca.

2) Caracterização do material vegetal

2.1) Determinação de perda por secagem

Quatro porções de exatamente 100 g da fruta fresca foram secas em estufa de ar circulante a 60° C até que o peso se mantivesse estável para o cálculo da perda por secagem da goiaba (ALBERTON et al., 2001).

2.2) Determinação da granulometria da fruta seca e pulverizada

Toda fruta pulverizada foi submetida à passagem por tamises com abertura de malha de 0,42, 0,59, 0,84 e 0,125 mm. A porção de pó que apresentou granulometria maior que a determinada, foi submetida à nova trituração em liquidificador doméstico (Farmacopeia Brasileira, 1988).

3) Preparo dos extratos de *Psidium guajava* L.

Foram preparados quatro extratos de *Psidium guajava* L., utilizando a fruta seca e pulverizada e quatro sistemas solventes diferentes: água (EAq), etanol absoluto (E100), etanol 90° GL (E90) e etanol 70° GL (E70).

A extração foi efetuada através do método de percolação (SIMÕES et al., 2007).

Para extração de 50 gramas de fruta seca e pulverizada foram utilizados 1500 mL do sistema solvente, em fluxo contínuo sob a amostra durante 96 horas. O procedimento foi realizado à temperatura ambiente.

Os extratos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar e estocados a $5 \pm 2^\circ$ C, até que fossem submetidos à secagem.

Para a redução do volume, os extratos foram evaporados em evaporador rotativo à temperatura máxima de 60° C e, em seguida, foram liofilizados.

Foram preparados três extratos com cada um dos solventes.

4) Caracterização dos extratos

4.1) Doseamento de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais dos extratos secos de *Psidium guajava* L. foram determinados segundo metodologia descrita por Singleton & Rossi (1965) e Kähkönen et al. (1999), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e curva analítica de ácido gálico.

Para isto, 400 μ L de amostra (extratos solubilizados em água na concentração de 6 mg/mL) foram adicionados a 2 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10 v:v) em tubos de ensaio. Após 8 minutos, foram adicionadas 1,6 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a

7,5%. Os tubos foram agitados e deixados em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida, as absorvâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro UV/Vis a 765 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, com cada uma das três extrações diferentes para cada sistema solvente.

Os resultados foram expressos em mg de fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por 100 mg do extrato.

4.2) Doseamento de flavonóides

Os extratos obtidos a partir dos quatro diferentes sistemas solventes foram avaliados quanto ao teor de flavonóides. Para isto, foi utilizada a metodologia descrita por Zishen *et al.* (1999). Em tubos de ensaio, foram colocados 5 mL de soluções do extrato em água na concentração de 6 mg/mL e foram adicionados 0,3 mL de nitrito de sódio (NaNO₂) (1:20). Após 5 minutos, foram acrescentados 0,6 mL de cloreto de alumínio (AlCl₃) (1:10). Decorridos 6 minutos, 2 mL de hidróxido de sódio (NaOH) (1M) foram adicionados à reação e o volume foi completado para 10 mL com água destilada. Os tubos foram agitados e as absorvâncias das soluções foram lidas a 510 nm em espectrofotômetro UV/Vis. Os experimentos foram realizados em triplicata, com cada uma das três extrações diferentes de cada sistema solvente.

Os resultados foram expressos em mg de flavonóides equivalentes à rutina e quercetina por 100 mg do extrato, tendo sido construídas curvas analíticas de rutina e de quercetina.

4.3) Avaliação do potencial antioxidante dos extratos

4.3.1) Ensaio do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Psidium guajava* L. foi realizada com o uso do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001) e Falcão *et al.* (2006), com modificações.

Um mililitro da solução aquosa dos extratos, em diferentes concentrações (de 0 a 30 mg/mL), foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH (0,004%). As

soluções foram mantidas ao abrigo da luz e após 30 minutos foi determinada a absorvância das soluções a 515 nm.

Foram utilizadas soluções controle contendo apenas 1 mL de água e 2,5 mL da solução metanólica de DPPH a 0,004%. A média das absorvâncias destas amostras foi usada como a absorvância máxima, servindo para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH (% de inibição) (MOLYNEUX, 2004).

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \frac{(A_{\text{máx}} - A_{\text{teste}})}{A_{\text{máx}}} \times 100, \text{ onde:}$$

A Máx é a absorvância do DPPH em 515 nm na ausência de amostra (controle).

A Teste é a absorvância do DPPH em 515 nm na presença de amostra.

O ensaio também foi realizado para a vitamina C, como padrão antioxidante, em diferentes concentrações.

O ensaio do DPPH para cada concentração foi realizado em triplicata para cada extrato.

4.3.2) Ensaio do radical ABTS

Este ensaio foi realizado de acordo com Rufino et al. (2007). Apenas o extrato etanólico 70° GL foi avaliado, uma vez que foi o que apresentou mais eficiente inibição ao radical DPPH e, portanto, melhor atividade antioxidante.

Uma solução estoque de ABTS a 7 mM foi preparada. Em seguida, o radical livre ABTS foi obtido através da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS (7 mM) com 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). Esta reação transcorreu por 16 horas e foi realizada na ausência da luz.

Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato, o radical ABTS foi solubilizado em etanol até que uma absorvância de $0,7 \pm 0,05$, a 734 nm fosse obtida. Então, 3 mL do radical ABTS foi adicionado a 30 µL de soluções dos extratos em diferentes concentrações (de 0 a 20 mg/mL), em tubos de ensaio. Após 6 minutos, a absorvância das amostras foi determinada a 734 nm.

As porcentagens de inibição do radical ABTS em relação à concentração do extrato foram determinadas com a mesma equação utilizada na avaliação da atividade

antioxidante com o radical DPPH (4.3.1). Em seguida, uma curva dose-resposta foi construída, e o IC₅₀ foi determinado de acordo com a equação da reta obtida.

4.4) Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

A fim de determinar com maior precisão os tipos de metabólitos secundários ocorrentes nos extratos etanólicos e aquoso de *P. guajava* L., foi registrado o perfil cromatográfico desses extratos por meio de análises por CLAE-UV-PDA.

Este procedimento foi efetuado através de um Cromatógrafo Jasco, modelo PU 2089 de gradiente quaternário acoplado a um detector do tipo arranjo de foto diodos (PDA) MD-2010 e um detector de dicroísmo circular CD-2995. Foi utilizada coluna Phenomenex C18-Hydro (250 mm x 4,6 mm x 250 mm x 3,5 µm).

As amostras foram preparadas por um procedimento de *clean up*, foram utilizados cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa (C18) com 200 mg/3 mL, sendo as soluções resultantes filtradas em discos de 0,45 µm de poro.

5) Avaliação do potencial citotóxico

O método de MTT, utilizado para a avaliação de citotoxicidade, tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta (MOSMANN, 1983).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em células de hepatoma humano (HepG2) que possuem a capacidade de metabolização de xenobióticos, e em queratinócitos humanos metabolicamente incompetentes (HaCat). Foram cultivadas em meio de cultura *Minimum Essential Media* (MEM) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram mantidas a 37±2° C em atmosfera de 5% de CO₂. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas, centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos, então, semeadas em placas de 96 poços (Figura 2). Para neutralização da tripsina foi utilizado MEM com soro fetal bovino. A densidade celular para os ensaios de

citotoxicidade (MTT) foi de 1×10^6 células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para a completa adesão das células às placas de 96 poços.

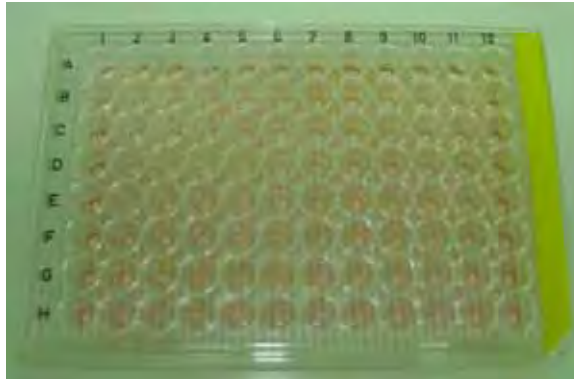


Figura 2. Cultura de células em placa de 96 poços.

Em seguida, as células foram tratadas com 1 mL de controle positivo (Dimetilsulfóxido a 10%), controle negativo (MEM com soro), e diferentes concentrações do extrato (solubilizado em MEM com soro), durante 24 horas.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (BRUGGISSER et al., 2002) e 100 μ L de MTT (1 mg/mL de em PBS) foram adicionados em cada poço. As células na microplaca foram incubadas a $37 \pm 2^\circ$ C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violeta de formazana (3 a 5 horas). Este procedimento pode ser visualizado no esquema da Figura 3.

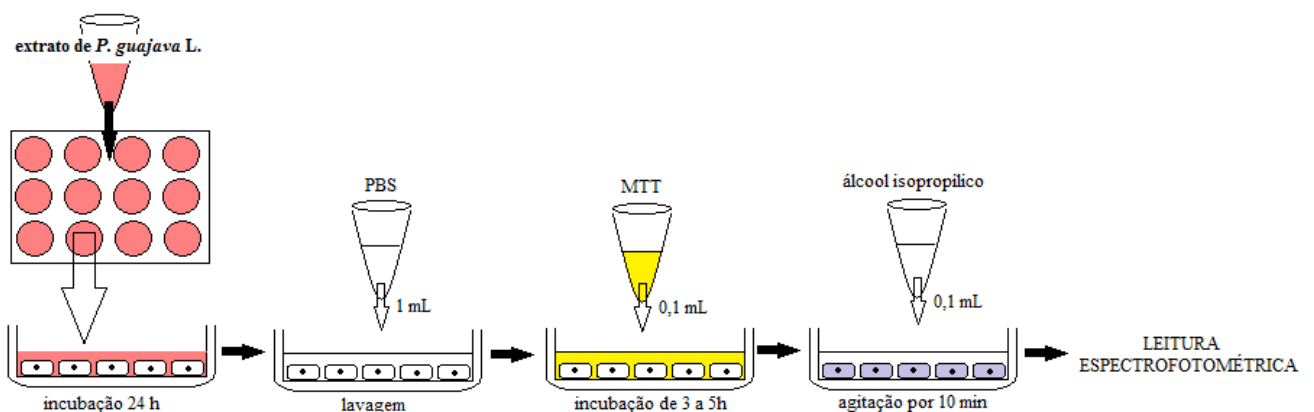


Figura 3. Procedimento para avaliação da citotoxicidade do extrato de *P. guajava* E70.

Para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância, em comprimento de onda de 595 nm, foi realizada em leitor de placas.

A porcentagem de células mortas foi calculada em relação ao controle negativo, representando a citotoxicidade de cada tratamento, segundo proposto por Zhang et al. (2004) e, em seguida, foi determinada também a porcentagem de células vivas. Para as diferentes linhagens foi calculado o IC₅₀. Os ensaios de citotoxicidade foram realizados em, no mínimo, 3 experimentos independentes.

6) Validação da metodologia de quantificação do extrato através do método do DPPH

Para validar a metodologia foram analisados: a especificidade, a linearidade, a precisão, a sensibilidade, o limite de quantificação, o limite de detecção e a exatidão deste método, segundo a Resolução-RE N°899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

6.1) Linearidade

Foram obtidas três curvas experimentais, a partir de, pelo menos, dez concentrações diferentes do extrato, sendo que cada uma das concentrações em cada uma das curvas foram preparadas em triplicata.

6.2) Exatidão

A exatidão foi determinada pela avaliação da recuperação, ou seja, quantidades conhecidas de extrato foram utilizadas e a relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica foi avaliada.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100$$

6.3) Limite de detecção

A estimativa do limite de detecção foi feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, através da equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações da substância ativa próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

6.4) Limite de quantificação

O limite de quantificação do método pode ser calculado através da equação:

$$LQ = \frac{DPa \times 10}{IC}, \text{ onde:}$$

DPa é o desvio padrão do intercepto com o eixo do y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas com concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação.

IC é a inclinação da curva analítica.

6.5) Precisão

Pode ser considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrída), Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

A precisão do método analítico foi calculada como o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas, segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100, \text{ onde:}$$

DPR é o desvio padrão relativo,

DP é o desvio padrão, e,

CMD é a concentração média determinada.

6.5.1) Repetitividade ou precisão intra-corrída

A repetitividade do método é verificada por, no mínimo, nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada ou mínimo de seis determinações a 100% da concentração do teste. Este procedimento foi repetido em um curto intervalo de tempo, ou seja, foi realizado durante a manhã e durante a tarde de um mesmo dia, com o mesmo equipamento e operador.

6.5.2) Precisão intermediária ou precisão inter-corrídas

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados obtidos em dias diferentes. Portanto, este parâmetro foi verificado em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, em dias diferentes.

6.5.3) Reprodutibilidade

É a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes. Portanto, este ensaio foi realizado utilizando o espectrofotômetro (Beckman DU530) do Laboratório de Imunologia, Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP. Também foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada.

6.6) Especificidade e Seletividade

Soluções de concentrações conhecidas de extrato foram contaminadas com quantidades adequadas do creme base. Em seguida, os resultados obtidos foram comparados com o da curva analítica construída. Também foi verificada em três

concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada. E a especificidade e seletividade foram expressas como desvio padrão relativo (DPR).

6.7) Robustez

A robustez foi determinada através da variação do fabricante de um dos solventes utilizados no método, o metanol. A robustez do método foi verificada em três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas cada, sendo calculado o desvio padrão relativo (DPR) dos valores obtidos, com os descritos na curva analítica.

6.8) Curvas analíticas com solventes diferentes

Após o método ter sido validado, duas novas curvas analíticas foram construídas com outros solventes utilizados neste estudo. A validação foi efetuada utilizando a água como solvente para o extrato, entretanto, na avaliação da liberação do extrato da formulação, da permeação e retenção cutâneas e, mesmo no estudo da estabilidade do extrato no fitocosmético, foram utilizados como solventes tampão fosfato (pH=7,4) e metanol.

7) Desenvolvimento do creme base e do fitocosmético

Foi desenvolvida uma formulação do tipo emulsão, denominada creme base, contendo baixa concentração de componentes graxos e pequena variedade de matérias-primas, visando a obtenção de um creme que proporcione baixa toxicidade e que não cause sensação de excessiva oleosidade na pele.

Em seguida, para a obtenção do fitocosmético, foi efetuada a incorporação do extrato em concentração definida de acordo com o potencial antioxidante, potencial citotóxico e resultados obtidos no teste de permeação cutânea.

8) Avaliação do perfil de liberação do extrato a partir do fitocosmético, e a permeação e retenção cutâneas do extrato

Estes ensaios foram realizados com o fitocosmético contendo 5, 10 e 20% do extrato de *P. guajava* L. As três concentrações foram testadas visando obter dados complementares na decisão de uma concentração eficiente de ativo para o desenvolvimento do fitocosmético. Os dados foram analisados juntamente com os resultados da atividade antioxidante e citotóxica do extrato, com a finalidade de avaliar qual a concentração eficiente e segura de ativo a ser utilizada.

8.1) Avaliação da liberação do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

A avaliação da liberação do extrato de *P. guajava* L. a partir do fitocosmético foi efetuada de acordo com metodologia descrita por Marquele et al. (2006) e OECD (2004).

Os ensaios de liberação foram desenvolvidos utilizando células de Franz modificadas (Figura 4) com área de difusão de 1,77 cm², no equipamento Microette (Hanson Research) (Figura 5) e membrana de celulose (Sigma-Aldrich).

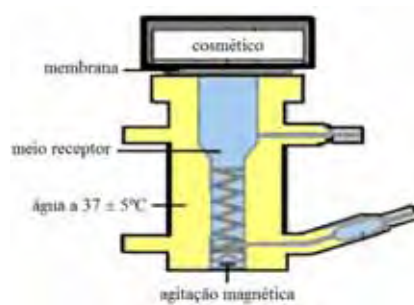


Figura 4. Célula de Franz modificada (modificado de www.hansonresearch.com).



Figura 5. Equipamento para avaliação da liberação, permeação e retenção cutâneas. Disponível em: www.labplus.co.kr.

O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi completado com 7,0 mL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4). Amostras de 250 mg do fitocosmético foram acondicionadas sobre a membrana. A solubilidade do extrato na solução receptora foi testada para garantir as *sink conditions*.

A solução receptora foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética presente nas células de Franz e mantida a $37 \pm 5^\circ \text{C}$ por meio de um banho-maria circulante nas células encamisadas.

A quantidade de extrato liberada da formulação foi avaliada após 2, 4 e 8 horas de ensaio.

Os experimentos foram repetidos cinco vezes para cada tempo e concentração de extrato. Como a quantidade de amostra utilizada para a quantificação indireta pelo método do DPPH era de 1 mL por amostra e as quantificações foram realizadas em triplicata não foi possível utilizar a reposição do meio receptor. Sendo assim, para cada tempo de coleta foram realizados experimentos independentes.

A quantidade de extrato liberada foi avaliada através da % de inibição do radical DPPH causada pela solução receptora. Como branco da reação, foi utilizada a reação entre o DPPH e a solução receptora de uma célula de Franz modificada, que tinha como amostra o creme base.

8.2) Avaliação da permeação cutânea do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

Este ensaio foi desenvolvido da mesma maneira como descrito no item 8.1 para avaliação da liberação do extrato de *P. guajava* L. do fitocosmético, entretanto, foi utilizada membrana biológica. A membrana biológica escolhida foi pele dissecada da orelha de porco, sem o tecido subcutâneo e gorduroso presente abaixo da derme (Figura 6). As orelhas de porco não escaldadas foram adquiridas do Abatedouro Olhos d'Água (Ipuã - SP). Antes de iniciar o experimento as peles foram dermatomizadas para a obtenção de uma espessura da pele que equivale a epiderme e derme (500 µm) utilizando um dermatômetro (Nouvag TCM300).

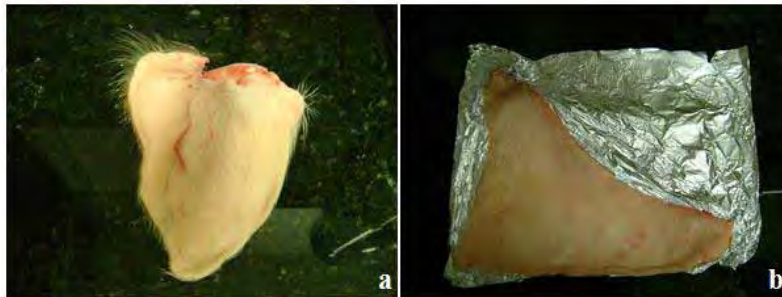


Figura 6. Membrana biológica para o ensaio de permeação: orelha de porco íntegra (a), e pele da orelha de porco dissecada (b).

8.3) Avaliação da retenção na epiderme e derme do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

Para a avaliação da retenção do ativo na epiderme e derme, a pele utilizada no estudo da permeação cutânea foi utilizada.

A extração do extrato retido na pele de orelha de porco foi baseada no método proposto por Tauber & Toda (1976) e Sasaki et al. (1991). Decorridas 2, 4 e 8 horas de permeação *in vitro*, a pele da orelha de porco foi retirada do aparelho de difusão. A área da pele exposta à permeação foi limpa com água destilada recortada apenas a área que teve contato com o fitocosmético e picotada. Os fragmentos obtidos foram mergulhados em 4 mL de metanol. A suspensão resultante foi submetida à sonicação em ultra-som para o rompimento das células por 30 minutos e agitação em vórtex por 5 minutos. O

Bruna Galdorfini Chiari

resíduo das peles foi removido da solução que foi analisada quanto à atividade antioxidante.

8.4) Avaliação da retenção no estrato córneo do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

Esta metodologia foi desenvolvida de acordo com Marquele-Oliveira et al. (2007). Antes da utilização da pele da orelha de porco, o tecido foi primeiramente submetido à remoção do estrato córneo pela técnica de *tape stripping*. Para isso, 15 pedaços de fita adesiva (3M), foram coladas e removidas da área de difusão da pele. As fitas adesivas foram mergulhadas em metanol (4 mL) para a extração do ativo. Esta suspensão foi submetida à sonicação por 15 minutos e agitação em vórtex por 1 minuto. O sobrenadante foi submetido à avaliação da atividade antioxidante.

9) Avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético

A atividade antioxidante do fitocosmético foi efetuada através da metodologia do DPPH, assim como foi realizado com os extratos de *P. guajava* L. A metodologia está descrita no item 4.3.1.

Para isto, uma solução a 7 mg/mL do fitocosmético (5%) em metanol foi preparada para a avaliação da porcentagem de captura do radical DPPH. Como branco, foi utilizada uma solução na mesma concentração do creme base.

10) Caracterização das formulações

10.1) Classificação do tipo de emulsão

Para determinar o tipo de emulsão (A/O ou O/A) obtido, foram utilizados dois corantes, um de caráter hidrofílico (Amarelo de tartrazina) e outro lipofílico (F. Brown). Estes corantes foram adicionados a duas amostras do creme base com agitação visando obter amostras homogêneas (PRISTA et al., 1996).

Em seguida, estas amostras foram dispostas em lâminas de microscopia, sobre as quais foi colocada uma lamínula.

As lâminas foram observadas em microscópio óptico (Motic BA310) com aumentos de 40, 100 e 400 vezes e fotografadas com câmera digital (Sony DSC-S500).

10.2) Caracterização reológica das formulações

Uma amostra de creme isenta de extrato de goiaba (creme base) e o fitocosmético foram caracterizadas reologicamente por meio do reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1. Os ensaios foram realizados utilizando o sensor do tipo cone-placa (C35/2°Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.

O comportamento reológico foi avaliado pela determinação de:

- Propriedade de fluxo das amostras, com tensão de cisalhamento de 0 - 100 Pa por um período de 120 segundos para curva ascendente e 120 segundos para a curva descendente;
- Limite de escoamento, submetendo as amostras à tensão de cisalhamento de 0 a 10 Pa, por 300 segundos;
- Varredura de tensão, com tensão de cisalhamento de 0-100 Pa com frequência constante de 1 Hz;
- Varredura de frequência, submetendo as amostras à tensão de cisalhamento constante de 1 Pa, utilizando frequências variáveis de 0,1 a 50 Hz.
- Fluência e relaxação com tensão de cisalhamento de 1 Pa por 300 segundos e recuperação por mais 300 segundos, cessando a tensão aplicada;

Todos os ensaios foram realizados à temperatura de $32\pm 1^\circ\text{C}$ e, em triplicata. Os gráficos foram plotados no software Origin 7.0.

10.3) Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas no creme base e no fitocosmético

10.3.1) Avaliação das formulações utilizando microscopia de luz polarizada

Amostras do creme base e do fitocosmético foram dispostas em lâminas de microscopia, sobre as quais foi colocada uma lamínula.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) acoplado à capturador de imagens (Moticam 2000).

10.3.2) Avaliação das formulações pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

As nanoestruturas das fases que compõem o creme base e o fitocosmético foram avaliados por medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (small angle X-ray scattering - SAXS). A coleta de dados foi realizada no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS - Campinas), na linha de luz Síncrotron para SAXS, equipada com um monocromador ($\lambda = 1.608\text{\AA}$) Si (1 1 1) assimetricamente cortado e dobrado, que produz um feixe de luz focado horizontalmente.

Um detector de raios-X em posição vertical e um analisador multicanal foi utilizado para capturar a intensidade das medidas de SAXS, $I(q)$, em função do módulo do vetor de espalhamento q , $q = (4\pi/\lambda) \sin(\varepsilon/2)$, sendo ε o ângulo de espalhamento. A dispersão dos raios produzida por fendas foi subtraída da intensidade de espalhamento total. Ambas as intensidades foram descritas em unidades relativas, mas, para uma comparação quantitativa, elas foram normalizadas para as mesmas condições experimentais.

Uma vez que o feixe incidente de raios-X apresenta um ponto de seção transversal no plano de detecção, e a resolução do detector foi menor, nenhum tratamento matemático das curvas foi realizado.

10.4) Avaliação da estabilidade das formulações

O estudo da estabilidade do creme base e do fitocosmético foi realizado de acordo com metodologia descrita pela ANVISA (2004) e Isaac et al. (2008).

A avaliação da estabilidade foi iniciada com a centrifugação das amostras 24 horas após a preparação dos cremes. Os produtos foram submetidos à centrifugação durante 30 minutos com velocidade de 3.000 rpm. Outras avaliações foram realizadas periodicamente, completando 90 dias de análise.

Amostras do creme base e do fitocosmético foram submetidas a condições de estresse: $5\pm 2^\circ\text{C}$, $-5\pm 2^\circ\text{C}$, $45\pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de congelamento e descongelamento e exposição à luz solar. Uma amostra de cada um dos produtos foi mantida à temperatura ambiente, como controle.

Os parâmetros analisados foram:

- **ASPECTO E COR:** Foram analisados visualmente
- **ODOR:** Foi analisado através do sensorial
- **pH:** Foi determinado com auxílio do peagômetro digital. Para isso foram preparadas suspensões das amostras a 10% (DAVIS, 1977).
- **VISCOSIDADE APARENTE MÍNIMA:** Foi determinada com o uso do reômetro HAAKE (modelo RS-1), sendo determinada a viscosidade da amostra submetida à taxa de cisalhamento de 100 s^{-1} . Esta análise foi realizada utilizando o sensor cone-placa (C35/ 2°Ti) a $32\pm 1^\circ\text{C}$.
- **DENSIDADE RELATIVA:** Foi determinada com o auxílio de um picnômetro. Para isto, a massa do picnômetro vazio, com água e com a amostra foram determinadas. A massa do produto contido no volume do picnômetro foi dividida pela massa da água contida no mesmo volume.
- **DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ATIVO:** Foi realizada através da atividade antioxidante, utilizando o método do DPPH e a curva analítica construída na validação do método de quantificação. Neste ensaio, foi preparada uma solução da amostra em metanol (7 mg/mL), e a atividade antioxidante foi determinada. Como branco foi utilizada uma solução do creme base em metanol.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram expressos em média e desvio padrão.

11) Análise estatística dos resultados

A análise estatística e a plotagem dos gráficos foi realizada utilizando o software Origin 7. A análise dos dados foi realizada pela determinação de média e desvio padrão, além de análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), quando adequado.



Resultados e Discussão

1) Preparo do material vegetal

Na Figura 7 podem ser observadas as etapas do processo de preparo do material vegetal.



Figura 7. Etapas de preparação do material vegetal.

As frutas foram cortadas em pedaços menores, para secar mais rapidamente. O tempo de secagem foi de aproximadamente 72 horas. Os frutos foram desidratados, pois o alto teor de umidade sugere a necessidade de secagem para melhor conservação do produto, uma vez que altos índices de umidade favorecem a proliferação de microorganismos podendo comprometer a qualidade (CÓRDOVA et al., 2005). Além disso, como os frutos foram posteriormente submetidos à extração, o processo de secagem auxiliou na concentração dos ativos em menor massa da fruta, facilitando o processo de secagem após a extração e reduzindo o volume de solvente extrator neste processo.

Outro motivo que justifica a secagem da fruta é que este processo promove a estabilização do vegetal, impedindo a ocorrência de reações enzimáticas que possam

degradá-los ou modificá-los. A secagem por liofilização não foi adotada por ser inviável devido à grande quantidade de material vegetal utilizado.

O processo de secagem apresentou rendimento de 14,58% representando 3.988,94 gramas de fruta seca.

Durante a pulverização da fruta seca em moinho de facas, as sementes da goiaba não foram trituradas e, desta forma, puderam ser separadas do pó que foi utilizado na preparação dos extratos. Apesar de conter compostos de interesse como compostos fenólicos, inclusive a quercetina, as sementes possuem também compostos que são citotóxicos sendo, portanto, desprezadas (MICHAEL et al., 2002; SALIB & MICHAEL, 2004).

2) Caracterização do material vegetal

2.1) Determinação de perda por secagem

As massas obtidas após a secagem de 100 g de fruta de *P. guajava* L., foram:

- 1) 15,15 g: perda de 84,85%
- 2) 15,79 g: perda de 84,21%
- 3) 15,62 g: perda de 84,38%

Portanto, a perda média por secagem é de 84,48 % da massa inicial da fruta fresca, com desvio padrão entre as massas de 0,3315 e variância de 0,1099. Estes resultados estão de acordo com Medina & Pagano (2003) e Franco (2003), que indicam que a goiaba contém $84,3 \pm 0,1\%$ e 86,07% de água, respectivamente.

2.2) Determinação da granulometria da fruta seca e pulverizada

As partículas obtidas após a pulverização das frutas secas em moinho de facas apresentaram uma granulometria média de 0,59 mm, sendo considerado como valor máximo de granulometria. As partículas que, após a pulverização, mantiveram-se maiores que 0,59 mm foram reprocessadas em liquidificador doméstico. Esse

procedimento foi realizado para que houvesse aumento na superfície de contato das partículas da fruta seca com o solvente extrator, promovendo extração mais eficiente dos princípios ativos, aumentando, assim, o rendimento da extração, reduzindo o volume de solvente utilizado no processo e diminuindo também o tempo de extração (MANDAL et al., 2007).

Entretanto, a redução do tamanho das partículas da fruta seca, no caso da extração com água, dificultou a separação do solvente da matriz vegetal, impedindo a utilização da percolação como método de extração. Por este motivo, a extração por maceração foi o método escolhido para a obtenção do extrato aquoso.

A granulometria máxima de 0,59 mm utilizada neste trabalho foi considerada adequada devido a comparação com o trabalho de Mukhopadhyay et al. (2006), que verificaram que partículas de 0,25 a 0,45 mm propiciam uma condição ótima para a extração de compostos fenólicos de *Cimicifuga racemosa*.

3) Preparo dos extratos de *Psidium guajava* L.

A utilização de água e etanol como solventes é baseada em dois conceitos: a afinidade molecular dos compostos que apresentam atividade antioxidante por estes solventes e, também, a segurança que apresentam tanto ao possível usuário deste produto, como ao meio ambiente (ANDREO & JORGE, 2006; WANG & WELLER, 2006). Outra vantagem é a fácil disponibilidade e o baixo custo.

Foram utilizados quatro sistemas solventes diferentes: água, etanol absoluto, etanol 90° GL e etanol 70° GL. Segundo Andreo & Jorge (2006), as etapas empregadas para a escolha da melhor forma de extração dos compostos bioativos da goiaba foram adequadas neste trabalho, uma vez que, para a identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais os autores sugerem a realização da extração com solventes de polaridades diferentes. Este procedimento tem o objetivo de comparar resultados e encontrar a melhor alternativa para a extração mais eficiente.

O procedimento foi realizado à temperatura ambiente, por se tratar de uma matéria rica em polifenóis, de fácil modificação estrutural, evitando, assim, temperaturas elevadas.

Os extratos preparados com água não puderam ser submetidos à percolação, uma vez que a água causou o intumescimento do pó da fruta seca. Sendo assim, os extratos aquosos foram preparados por maceração (SIMÕES et al., 2007), com a mesma quantidade de solvente e pelo mesmo período de tempo. Para a separação do extrato e do resíduo, foi utilizada a filtração.

As massas de extrato e os rendimentos após a liofilização dos extratos obtidos por percolação e maceração estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Massa em gramas dos extratos secos obtidos e rendimento das extrações com etanol 70 e 90° GL, etanol absoluto e água

Solvente usado	Extração	Extração	Extração	Média	Desvio padrão	Rendimento médio (%)
	1	2	3			
E70	22,30	22,73	23,17	22,73 ^a	0,43	45,03
E90	23,89	23,11	21,63	22,88 ^a	1,15	45,76
E100	15,27	17,48	15,81	16,19 ^b	1,15	32,37
EAq	18,68	22,64	20,32	20,55 ^a	1,99	41,10

^{a,b} Sendo $p < 0,05$, a média do rendimento das extrações diferem entre si.

Estatisticamente, o rendimento dos extratos E70, E90 e EAq foram iguais entre si. Apenas o E100 apresentou um rendimento menor. Imaginando uma utilização industrial destes extratos, o E100 seria o de menor interesse. Entretanto, este parâmetro não pode ser utilizado isoladamente na escolha de um melhor processo de extração, uma vez que a quantidade de compostos de interesse presentes nos extratos deve ser avaliada também. Por este motivo, análises fitoquímicas foram realizadas para o conhecimento do conteúdo de compostos de interesse em cada um dos quatro extratos.

4) Caracterização dos extratos

4.1) Doseamento de compostos fenólicos totais

A curva analítica de ácido gálico obtida (Figura 8), foi utilizada como parâmetro para os cálculos das concentrações de compostos fenólicos contidos no extrato, que

foram expressos em mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 mg de extrato.

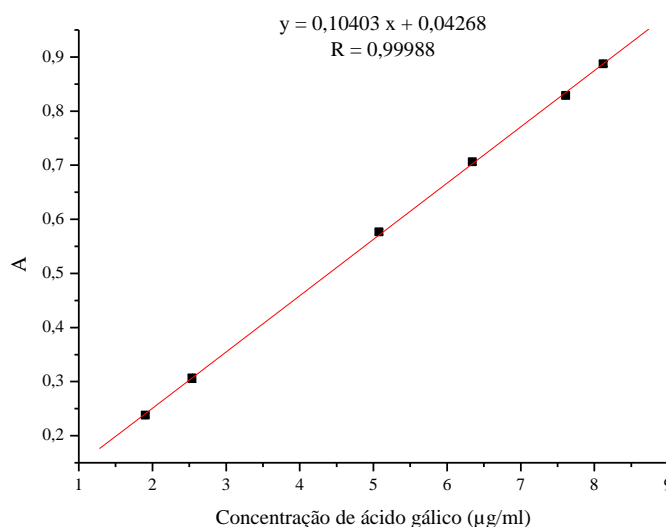


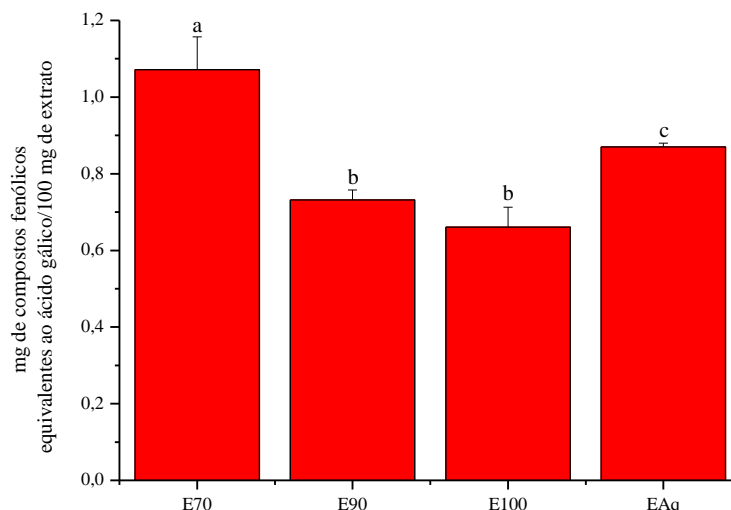
Figura 8. Curva analítica de ácido gálico.

As concentrações de compostos fenólicos contidos nos extratos estão listadas na Tabela 2 e Figura 9. Para evitar erros e verificar possíveis diferenças entre os processos de extração, foram realizadas três extrações com cada um dos sistemas extratores. As análises fitoquímicas foram, então, realizadas em triplicata e cada uma das repetições foi aplicada a cada um dos três extratos diferentes de cada sistema solvente.

Tabela 2. Concentração de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos avaliados (Resultados expressos em: mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 mg de extrato)

	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Média	Desvio padrão
E70	0,99234	1,162536	1,059676	1,071517 ^a	0,085713
E90	0,746877	0,701582	0,745857	0,731439 ^b	0,025862
A100	0,606330	0,709860	0,665709	0,660633 ^b	0,051951
EAq	0,859739	0,879807	0,870251	0,869932 ^c	0,010038

^{a, b, c} Sendo $p < 0,05$, a média da concentração de compostos fenólicos nos diferentes extratos diferem entre si.



^{a, b, c} Sendo $p < 0,05$, a média da concentração de compostos fenólicos nos diferentes extratos diferem entre si.

Figura 9. Concentração de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico nos extratos avaliados (Resultados expressos em: mg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico/100 mg de extrato).

Os resultados demonstraram que o solvente mais efetivo em extrair os compostos fenólicos da fruta seca e pulverizada de *P. guajava* L. foi o etanol 70° GL, seguido pela água e, finalmente, pelo etanol 90° GL e etanol absoluto, sendo que os dois últimos apresentaram a mesma eficiência de extração. Este comportamento está de acordo com a pesquisa desenvolvida por Shouqin et al. (2005), que demonstrou que a extração dos flavonóides, uma classe de compostos fenólicos, é fortemente influenciada pela concentração do etanol em água. Estes autores afirmaram que, quando o volume de etanol no solvente é menor que 75% (v/v), a extração dos flavonóides aumenta com o aumento da concentração de etanol, mas, quando o volume de etanol no solvente é maior que 75%, a extração dos flavonóides é reduzida com o aumento da concentração de etanol.

Unindo estes resultados ao rendimento das extrações, é possível inferir que os extratos E70 e EAq parecem ser os de maior interesse para este estudo, mas, outras análises foram realizadas para confirmar esta decisão.

Foi também possível afirmar que, tanto o etanol quanto a água são solventes capazes de extrair os compostos fenólicos, entretanto, a mistura destes dois solventes, para obtenção de etanol 70° GL, indica maior capacidade na extração de compostos fenólicos de *Psidium guajava* L.

A presença dos compostos fenólicos nos extratos estudados é um grande passo na obtenção de um fitocosmético com propriedades antioxidantes. Isto pode ser afirmado, uma vez que compostos fenólicos de plantas podem apresentar a capacidade de proteger componentes celulares contra foto-oxidação em virtude da forte absorção de luz ultravioleta (ROSA, 1996).

4.2) Doseamento de flavonóides

Os flavonóides foram pesquisados nos extratos devido ao interesse existente em explorar o poder que estes compostos apresentam em evitar danos oxidativos em células, demonstrado por vários estudos (PRIOR, 2003).

No doseamento de flavonóides, foram utilizados dois destes metabólitos como substâncias padrão: rutina e quercetina. Desta forma, duas curvas analíticas foram construídas (Figuras 10 e 11) para que as quantidades de flavonóides presentes nos extratos pudessem ser calculadas em mg de flavonóides equivalentes a quercetina / 100 mg de extrato e, em mg de flavonóides equivalentes a rutina / 100 mg de extrato.

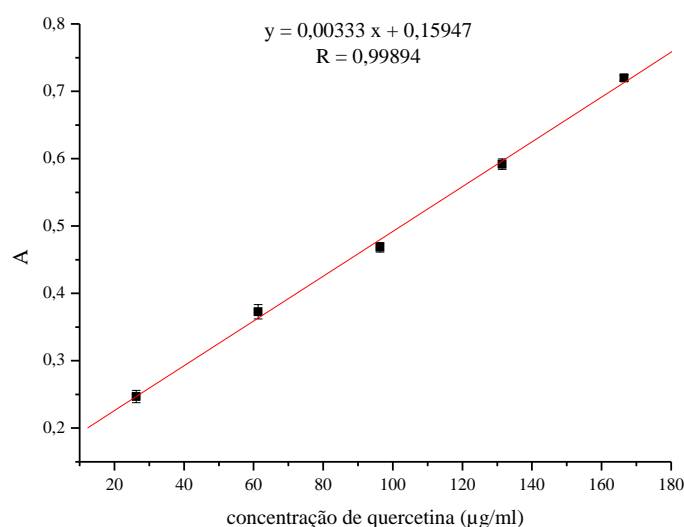


Figura 10. Curva analítica de quercetina.

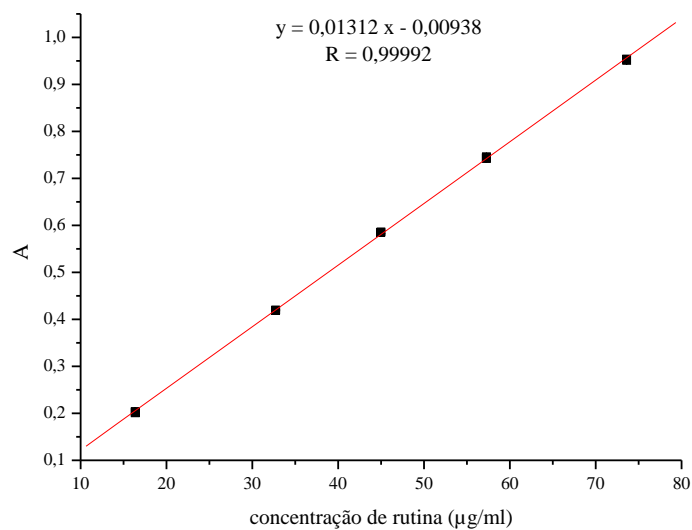


Figura 11. Curva analítica de rutina.

As concentrações de flavonóides encontradas nos extratos estão expostas nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Concentração de flavonóides equivalentes a quercetina nos extratos avaliados (mg de flavonóides/100mg de extrato)

	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Média	Desvio padrão
E70	0,607582	0,926556	0,809709	0,78128 ^a	0,16138
EAq	0,075505	0,216258	0,141538	0,14443 ^b	0,07042

a,b letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 4. Concentração de flavonóides equivalentes a rutina nos extratos avaliados

	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Média	Desvio padrão
E70	0,564073	0,635471	0,616029	0,60519 ^a	0,03691
EAq	0,413939	0,437914	0,426505	0,42612 ^b	0,01199

a,b letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados obtidos para os extratos com etanol 90° GL e absoluto não puderam ser utilizados, uma vez que durante o ensaio para o doseamento dos flavonóides ocorreu a turvação da solução que deveria ser analisada em espectrofotômetro, provavelmente devido a algum componente presente nestes extratos insolúveis no meio de reação ou a alguma reação química que ocorreu entre os constituintes. Com base em busca na literatura, é possível acreditar que ocorreu a precipitação de pectina ou hemicelulose, extraídas da parede celular do vegetal, que se tornaram insolúveis com a adição de hidróxido de sódio durante o ensaio para o doseamento de flavonóides (RENARD et al., 1991).

Da mesma forma como o que foi verificado no doseamento de compostos fenólicos, o extrato etanólico 70° GL apresentou uma maior concentração de flavonóides do que o extrato aquoso e, provavelmente, se tivesse sido possível obter os resultados para os extratos etanólico 90° GL e absoluto, eles seriam os com menor concentração destes componentes, seguindo o perfil observado no doseamento de compostos fenólicos, uma vez que os flavonóides são uma classe de compostos fenólicos.

Através dos resultados obtidos, também foi possível observar que a concentração de flavonóides presentes no extrato E70 equivalentes à quercetina foi superior a concentração de flavonóides equivalentes à rutina (Figura 12), diferentemente do observado com o EAq.

A comparação da concentração de flavonóides nestes extratos com a concentração destes metabólitos secundários, em outros produtos, foi dificultada, assim como ocorreu com os compostos fenólicos, devido ao foco deste trabalho. O intuito da quantificação de flavonóides foi, em primeiro lugar, a verificação da existência de quantidades significativas de composto bioativo nos extratos em estudo, e, em seguida, a comparação dos quatro extratos obtidos com os diferentes solventes, para a determinação do mais efetivo na obtenção destes compostos de interesse. Os trabalhos apresentados na literatura frequentemente expressam a concentração dos flavonóides em relação à massa do vegetal seco (MIEAN & MOHAMED, 2001). Desta forma, a comparação não foi possível, já que parâmetros distintos foram utilizados.

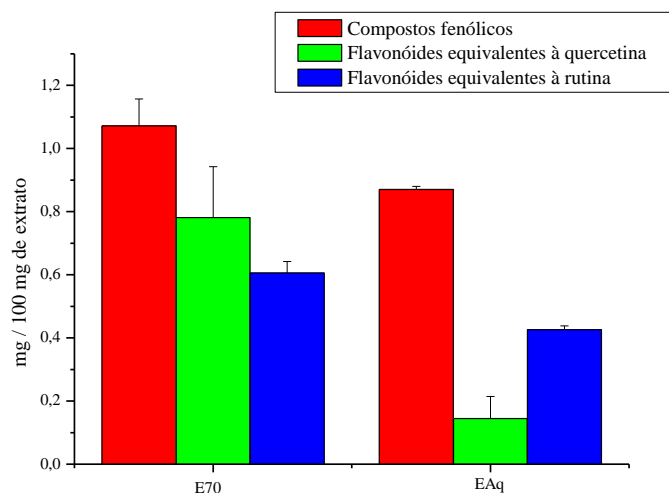


Figura 12. Concentração de compostos fenólicos e de flavonóides equivalentes quercetina/rutina nos extratos E70 e EAq.

Na Figura 12, é possível notar também que os resultados obtidos são muito coerentes, uma vez que é possível perceber uma concentração maior de compostos fenólicos do que de flavonóides. Este dado é coerente pois é sabido que a goiaba contém compostos fenólicos, que são representados principalmente por flavonóides e taninos; sendo assim, era esperado uma maior concentração de compostos fenólicos uma vez que é representada pela soma da quantidade de todos os compostos fenólicos presentes, inclusive taninos e flavonóides.

4.3) Avaliação do potencial antioxidante dos extratos

Antes da escolha do extrato a ser utilizado para a continuidade dos estudos, a atividade antioxidante dos extratos obtidos foi estudada, uma vez que esta é a atividade de maior interesse neste trabalho.

4.3.1) Ensaio do radical DPPH

Como substância de referência, no ensaio de DPPH, foi utilizado o ácido ascórbico. Na Figura 13 pode ser visualizado o gráfico da porcentagem de inibição do radical DPPH por ácido ascórbico.

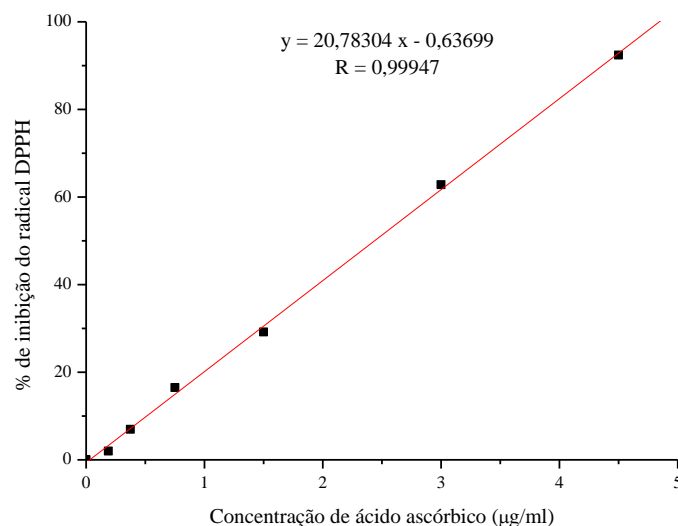


Figura 13. Porcentagem de inibição do radical DPPH por ácido ascórbico, uma substância de referência.

O IC₅₀ da atividade sequestrante do radical DPPH com o uso da vitamina C foi de 2,4364 µg/mL.

Em seguida, foi determinada a atividade antioxidante dos quatro extratos de *P. guajava* L., como pode ser visualizado na Figura 14.

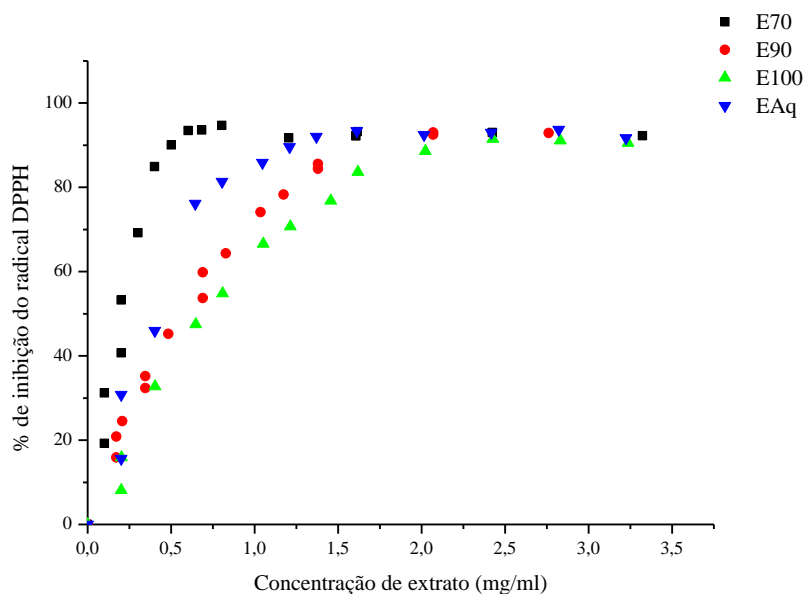


Figura 14. Atividade seqüestrante do radical DPPH pelos extratos de *P. guajava* L.: etanólico 70° GL, etanólico 90° GL, etanólico absoluto e aquoso.

Os resultados da atividade antioxidante dos extratos podem ser comparados com a concentração dos compostos fenólicos e flavonóides presentes nos extratos, uma vez que pode ser observada uma correlação entre a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides com a atividade antioxidante, sendo provavelmente estes componentes, juntamente com a vitamina C, presentes nos extratos de *P. guajava* L., os principais responsáveis por este efeito dos extratos. O comportamento do radical DPPH na presença dos extratos pode ser visualizado na Figura 14.

Nestes resultados, mais uma vez, o extrato obtido a partir de etanol 70° GL foi o que apresentou maior atividade antioxidante com menor concentração de extrato, resultado este que corrobora com as quantidades de compostos fenólicos e flavonóides.

Na Tabela 5 estão listados os valores de IC_{50} para cada um dos extratos. Para obtenção do IC_{50} , uma curva da porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* a concentração do extrato foi construída. A partir desta curva, foi obtida a equação da reta, que fornece informações suficientes para que seja calculada a quantidade de extrato necessária para que seja alcançada a inibição de 50% dos radicais livres presentes no meio de análise. Os resultados foram obtidos em triplicata para cada um dos extratos e para três extrações diferentes.

Tabela 5. Valores de IC₅₀ dos extratos avaliados (mg de extrato/mL)

	Extração 1	Extração 2	Extração 3	Média	Desvio padrão
E70	0,29319	0,29234	0,28616	0,29056 ^a	0,00383
E90	0,68617	0,67415	0,70747	0,68926 ^b	0,01687
E100	0,89163	0,93128	0,85919	0,89403 ^c	0,03611
EAq	0,7008	0,67036	0,6598	0,67699 ^b	0,02129

^{a, b, c} Considerando $p < 0,05$, letras diferentes significam valores de IC₅₀ estatisticamente diferentes.

Este resultado, portanto, foi o determinante na escolha do extrato a ser utilizada na obtenção do fitocosmético. O extrato de melhor desempenho e conteúdo em substâncias de interesse foi, sem dúvida, o E70. Sendo assim, o E70 foi o extrato utilizado para a incorporação no creme base e obtenção do fitocosmético.

Além disso, o interessante potencial antioxidante verificado no E70, possibilita sugerir seu potencial para uso cosmético na prevenção do envelhecimento precoce. Corroborando com esta afirmação, um estudo desenvolvido com extrato das raízes de *Pothomophe umbellata*, utilizando camundongos sem pelos, tratados topicamente com formulação gel contendo extrato e irradiados com UVB, demonstrou que o extrato de *P. umbellata* é capaz de prevenir o envelhecimento cutâneo induzido pela exposição à radiação UV (ROPKE et al., 2005). Segundo Almeida et al. (2008), o efeito expressivo do extrato de *P. umbellata* na prevenção de fotoenvelhecimento pode estar relacionado à atividade antioxidante do extrato.

4.3.2) Ensaio do radical ABTS

Existem diversos métodos para determinação da atividade antioxidante de substâncias *in vitro* (WANG & LIN, 2000; MILIAUSKAS et al., 2004; MARQUELE et al., 2006). Sendo assim, a atividade antioxidante do E70 foi determinada também pelo método do ABTS para a obtenção de mais dados sobre este extrato.

Uma curva com uma substância antioxidante de referência, a vitamina C, também foi construída, mostrando a efetividade do método em detectar esta propriedade das substâncias, como pode ser visualizado na Figura 15.

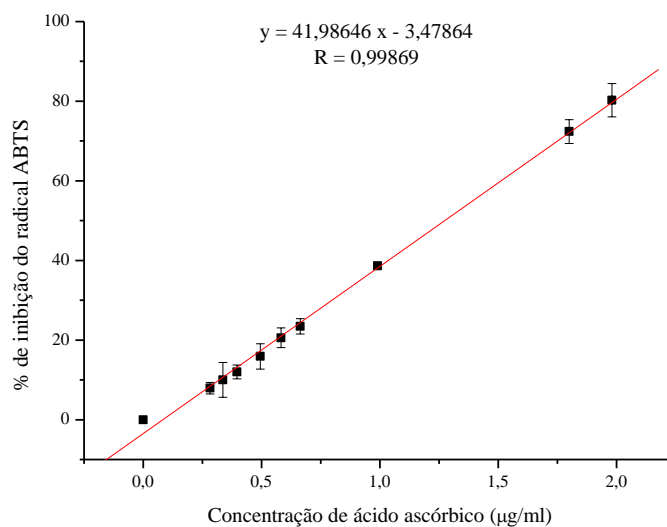


Figura 15. Percentagem de inibição do radical ABTS por ácido ascórbico, uma substância de referência.

O IC_{50} da atividade sequestrante do radical ABTS com o uso da vitamina C foi de 1,2737 µg/mL, o que significa que, para se alcançar a inibição de 50% do radical ABTS presente no meio, foram necessários apenas 52,27% da concentração necessária para alcançar o IC_{50} do radical DPPH.

A Figura 16 mostra a curva obtida na avaliação do E70.

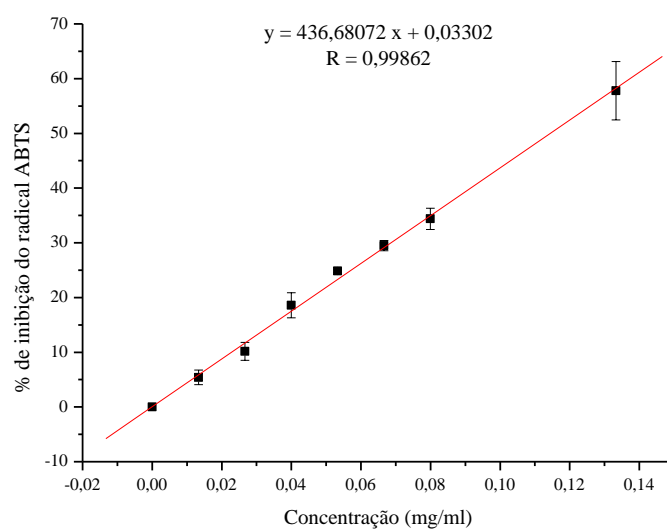


Figura 16. Percentagem de inibição do radical ABTS pelo extrato E70.

De acordo com a equação da reta obtida, o IC₅₀ do E70 para este radical livre é de 0,1144 mg/mL, que equivale a 39,37% da concentração necessária para obter a mesma inibição do radical DPPH.

4.4) Avaliação do perfil cromatográfico dos extratos

O método utilizado para a avaliação do perfil cromatográfico dos extratos foi determinado experimentalmente, com o objetivo de encontrar condições que fornecessem melhor resolução dos picos no cromatograma.

A condição otimizada para preparação das amostras, durante a análise do perfil cromatográfico foi: 40 mg dos extratos foram diluídos em 400 µL de água destilada. Esta solução do extrato foi submetida ao procedimento de *clean up*, utilizando 2 mL do sistema solvente metanol/água (80:20). Esta solução coletada foi utilizada para as análises no cromatógrafo.

As condições de análise foram:

- Corrida de 50 minutos
- Volume de injeção: 20 µL
- Fase Móvel:

Solvente A: água + 0,1% de ácido trifluoracético

Solvente B: acetonitrila + 0,05% de ácido trifluoracético

O gradiente dos solventes A e B utilizados estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Gradiente dos solventes A e B utilizados na avaliação do perfil cromatográfico dos extratos de *P. guajava* L.

Tempo (minutos)	Fluxo (mL/min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	1,0	95	5
10	1,0	90	10
40	1,0	60	40

Os cromatogramas foram obtidos em 261 nm, pois foi o comprimento de onda que exibiu maior número de picos e, portanto, o que detectou maior número de substâncias.

Os perfis cromatográficos obtidos para os quatro extratos estão mostrados na Figura 17.

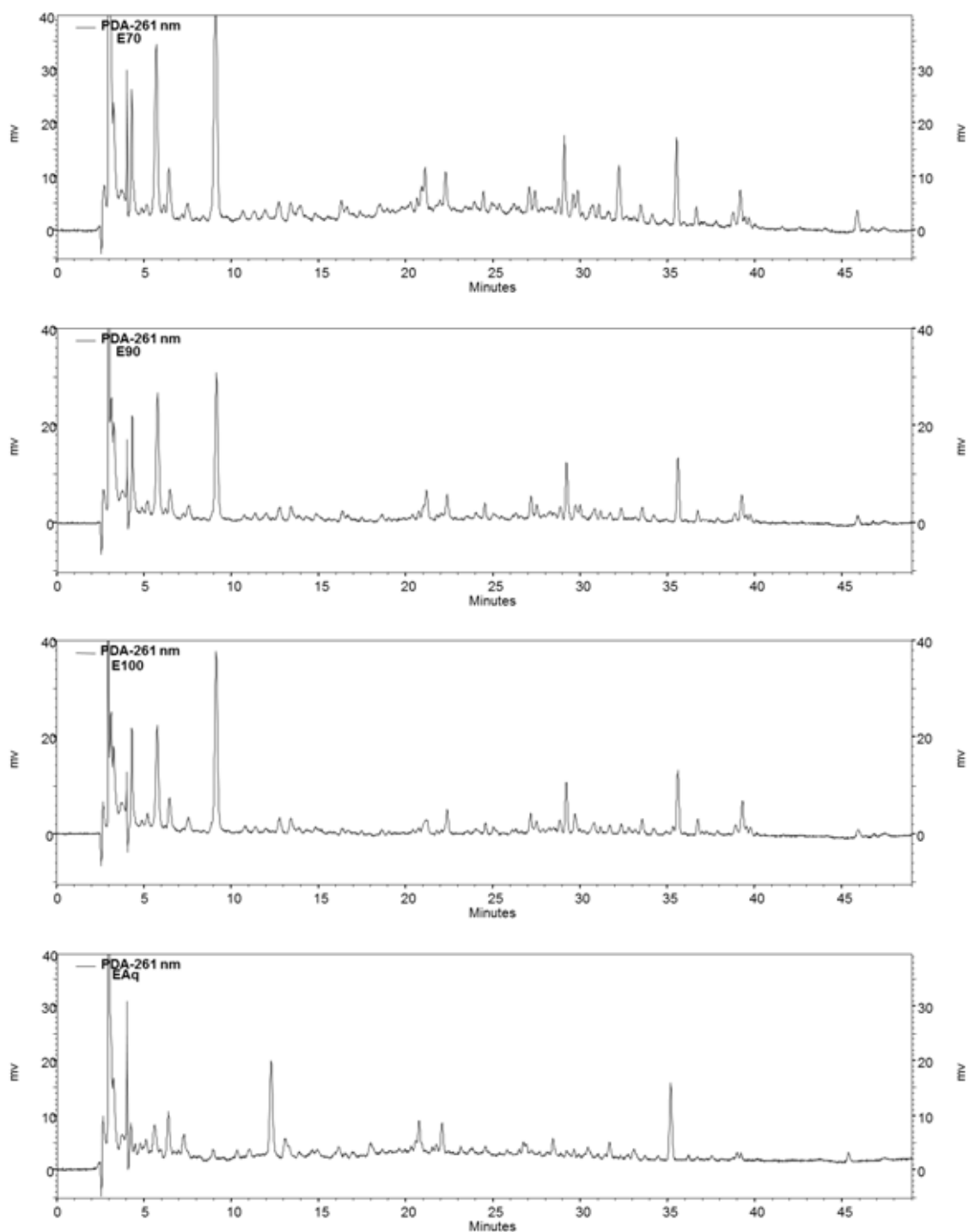


Figura 17. Perfis cromatográficos dos extratos E70, E90, E100 e EAq.

Para permitir uma melhor observação, os cromatogramas foram dispostos conjuntamente na Figura 18.

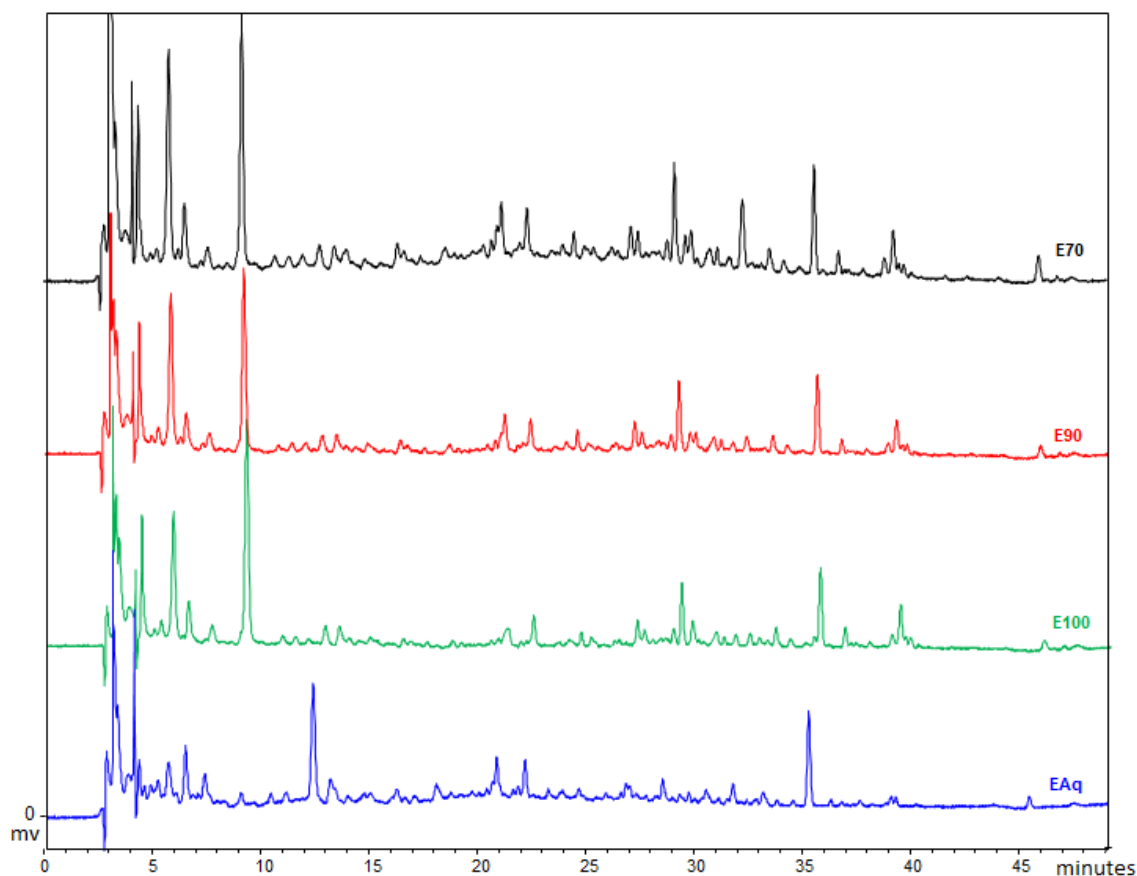


Figura 18. Perfis cromatográficos dos extratos E70, E90, E100 e EAq.

Como pode ser observado, os dados obtidos com os cromatogramas estão de acordo com os resultados obtidos nos ensaios anteriores de doseamento de compostos fenólicos, flavonóides e avaliação da atividade antioxidante. É possível verificar que, nas condições de análise utilizadas, os picos presentes nos extratos E70, E90 e E100 são muito semelhantes, provavelmente devido à semelhança de polaridade no sistema solvente utilizado, o que significada que estes três solventes foram capazes de extrair as mesmas substâncias da *P. guajava* L. Entretanto, como já havia sido verificado, o extrato E70 foi o que extraiu de forma mais eficiente os compostos de interesse neste estudo.

Isto é verificado pela comparação da intensidade de picos com mesmo tempo de retenção, que é sempre maior no E70 quando comparado aos outros extratos. Como a

concentração de extrato utilizada entre as análises foi sempre a mesma, a diferença entre as áreas abaixo dos picos representa diferentes concentrações de cada uma das substâncias presentes nestes extratos.

O extrato EAq foi o que apresentou o perfil menos similar entre os extratos observados. Apresentou picos em tempos de retenção distintos aos observados nos outros extratos. Isto também pode ser explicado pelo solvente usado, com polaridade diferente dos outros.

Este resultado comprova que o extrato E70 é o de escolha para a continuação do estudo e, por isso, foi melhor avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

As condições de análise foram as mesmas das utilizadas anteriormente.

O cromatograma obtido está apresentado na Figura 19. Neste cromatograma, alguns picos de interesse foram destacados e, em seguida, analisados através do arranjo de foto diodos (PDA) (Figura 20).

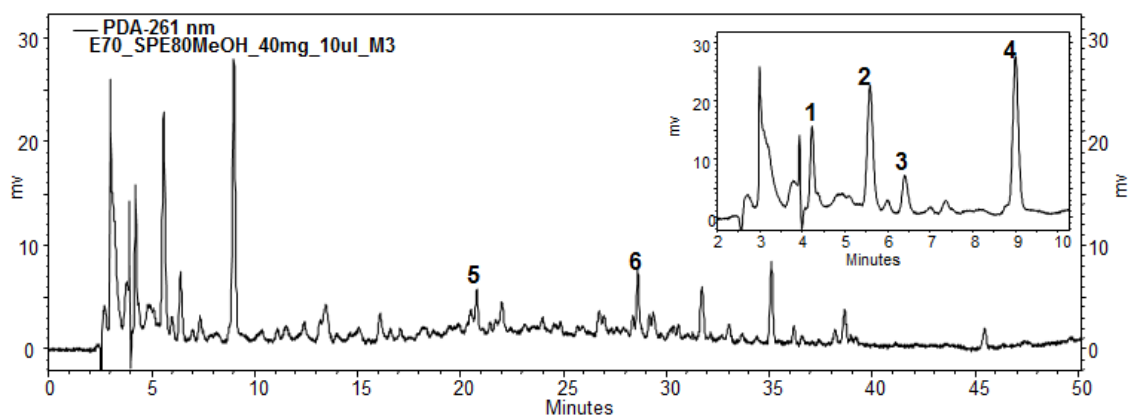


Figura 19. Perfil cromatográfico do extrato E70.

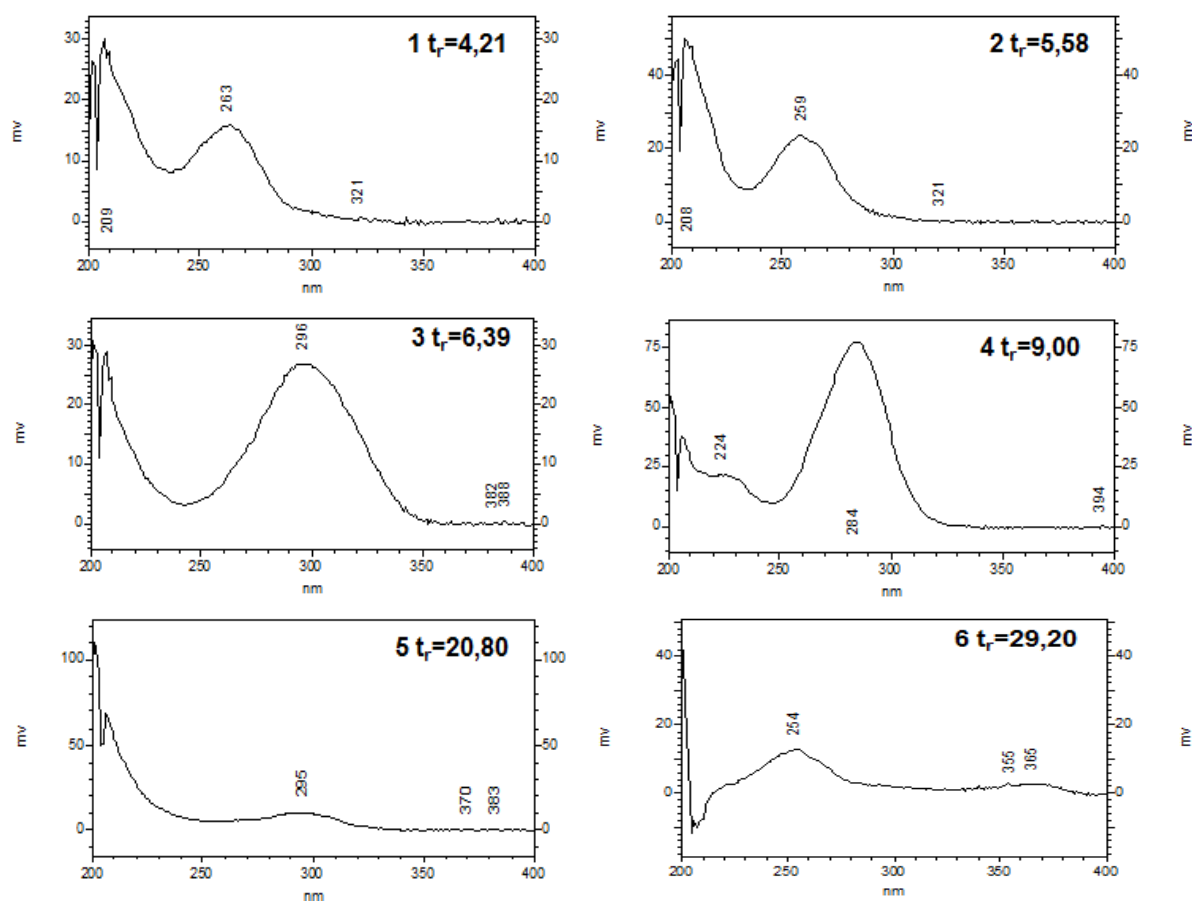


Figura 20. Espectros de absorção dos picos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 do cromatograma do extrato E70.

Em um trabalho de Iwashina et al. (2006), em que foram avaliados os flavonóides presentes na soja, alguns picos foram detectados também no UV a 261 nm, como foi observado neste trabalho e, entre eles, foram encontrados picos referentes ao

flavonóide luteolina, de um derivado de luteolina, além de dois isoflavonóides não identificados.

Segundo Simões et al. (2007) os flavonóides possuem espectros de absorção característicos, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um entre 240-285 nm (Banda II) e outro entre 300-400 nm (Banda I). Acompanhando este perfil de absorção dos flavonóides, as bandas observadas nos espectros dos picos 1, 2, 4, 5 e 6, podem ser flavonóides presentes no E70, com destaque para os espectros dos picos 5 e 6 com duas bandas mais definidas.

5) Avaliação do potencial citotóxico

As linhagens celulares escolhidas para a avaliação do extrato E70 foram: HepG2 e HaCat. A primeira é uma linhagem de células de hepatoma humano, escolhida por ser um modelo muito utilizado de estudo de células metabolizadoras, permitindo a avaliação da toxicidade do metabólito formado, a partir do produto em estudo. A segunda, uma linhagem de queratinócitos, foi escolhida por se tratar de estudo com ativo para uso cosmético e que, portanto, será aplicado na pele, que tem, na epiderme, como principal tipo celular, o queratinócito.

Durante o experimento, a lavagem da placa antes da adição do MTT ocorreu devido a uma interação observada entre o extrato e o MTT, descrita anteriormente por Bruggisser et al. (2002). Esta interação é causada por uma reação entre o extrato vegetal e o reagente MTT, provavelmente devida ao poder antioxidante do extrato, que culmina com a redução do sal MTT fazendo com que os cristais de formazana sejam formados, assim como acontece na presença de células viáveis, fornecendo um resultado falso-positivo. Este problema pode ser resolvido com uma delicada lavagem com PBS para a remoção do extrato presente, para a posterior adição da solução de MTT.

Na Figura 21, estão apresentados os resultados obtidos para a linhagem HepG2. Uma curva dose *versus* resposta foi construída, sendo então possível utilizar a equação da curva, gerada por regressão linear, para ser determinada a concentração do E70 que é necessária em um meio para causar a letalidade de 50% das células.

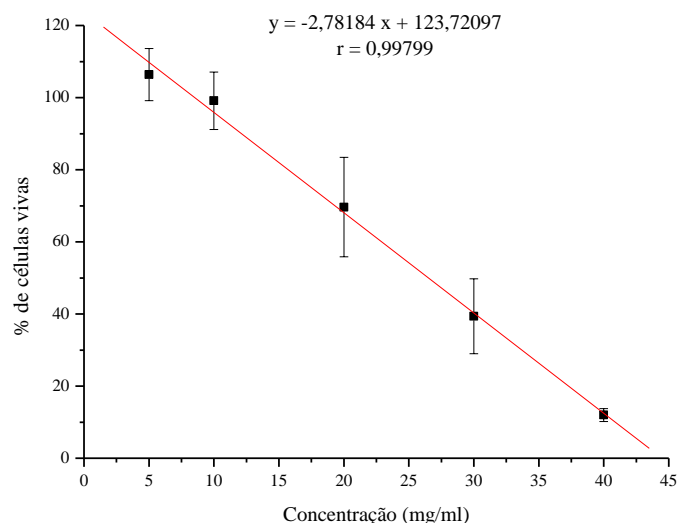


Figura 21. Curva dose-resposta para o tratamento das células HepG2 com diferentes concentrações do extrato E70.

O mesmo procedimento foi repetido com os queratinócitos e os resultados estão na Figura 22.

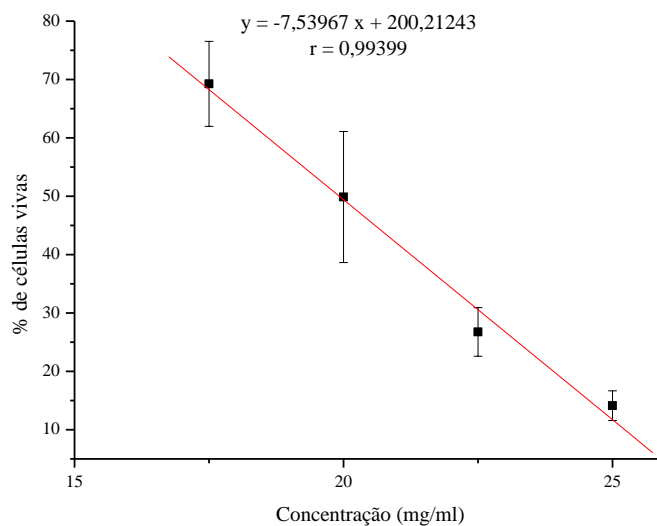


Figura 22. Curva dose-resposta para o tratamento das células HaCat com diferentes concentrações do extrato E70.

A Tabela 7 apresenta os valores de IC_{50} calculados a partir das equações das curvas.

Tabela 7. Valores de IC₅₀ (mg/mL) para as células HepG2 e HaCat tratadas com o extrato E70

	1	2	3	Média	Desvio padrão
HepG2	26,53	24,72	27,95	26,40 ^a	1,61
HaCat	20,65	20,10	17,84	19,53 ^b	1,48

^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Na avaliação da citotoxicidade nas células HepG2, como é possível notar através dos resultados apresentados, as concentrações iniciais testadas no ensaio de citotoxicidade (5 e 10 mg/mL) causaram aumento na viabilidade celular, ou seja, a quantidade de células presentes nos poços da microplaca tratados com soluções de E70 foi maior do que o número de células presentes nos poços controle. Isto pode significar uma menor mortalidade de células durante o período de estudo, quando comparado com as células tratadas apenas com meio de cultura, o que pode ser devido ao potencial hepatoprotetor apresentado por flavonóides e compostos fenólicos (HRYNTSEVICH & SHADYRO, 2005). Um comportamento semelhante foi observado no trabalho de Martínez et al. (1999), que avaliou diversos extratos de frutas e vegetais quanto à citotoxicidade e notou que certas concentrações dos extratos etanólicos de brócolis e *Capsicum annum*, apresentaram maiores níveis de formação dos cristais de formazana que o controle. Estes autores interpretaram o resultado obtido como um aumento na atividade metabólica destas células.

Este mesmo comportamento parece não ter sido observado em células HaCat, entretanto, seriam necessários novos estudos, tanto com células HepG2 quanto HaCat, induzindo danos celulares e avaliando o potencial quimiopreventor do E70.

Os valores de IC₅₀ podem ser considerados muito elevados, comprovando, portanto, a segurança deste extrato. Esta segurança pode ser inferida comparando os resultados obtidos no trabalho de Martínez et al. (1999) que, testando o potencial citotóxico de frutas e verduras, obteve aproximadamente 80% de morte celular com concentrações em torno de 5 mg/mL dos extratos testados e esta concentração foi considerada elevada pelos autores, que julgaram como insignificantes o potencial

citotóxico destes produtos. Para obtermos 80% de letalidade com o E70 seria necessário a utilização de concentrações 4 (HaCat) a 7 (HepG2) vezes superiores do extrato.

Os valores foram úteis na determinação da concentração do E70 a ser utilizado na obtenção do fitocosmético, visando elevado nível de segurança ao possível usuário deste produto.

6) Validação da metodologia de quantificação do extrato através do método do DPPH

O objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em laboratório de produtos farmacêuticos (RANDAU et al., 2005).

Neste trabalho, devido à dificuldade encontrada na quantificação de um extrato vegetal, foi utilizada uma quantificação de forma indireta, isto é, através da atividade antioxidante, uma vez que esta é uma das principais propriedades do extrato de *P. guajava* L., buscada neste estudo. Sendo assim, a metodologia analítica utilizada para a quantificação deste composto foi a avaliação da atividade antioxidante por meio do radical DPPH, que segue uma relação dose *versus* resposta e, sendo assim, foi possível quantificar a quantidade de extrato presente em determinados meios de análise de forma indireta, através da quantificação da atividade antioxidante apresentada por este meio, que pode ser transformada em concentração de extrato, através da relação obtida entre a concentração de extrato *versus* a atividade antioxidante, em uma curva analítica construída.

Além disso, se outros métodos de análise fossem utilizados, seria necessário utilizar um marcador neste extrato, por exemplo, um flavonóide, como a quercetina. Entretanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as potencialidades do extrato de *P. guajava* L. como um todo, aproveitando-se do sinergismo entre várias substâncias de interesse presentes no extrato, como flavonóides, taninos, ácido ascórbico, etc. Este foi, portanto, mais um motivo para a escolha deste método de quantificação do extrato.

Liu (2003) propõe que os efeitos aditivos e sinérgicos de compostos fitoquímicos encontrados em frutas e vegetais sejam os responsáveis pela potente

atividade antioxidante e anticâncer que apresentam e que o benefício encontrado em uma rica dieta composta de frutas e vegetais deve ser atribuída à complexa mistura destes compostos.

Um trabalho desenvolvido por Marquele-Oliveira et al. (2007) também utilizou a atividade antioxidante como forma indireta da quantificação do extrato de própolis em formulações de uso tópico.

Este método foi validado de acordo com a Resolução-RE N° 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Segundo esta resolução, o objetivo de uma validação é demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Portanto, a validação foi aplicada com o objetivo de demonstrar que a metodologia de quantificação do extrato de *P. guajava* L. por meio da atividade antioxidante é adequada, sendo útil durante o desenvolvimento de todo este trabalho.

6.1) Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Foram construídas três curvas analíticas da porcentagem de inibição do radical DPPH *versus* a concentração de extrato que estão apresentadas a seguir (Figuras 23 a 25).

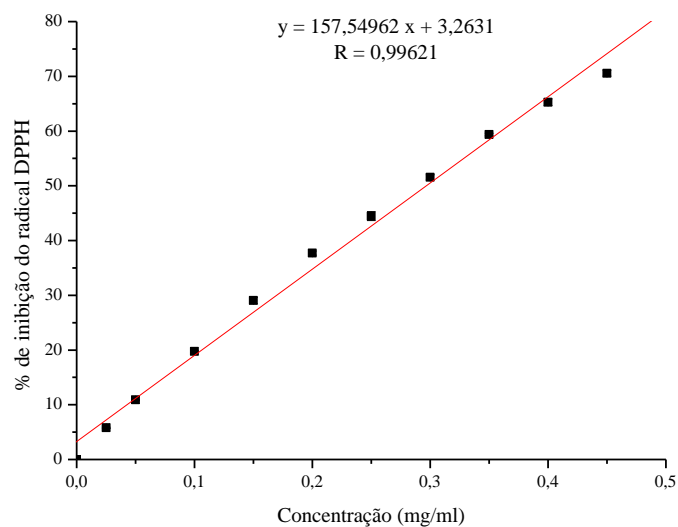


Figura 23. Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método.

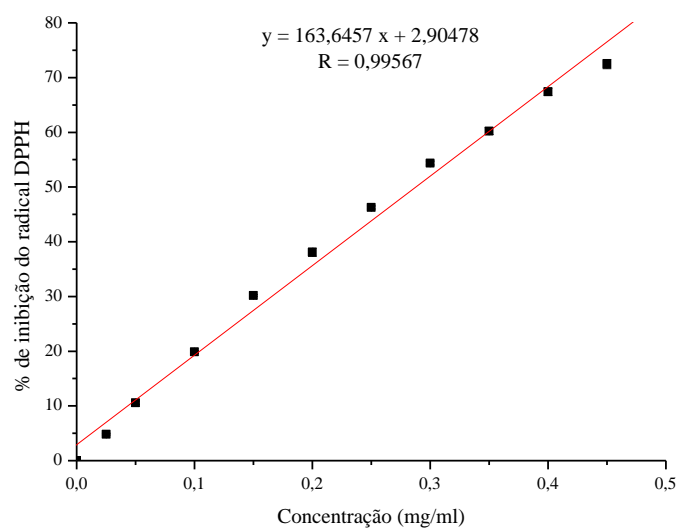


Figura 24. Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método.

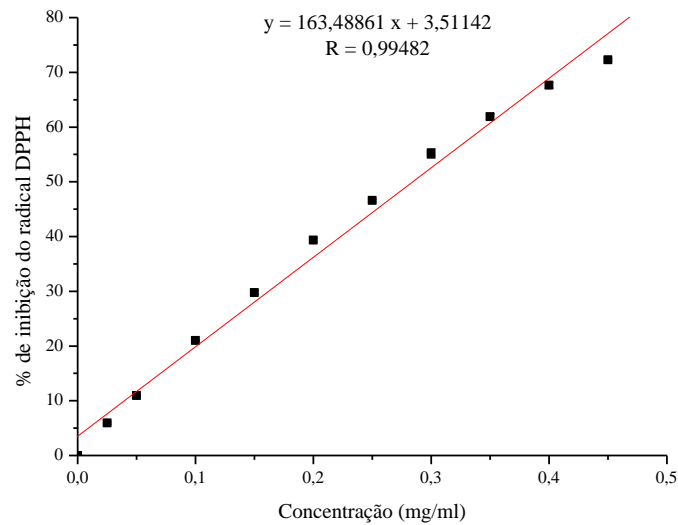


Figura 25. Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método.

Desta forma, o método foi considerado linear, pois segundo a ANVISA (2003), para que isto aconteça os valores de R devem ser maiores que 0,99, comportamento este observado nas curvas construídas. Portanto, uma nova curva foi construída a partir do tratamento estatístico das curvas experimentais 1, 2 e 3, com média e desvio padrão de cada um dos pontos (Figura 26).

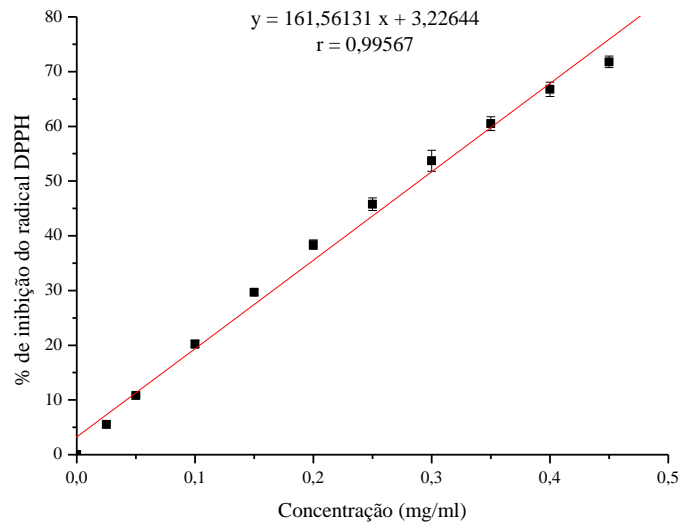


Figura 26. Média das curvas analíticas para avaliação da linearidade do método.

Na curva obtida o valor do coeficiente de correlação (R) é de 0,99567; a intersecção com o eixo y é igual a 3,22644 e o coeficiente angular é igual a 161,56131. Estes valores são os parâmetros necessários na obtenção da curva analítica que foi utilizada posteriormente para a quantificação do extrato por meio da atividade antioxidante.

6.2) Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003).

Para isto, concentrações conhecidas de extrato, denominadas concentrações teóricas, foram submetidas à análise da atividade antioxidante e, por meio da equação obtida no ensaio de linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003), como apresentado na Tabela 8.

Tabela 8. Avaliação da exatidão do método analítico de quantificação do extrato E70

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração Experimental 1 (mg/mL)	Concentração Experimental 2 (mg/mL)	Concentração Experimental 3 (mg/mL)	Exatidão (%)
0,10	0,101833012	0,10514739	0,102661607	103,214003
0,25	0,260923151	0,263408935	0,261751746	104,8111775
0,40	0,390183889	0,391012483	0,384383728	97,131675

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que o método é preciso, uma vez que não houve variações maiores que 5% entre as concentrações teóricas e as concentrações experimentais obtidas nos ensaios realizados (ANVISA, 2003).

6.3) Limite de detecção

O limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

Para o cálculo do limite de detecção foi utilizada a equação descrita no item 6.1. Os valores estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9. Determinação do limite de detecção do método analítico de quantificação do extrato E70

	Intercepção com o eixo Y
Curva 1	3,2631
Curva 2	2,90478
Curva 3	3,51142
Desvio padrão	0,30498
Inclinação da curva analítica	89,64536655°
Limite de detecção	0,010206 mg/mL

Sendo assim, o método analítico é capaz de detectar a concentração mínima de 0,010206 mg/mL (10,2 µg/mL) do extrato de *P. guajava*.

6.4) Limite de quantificação

É a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003).

O valor calculado segundo a equação descrita no item 6.1 foi de 0,034020 mg/mL de extrato de *P. guajava* L., sendo esta a menor concentração que pode ser determinada pelo método em estudo.

6.5) Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis: Repetitividade (precisão intra-corrída), Precisão intermediária (precisão inter-corrídas) e Reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).

6.5.1) Repetitividade ou precisão intra-corrída

Segundo a metodologia descrita pela ANVISA (2003), os valores do desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5%. Os valores obtidos neste ensaio estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação da repetitividade do método analítico de quantificação do extrato E70

	CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
C 1	0,05	0,047372	0,048115	0,046630	0,00200	0,04698	4,260
C 2		0,044463	0,047806	0,044463			
C 1	0,25	0,250268	0,260542	0,254662	0,00757	0,25919	2,922
C 2		0,268279	0,265742	0,264875			
C 1	0,45	0,413611	0,420234	0,416582	0,01241	0,42657	2,910
C 2		0,432799	0,430199	0,422586			

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no período 1

C2: Corrida no período 2

Nenhuma das concentrações avaliadas apresentou DPR>5%, portanto, o método apresenta repetitividade.

6.5.2) Precisão intermediária ou precisão inter-corridas

O mesmo procedimento foi realizado para avaliação da precisão intermediária, e os valores de DPR também não foram superiores a 5% (Tabela 11).

Tabela 11. Avaliação da precisão intermediária do método analítico de quantificação do extrato E70

	CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
C 1	0,05	0,044463	0,047806	0,044463	0,00207	0,04719	4,379
C 2		0,047868	0,048610	0,047125			
C 1	0,25	0,268279	0,265742	0,264875	0,00676	0,26485	2,553
C 2		0,267846	0,270074	0,267103			
C 1	0,45	0,432799	0,430199	0,422586	0,00893	0,43113	2,070
C 2		0,427414	0,425928	0,428961			

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

C1: Corrida no dia 1

C2: Corrida no dia 2

6.5.3) Reprodutibilidade

Mais uma vez, os valores de DPR não ultrapassaram 5% (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação da reprodutibilidade do método analítico de quantificação do extrato E70

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
0,05	0,045748	0,046920	0,045136	0,00216	0,04695	4,609
0,25	0,238447	0,234213	0,234213	0,00746	0,23922	3,118
0,45	0,413390	0,431317	0,402778	0,02075	0,42437	4,890

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

Desta forma, o método em análise pode ser considerado preciso, pois os valores de DPR obtidos são menores que 5% (ANVISA, 2003).

6.6) Especificidade e Seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (ANVISA, 2003).

Após a contaminação das soluções de extrato com concentrações adequadas do creme base (concentrações que não causaram turvação na amostra), a avaliação da atividade antioxidante da solução foi determinada, e os valores comparados com as concentrações teóricas de extrato (concentrações conhecidas no momento do preparo das soluções), determinando-se o DPR (Tabela 13).

Tabela 13. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico de quantificação do extrato E70

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
0,10	0,107275	0,110147	0,111050	0,00501	0,10712	4,678
0,25	0,277240	0,277311	0,276408	0,01350	0,27024	4,995
0,40	0,419937	0,424597	0,430922	0,01336	0,41886	3,189

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

Os valores de DPR foram inferiores a 5%, portanto o método foi considerado seletivo e específico.

6.7) Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal (ANVISA, 2003). Para isto, foi utilizado um solvente (metanol)

de fabricante diferente ao utilizado na construção da curva analítica e os resultados comparados para a determinação do DPR (Tabela 14).

Tabela 14. Avaliação da robustez do método analítico de quantificação do extrato E70

CT (mg/mL)	CE 1 (mg/mL)	CE 2 (mg/mL)	CE 3 (mg/mL)	Desvio padrão	Média	DPR (%)
0,10	0,109093	0,110147	0,111050	0,00511	0,10757	4,752
0,25	0,274513	0,274600	0,278215	0,01300	0,26933	4,828
0,40	0,429026	0,434536	0,435440	0,01674	0,42475	3,942

CT: Concentração teórica

CE: Concentração experimental

O método também foi considerado robusto.

6.8) Curvas analíticas com solventes diferentes

Duas novas curvas analíticas foram construídas com solventes diferentes, uma vez que metanol e tampão fosfato (pH 7,4) foram utilizados na avaliação da liberação do E70 do fitocosmético e da permeação e retenção cutâneas.

As curvas estão apresentadas nas Figuras 27 e 28.

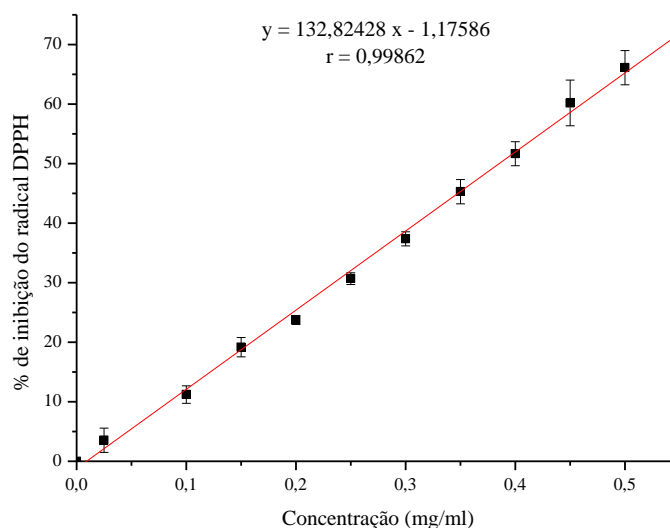


Figura 27. Curva analítica para quantificação do extrato de *P. guajava* L. utilizando metanol como solvente.

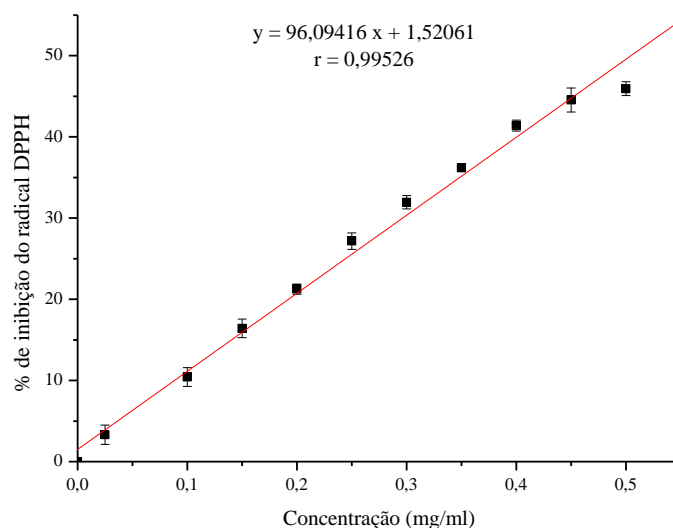


Figura 28. Curva analítica para quantificação do extrato de *P.guajava* L. utilizando tampão fosfato (pH=7,4) como solvente.

7) Desenvolvimento do creme base e do fitocosmético

O intuito deste trabalho foi desenvolver uma formulação com características simples, para que apresentasse a menor toxicidade possível e baixa concentração de componentes oleosos, devido à finalidade de uso (creme facial). Sendo assim, algumas formulações foram testadas até que se obtivesse uma formulação aparentemente estável (Tabela 15).

Tabela 15. Composição percentual da formulação cosmética (creme base)

Matéria-prima	INCI name	Função	Composição percentual
Álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE	Ceteareth - 20	tensoativo não-iônico	1,0
Álcool cetílico	Cetyl alcohol	agente de consistência	4,0
Monoestearato de glicerila	Glyceryl stearate	agente de consistência	1,4
Adipato de diisopropila	Diisopropyl adipate	emoliente	1,3
Estearato de octila	Ethylhexyl stearate	emoliente	0,8
Óleo mineral	Mineral oil	emoliente	1,0
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 6,0

O tensoativo utilizado, álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE, é do tipo não-iônico. Emulsões contendo este tipo de emulsionante são amplamente empregadas em cosméticos devido às suas características, como a compatibilidade com o pH cutâneo, estabilidade em diversos valores de pH, e possibilidade de incorporação de diferentes substâncias ativas, como por exemplo, o extrato de *P. guajava* L. (JUNGINGER, 1997).

O fitocosmético foi obtido com a adição de extrato de *P. guajava* L. (E70) ao creme base. A concentração do ativo foi determinada através da atividade antioxidante, da permeação e retenção cutâneas e da citotoxicidade do extrato estudadas.

Para a incorporação do extrato à formulação base, o extrato foi primeiramente solubilizado em água (parte da fase aquosa da emulsão) e, em seguida, o valor de pH da solução do extrato foi ajustado para o pH usual de emulsões cosméticas, em torno de 6. Este procedimento foi realizado antes da incorporação do extrato na formulação, pois o creme contém Carbomer como espessante. Este espessante hidrofílico apresenta-se viscoso em solução com pH neutro, e perde esta característica de forma irreversível se é submetido a um pH ácido, como o apresentado pelo extrato de *P. guajava* L.

Apesar de estarem listados na formulação, o antioxidante, BHT, e o sequestrante, EDTA, não foram utilizados na formulação do creme base e do fitocosmético durante o estudo. Esta medida foi adotada devido à necessidade de quantificação do extrato E70 por meio da atividade antioxidante evitando, assim, a interferência destes componentes nos resultados. Entretanto, é preciso destacar que a utilização do BHT e do EDTA é fundamental em uma formulação comercial. O BHT previne os processos oxidativos, e o EDTA potencializa a ação do conservante pela quelação de metais essenciais ao crescimento de microrganismos (AULTON, 2005).

Os agentes de consistência usualmente empregados são de natureza graxa ou polimérica (SANCTIS, 2000). Nesta formulação, o espessante hidrofílico, Carbopol® 940, foi utilizado com a finalidade de produzir aumento da viscosidade da emulsão, sem a necessidade de adição de grandes quantidades de componentes graxos, já que a intenção era de se obter uma formulação com baixa concentração de fase graxa. Além disso, este polímero auxilia no desenvolvimento de formulações estáveis, por causar o espessamento da fase aquosa da formulação, colaborando para a prevenção da separação de fases da emulsão.

Os produtos obtidos estão apresentados na Figura 29.



Figura 29. Fitocosmético e creme base.

8) Avaliação do perfil de liberação, permeação e retenção cutâneas do fitocosmético

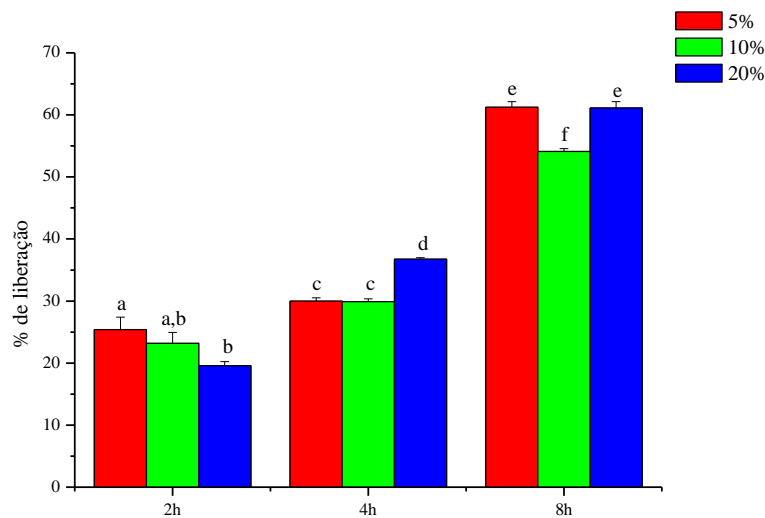
Foram avaliadas três concentrações diferentes do E70 no fitocosmético, 5, 10 e 20%. Tal procedimento foi adotado para que fosse possível avaliar se a concentração de extrato no fitocosmético tem influência no perfil de liberação, permeação e retenção cutâneas e, sobretudo, para que a partir das concentrações de liberação, permeação e retenção cutâneas fosse possível avaliar a efetividade e segurança deste produto, no que diz respeito aos ensaios de atividade antioxidante e avaliação da citotoxicidade.

Para a quantificação do extrato liberado do fitocosmético, que permeou e ficou retido na epiderme/derme foi utilizada como ferramenta de quantificação a atividade antioxidante da solução obtida após liberação, permeação e retenção da epiderme/derme. Para isso, foram utilizadas as curvas analíticas construídas com a concentração de extrato *versus* atividade antioxidante, tendo como solventes o metanol e o tampão fosfato (pH=7,4), mostradas nas figuras 27 e 28. Isso porque na avaliação da liberação do extrato do fitocosmético e da permeação cutânea, o meio receptor utilizado foi o tampão fosfato; já na avaliação da retenção do extrato contido no fitocosmético na epiderme/derme, a membrana biológica utilizada é submetida a uma extração do ativo com o uso de metanol.

As *sink conditions* foram garantidas, uma vez que, a solubilidade do extrato em tampão fosfato pH 7,4 é de 1,253 g/mL.

8.1) Avaliação da liberação do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

A fase receptora foi coletada das células de Franz e, em seguida submetida à avaliação da atividade antioxidante. A partir dos valores obtidos, a concentração de E70 na solução receptora foi calculada. Através destes valores, foi construído o gráfico da Figura 30.



a,b,c,d,e,f Sendo $p < 0,05$, a porcentagem de liberação nos tempos estudados, diferem entre si.

Figura 30. Porcentagem de liberação do extrato das formulações contendo 5, 10 e 20% do extrato nos tempos 2, 4 e 8h.

A comparação das porcentagens de liberação a partir dos fitocosméticos com diferentes concentrações do E70 mostra que, após 2 horas de ensaio, a porcentagem de E70 liberada no fitocosmético contendo 5% de extrato foi igual à liberada pelo cosmético contendo 10%, e diferente do contendo 20%. Entretanto, a porcentagem liberada pelo fitocosmético contendo 10% foi igual a do contendo 20%. Desta forma, o fitocosmético contendo 5% de extrato apresentou maior porcentagem de liberação que o fitocosmético contendo 20% de ativo.

Contudo, após 4 horas de ensaio, foi possível notar um perfil diferente, neste momento, o fitocosmético que apresentou uma maior liberação do E70 foi o contendo 20% de extrato.

Após 8 horas de avaliação, foi verificada uma maior liberação pelos fitocósméticos contendo 5 e 20%, e estes valores foram considerados iguais estatisticamente.

Ao final destas análises, foi possível concluir que existe diferença na porcentagem de E70 liberada do fitocósmético influenciada pela concentração deste ativo contido no creme, entretanto, após 8 horas de avaliação, estas concentrações variaram, embora com diferenças muito pequenas.

Talvez, a informação mais importante que pode ser extraída deste ensaio é de que a formulação utilizada é capaz de liberar o ativo nela contido, o que é de grande importância, permitindo assim que o mesmo tenha contato com a pele, e exerça a ação esperada, já que liberação do fármaco a partir do veículo que o contém é prerrogativa para a penetração na pele. Uma vez disponível para penetração na superfície da pele, a penetração e a permeação do fármaco ou do ativo irão depender da capacidade destes em atravessar a camada córnea da pele, e de características como lipofilicidade e tamanho da molécula (MENDONÇA et al., 2009).

A partir destes resultados, também foi possível verificar a quantidade de extrato liberado da formulação por unidade de área de difusão (Figura 31). A área de difusão da célula de Franz do equipamento utilizado é de $1,77 \text{ cm}^2$.

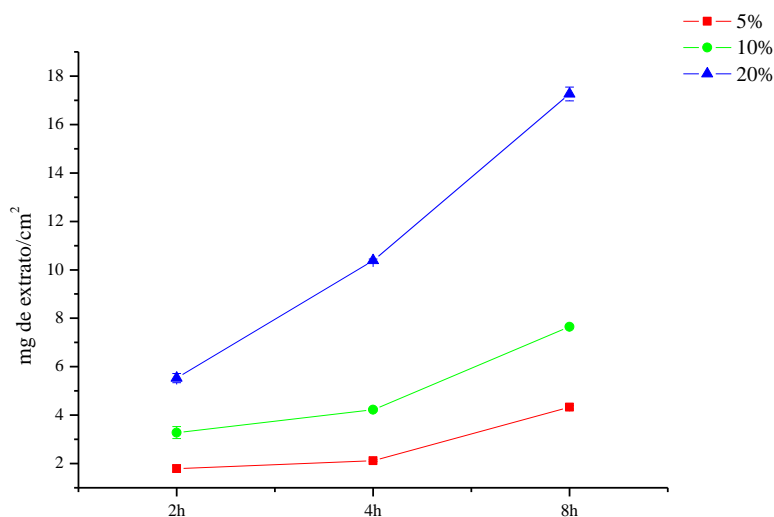


Figura 31. Quantidade em mg de extrato liberado das formulações contendo 5, 10 e 20% por unidade de área (cm^2) nos tempos 2, 4 e 8h.

Foi avaliado também, o perfil cinético de liberação do ativo do fitocosmético. Para isto, foram aplicados três modelos matemáticos para interpretação da cinética de liberação: zero ordem; primeira ordem e modelo de Higuchi. Os modelos cinéticos foram avaliados por meio da linearização dos dados da liberação de acordo com o tempo e porcentagem de extrato liberado. O modelo de zero ordem representa a relação entre a quantidade de extrato liberado *versus* o tempo; o modelo de Higuchi representa a quantidade de extrato liberado *versus* a raiz quadrada do tempo, e o modelo de primeira ordem, o log da concentração de extrato liberado *versus* o tempo. Para a escolha do modelo mais adequado foi utilizado o coeficiente de correlação (r^2), que se aproxima da perfeita linearidade. Os resultados da linearização dos perfis de liberação estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16. Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos fitocosméticos contendo 5, 10 e 20% de extrato

	5%	10%	20%
Zero ordem	0,95441	0,98423	0,99183
Primeira ordem	0,97636	0,99862	0,93803
Modelo de Higuchi	0,90893	0,95352	1,00000

De acordo com a Tabela 16, pode ser concluído que os fitocosméticos contendo 5 e 10% de extrato seguem o modelo de Primeira ordem na liberação do ativo do creme, enquanto que o fitocosmético a 20% segue o modelo de Zero ordem ou de Higuchi, já que os dados da liberação adequaram-se a estes dois modelos cinéticos.

Estes resultados estão de acordo com aqueles descritos na literatura, uma vez que o modelo cinética de 1ª ordem está principalmente relacionado às formulações de liberação convencional ou imediata (CID, 1981), onde a quantidade liberada em função do tempo é dependente da quantidade de fármaco remanescente na formulação, de tal modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (SCHESHOWITSCH et al., 2007).

A equação de Higuchi descreve a liberação de fármacos por um processo de difusão (MONTEIRO et al., 2007), enquanto o modelo de Zero ordem, descreve a liberação de ativos em taxas constantes (JEON et al., 2006). Por meio destas definições,

e analisando a Figura 32, é possível inferir que o modelo que descreve com mais exatidão a liberação do fitocosmético contendo 20% é o modelo de Zero Ordem, uma vez que a porcentagem de liberação aumenta de forma praticamente linear com o tempo, e este comportamento pode ser devido à elevada quantidade de extrato nesta formulação.

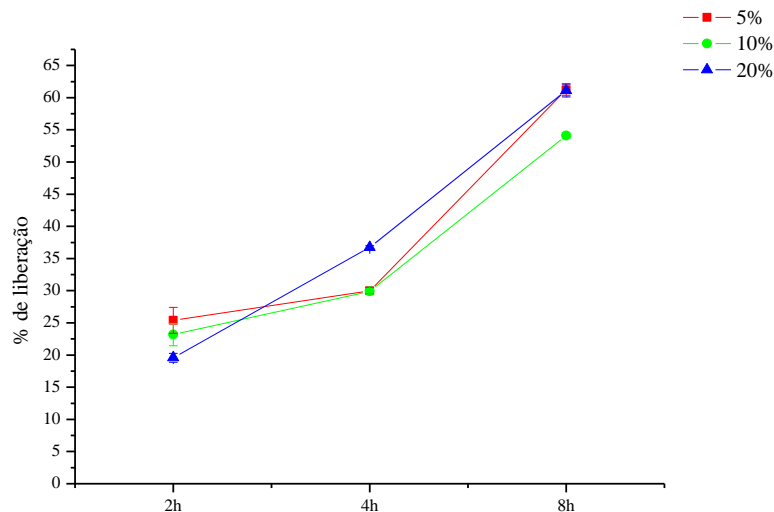


Figura 32. Porcentagem de liberação do extrato das formulações contendo 5, 10 e 20% do extrato nos tempos 2, 4 e 8h.

Também é possível concluir, a partir destes resultados, que a concentração de ativo no creme influenciou no perfil de liberação a partir do fitocosmético.

A partir do perfil de liberação, outros parâmetros também podem ser calculados. Entre eles, o fluxo (J) de liberação do ativo a partir da formulação (SHAH, 1993). Este parâmetro é obtido através da equação gerada com a linearização dos dados da liberação, utilizando os modelos de zero ordem, primeira ordem e modelo de Higuchi, sendo o coeficiente angular da reta, correspondente ao fluxo, ou seja, sendo $y = ax + b$, a representa J em mg/cm^2 por hora (Tabela 17).

Tabela 17. Equações obtidas por meio da aplicação dos modelos de ordem zero, primeira ordem e modelo de Higuchi aos dados de liberação

	5%	10%	20%
Zero ordem	$y = 0,44030 x + 0,68957$	$y = 0,74578 x + 1,56721$	$y = 1,92254 x + 2,08635$
Primeira ordem	$y = 0,06569 x + 0,09845$	$y = 0,06174 x + 0,38666$	$y = 0,07854 x + 0,63214$
Modelo de Higuchi	$y = 1,84750 x - 1,10000$	$y = 3,15601 x - 1,51979$	$y = 8,29983 x - 6,21276$

* Para $y = ax + b$, a indica o valor de J in mg/cm^2 por hora.

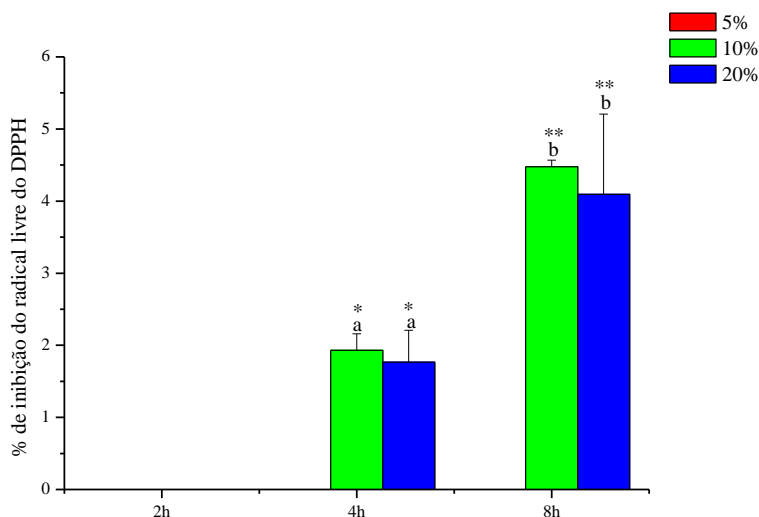
8.2) Avaliação da permeação cutânea do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

Da mesma forma como foi feito na avaliação da liberação do ativo do fitocosmético, na avaliação da permeação cutânea do E70, a fase receptora foi coletada e teve sua atividade antioxidante avaliada.

Na avaliação da permeação cutânea do extrato de goiaba contido no creme, não foi possível quantificar o extrato permeado. Isto ocorreu porque a quantidade de E70 que permeou foi muito pequena ou inexistente e, para a avaliação da atividade antioxidante pelo método do DPPH, ainda é necessário que a amostra seja diluída, pois apenas 1 mL da solução receptora é adicionada à 2,5 mL do DPPH (0,004%). Isto faz com que a quantidade do E70 permeada seja dividida 3,5 vezes. Se todo o volume da parte receptora da célula de Franz tivesse sido avaliado, talvez fosse possível a detecção e quantificação do extrato. O que poderia ser feito posteriormente, é a secagem de toda a solução receptora obtida. Em seguida, esta deveria ser ressuspensa em um volume menor que o inicial e, então, seria possível a quantificação. Por outro lado, este procedimento tornaria o método inviável.

Desta forma, foi possível avaliar a capacidade de inibição do radical DPPH destas amostras, mas não foi possível concluir a quantidade exata de extrato que permeou a membrana biológica. A quantificação não foi possível devido ao fato de o valor obtido estar fora do limite de quantificação e detecção. Apenas os valores obtidos após 8 horas de ensaio é que puderam ser detectados, mas não quantificados.

Mesmo os valores, que de acordo com a validação do método, estão fora do limite de detecção e quantificação, foram mostrados na Figura 33.



^{a,b} Sendo $p < 0,05$, a porcentagem de inibição causada pelo extrato permeado nos tempos estudados, diferem entre si.

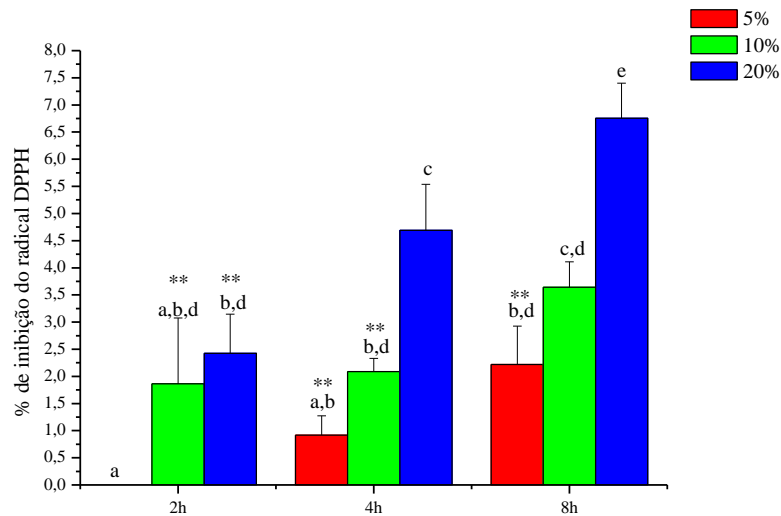
* valor abaixo do limite de detecção do método.

** valor abaixo do limite de quantificação do método.

Figura 33. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato das formulações (5, 10 e 20%) que permeou a membrana biológica nos tempos 2, 4 e 8h.

Com estes resultados, é possível verificar que o fitocosmético contendo 5% de ativo não foi capaz de permear a pele e, portanto, na utilização *in vivo*, o extrato E70 não atingiria a corrente sanguínea. No caso dos produtos contendo 10 e 20%, uma ligeira inibição do radical DPPH foi observada, entretanto, como já foi dito anteriormente, a concentração foi tão pequena, que ficaram abaixo até mesmo do limite de detecção do método após 4 horas de ensaio, e após 8 horas de ensaio, o extrato foi detectado na solução receptora, mas não pode ser quantificado.

8.3) Avaliação da retenção na epiderme e derme do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético



a,b,c,d,e Sendo $p < 0,05$, a porcentagem de inibição causada pelo extrato retido na epiderme/derme nos tempos estudados, diferem entre si.

** valor abaixo do limite de quantificação do método.

Figura 34. Porcentagem de inibição do radical DPPH pelo extrato das formulações (5, 10 e 20%) que ficou retido na epiderme/derme da membrana biológica nos tempos 2, 4 e 8h.

Neste ensaio, todas as quantidades de extrato retidas na epiderme e derme foram passíveis de detecção pelo método. Entretanto, a quantificação foi possível apenas após 8 horas de ensaio da formulação a 10% e, após 4 e 8 horas da formulação a 20%.

Mesmo as quantidades não estando dentro do limite de quantificação do método, podemos notar que as quantidades detectadas são coerentes, por este motivo, foi importante a determinação da quantidade de retenção de ativo na epiderme/derme por área de contato do fitocosmético com a pele.

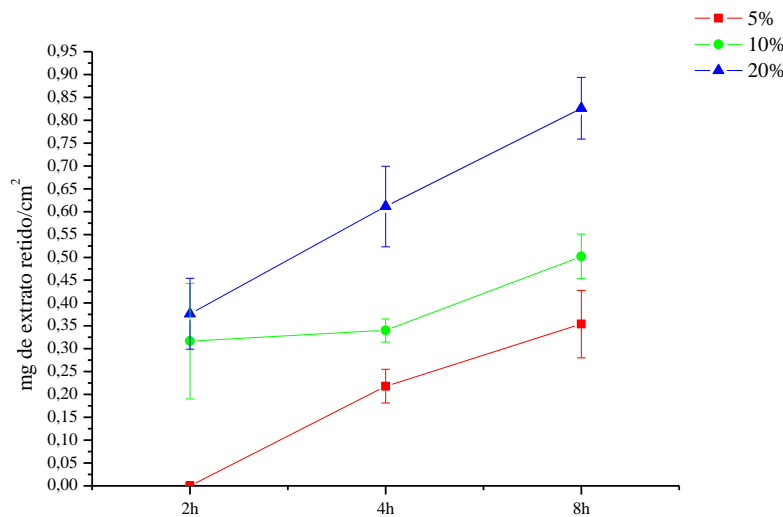


Figura 35. Quantidade (mg) de extrato retido na epiderme/derme por área de pele (cm^2).

Este resultado é satisfatório, pois de forma geral, podemos dizer que não houve permeação do ativo, o que caracteriza um cosmético. Além disso, o ativo foi capaz de permanecer retido na epiderme/derme, local onde deve ter ação.

Também, foi observada uma elevada liberação do ativo da formulação, o que colabora para a eficiência do produto, já que o ativo ficará em contato com a pele.

8.4) Avaliação da retenção no estrato córneo do extrato de *P. guajava* L. contido no fitocosmético

O ensaio de retenção do extrato no estrato córneo foi realizado, entretanto, não foram obtidos resultados conclusivos. Isto ocorreu porque a técnica é baseada na remoção do estrato córneo da membrana biológica utilizada (pele de orelha de porco) através do *tape stripping* e as fitas adesivas, em seguida, são colocadas em metanol para a remoção da substância a ser avaliada das fitas. Entretanto, neste estudo, o método de quantificação do ativo retido no estrato córneo foi a avaliação da atividade antioxidante, e foi constatada a presença de alguma substância antioxidante na fita adesiva, o que interferiu de maneira significativa nos resultados, uma vez que o branco (amostra sem a presença do extrato) apresentou atividade antioxidante.

Para que fosse possível afirmar a presença de alguma substância antioxidante na fita adesiva, 12 pedaços de fita adesiva foram colocados em 4 mL de metanol (assim como foi realizado com as amostras do estudo de retenção no estrato córneo). Em seguida, as fitas adesivas foram removidas e a solução restante foi avaliada quanto a sua atividade antioxidante. Neste ensaio foi possível confirmar a presença de antioxidantes na fita adesiva.

Entretanto, os resultados obtidos na avaliação da permeação cutânea, e retenção na epiderme/derme, permitem inferir que se tivesse sido possível detectar a presença do ativo no estrato córneo, o resultado seria positivo, pois está claro que, para que o extrato pudesse alcançar tanto a epiderme/derme, quanto permear através da pele, foi preciso inicialmente, que atravessasse o estrato córneo.

Com base nos resultados expostos até aqui, a concentração de extrato ideal para atender as características desejadas para o fitocosmético foi definida. Esta determinação foi feita com base principalmente nos resultados de atividade antioxidante, buscando a eficácia da formulação; nos resultados de citotoxicidade, levando em conta a segurança que este produto deverá apresentar ao usuário e, finalmente, nos perfis de permeação e retenção cutâneas, considerando ao mesmo tempo a eficácia e segurança do produto.

Recapitulando os resultados obtidos, foi necessária uma concentração de 0,29 mg/mL do E70 para que 50% dos radicais livres (DPPH) presentes no meio de reação fossem inibidos. No caso do radical ABTS este valor é ainda menor, mas foi levado em consideração o resultado mais elevado, visando garantir a eficácia do produto.

Na avaliação da citotoxicidade, foi determinado que a concentração de E70 que causa a morte de 50% das células presentes no meio é de 26,40 mg/mL para as células HepG2 e, 19,53 mg/mL para as células HaCat. Para estes dois tipos celulares, foi verificado que a concentração necessária para apresentar atividade antioxidante é 91 (HepG2) e 67 (HaCat) vezes menor do que a concentração citotóxica, demonstrando a possibilidade de obtenção de um fitocosmético com elevado grau de segurança ao usuário.

Na avaliação da permeação cutânea, a formulação com 5% de E70 não teve a capacidade de permear a pele, diferentemente dos cremes com 10 e 20%. Como um

cosmético não deve atingir o sistema circulatório, já que este tipo de produto passaria a ser classificado como um medicamento, a formulação contendo 5% de E70 parece ser a mais adequada para utilização como fitocosmético, de acordo com este parâmetro.

Avaliando a retenção cutânea da formulação contendo 5% de E70, foi verificado que após 4 horas de contato do creme com a pele, 0,2245 mg/cm² de E70 ficaram retidos na pele, e após 8 horas, este valor foi de 0,3521 mg/cm². Não está disponível um parâmetro pré-estabelecido que relacione a concentração do ativo em solução, como foi utilizado na avaliação da atividade antioxidante e citotóxica, com a quantidade de extrato por área de pele, como foi feito no estudo da retenção cutânea, mas foram levados em consideração os valores absolutos para definir a eficácia e segurança do produto. Desta forma, a quantidade retida na pele após 4 horas de contato com o fitocosmético é muito próxima ao IC₅₀ do E70 para a atividade antioxidante e, após 8h de contato, ultrapassa o IC₅₀, demonstrando que, baseado neste parâmetro, o fitocosmético teria a capacidade de agir como um potente antioxidante, mesmo na concentração mais baixa testada para o fitocosmético de 5%.

Em relação à segurança deste produto, mais uma vez com os resultados obtidos foi possível inferir que ele é muito seguro, uma vez que, mesmo após 8 horas de contato do creme com a pele, a quantidade contida por área de pele é aproximadamente 75 (HepG2) e 55 (HaCat) vezes menor do que a quantidade de extrato que poderia causar algum dano celular.

A retenção no estrato córneo não pode ser verificada, mas de acordo com os resultados da liberação, foi verificado que em torno de 60% do E70 contido no produto é liberado em 8 h de contato com a membrana biológica, o que garante a presença do ativo sobre a pele, e a sua presença no estrato córneo, uma vez que o ativo foi capaz de atravessá-lo para atingir a epiderme e a derme podendo, assim, agir como cosmético antienvhecimento, devido ao poder antioxidante.

Assim, a utilização de 5% de E70 no fitocosmético é uma concentração adequada, gerando um produto com elevado poder antioxidante e segurança ao consumidor.

9) Avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético

Foi realizada a avaliação da atividade antioxidante do fitocosmético contendo 5% do extrato de *P. guajava* L. A concentração de creme avaliada foi de 7 mg/mL, e os cálculos para a determinação da concentração de E70 no fitocosmético foram efetuados. As porcentagens de inibição obtidas das triplicatas e a média com desvio padrão estão apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18. Porcentagem de inibição do radical DPPH causada pelo fitocosmético

	1	2	3	Média	Desvio padrão
% de inibição	40,43	40,65	40,54	40,54	0,109
Concentração de extrato (mg/mL)	0,3133	0,3149	0,3141	0,3141	0,008

A concentração teórica de extrato contido em 7 mg/mL de fitocosmético é de 0,35 mg/mL. Entretanto, como pode ser notado pela análise da Tabela 18, a quantidade média detectada pela análise da atividade antioxidante do creme preparado a 5% foi de 0,3141 mg/mL. Provavelmente esta concentração observada, que é menor do que a esperada, deve ser devido a uma redução na eficiência da atividade antioxidante causada pela necessidade de correção do pH do extrato que, por ser ácido, teve de ser corrigido para a faixa de pH usual para cosméticos. Este procedimento pode ter causado a neutralização da vitamina C que, provavelmente, está presente no extrato.

10) Caracterização das formulações

10.1) Classificação do tipo de emulsão

Como observado pela microscopia óptica, e com o auxílio dos corantes hidrofílico e lipofílico, o creme base e o fitocosmético são emulsões do tipo O/A, ou seja, que tem como fase interna os componentes graxos da formulação, e a fase externa é constituída pelos componentes aquosos (Figuras 36 e 37).

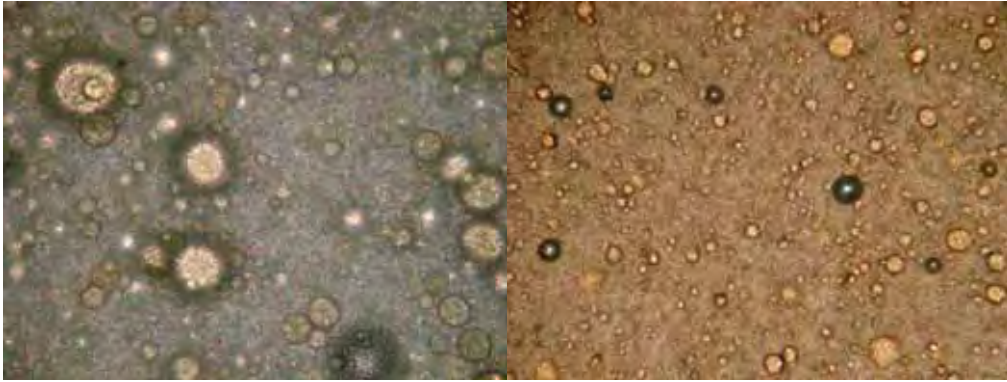


Figura 36. Fotomicrografia do creme base com o corante lipofílico (marrom) (Aumento de 400 vezes e 100 vezes, respectivamente).

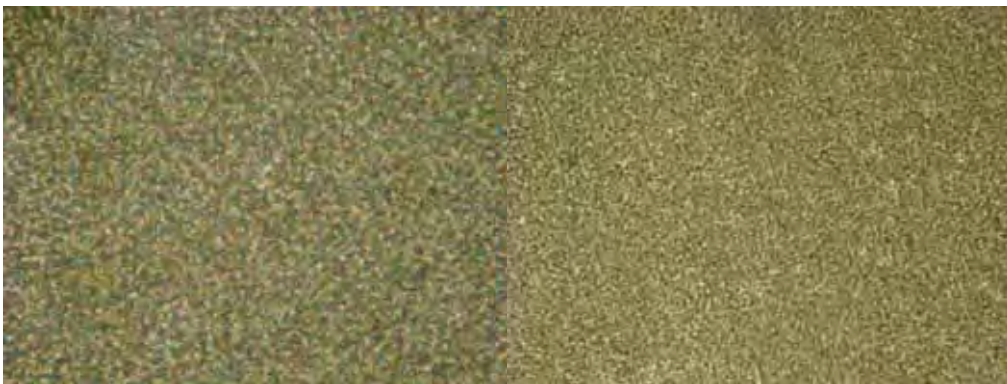


Figura 37. Fotomicrografia do creme base com o corante hidrofílico (amarelo) (Aumento de 400 e 100 vezes, respectivamente).

Como pode ser notado nas Figuras 36 e 37, quando o creme base é adicionado de corante lipofílico marrom, podem ser observadas na fotomicrografia gotículas deste corante que não foi solubilizado. Diferentemente, quando o corante hidrofílico amarelo é utilizado, apenas é possível notar um campo escuro na imagem, já que o corante foi solubilizado em toda a fase externa do creme base.

10.2) Caracterização reológica das formulações

O interesse no estudo da reologia de cosméticos e produtos farmacêuticos tem crescido constantemente. No caso das emulsões, isto tem ocorrido principalmente devido à correlação existente entre o comportamento destas formulações e a estabilidade (GALLEGOS & FRANCO, 1999).

Bruna Galdorfini Chiari

Na Figura 38 estão apresentadas as curvas de fluxo do creme base e do fitocosmético.

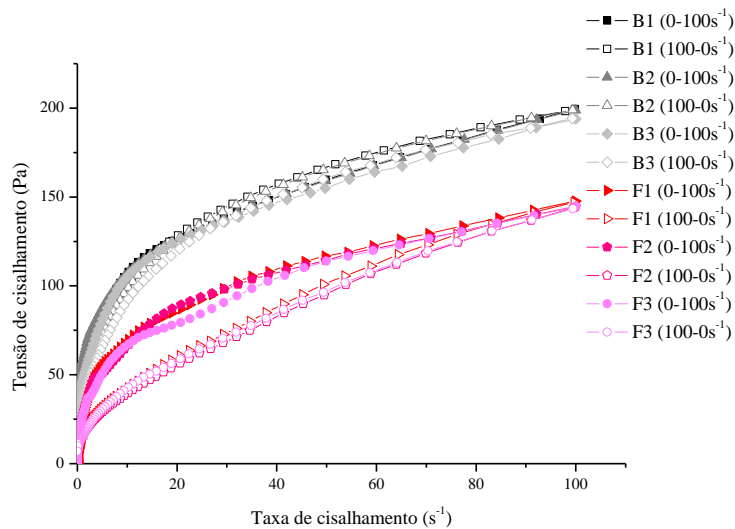


Figura 38. Curvas de fluxo do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3).

O reograma apresentado na Figura 38 demonstra que não existe relação linear entre os valores das tensões de cisalhamento e das taxas de cisalhamento, explicitando o comportamento não-Newtoniano das formulações avaliadas (MILAN et al., 2007). O mesmo reograma também caracteriza os fluidos como pseudoplásticos, característica desejável para produtos de aplicação tópica, em que após o cisalhamento a resistência inicial para a formulação fluir diminui, refletindo a facilidade de aplicação (MORAIS et al., 2005).

O creme base e o fitocosmético também foram caracterizados como tixotrópicos, pois apresentaram uma área entre as curvas de subida e descida, ou seja, após ter sofrido o cisalhamento crescente (0-100 s⁻¹), com a redução gradual deste cisalhamento até que cessasse, não foi observada uma recuperação total da estrutura. Os valores das áreas de histerese estão mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Áreas de histerese das formulações em Pa/s

Formulação	1	2	3	Média	Desvio padrão
Base	146,6	141,2	136,55	141,45 ^a	5,02
Fitocosmético	1293,0	1407,0	1505,0	1401,66 ^b	106,10

^{a,b} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Também foi verificado que o fitocosmético apresentou esta característica de forma mais acentuada que o creme base, sendo que a tixotropia média do creme base foi de 141,45 Pa/s enquanto que, para o fitocosmético, o valor mensurado foi de 1401,66 Pa/s.

A grande diferença nos valores da tixotropia observados entre o creme base e o fitocosmético é, provavelmente, devida ao E70, já que esta é a única diferença entre as duas formulações.

Também foi possível observar que o creme base é mais viscoso que o fitocosmético. Isto é facilmente observado pela tangente do ângulo formado entre o eixo x do reograma e a curva obtida, que indica o valor da viscosidade da formulação.

Através das curvas de fluxo, foi possível avaliar qual o modelo reológico que descreve o comportamento dos fluidos analisados. O creme base e o fitocosmético são melhor descritos pelo modelo de Herschel-Bulkley, que tem como equação:

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$$

Os valores correspondentes as variáveis presentes na equação de Herschel-Bulkley para o creme base e o fitocosmético estão apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Parâmetros que descrevem o creme base (B) e o fitocosmético (F) de acordo com o modelo reológico de Herschel-Bulkley, determinados em triplicata

Formulação	τ_0	K	n	Chi^2	r
B1	6,447	40,63	0,3433	14000	0,9796
B2	-0,02177	60,92	0,2465	5854	0,9908
B3	1,912	49,46	0,2935	3976	0,9938
F1	5,115	26,75	0,3652	2601	0,9925
F2	7,143	22,60	0,3925	3189	0,9899
F3	7,778	23,58	0,3865	5583	0,9832

Os valores de K e n observados caracterizam o índice de consistência e o índice de comportamento de fluxo, respectivamente. O índice de consistência indica o grau de resistência do fluido diante do escoamento, ou seja, quanto maior o valor de K mais viscoso será o fluido (BORGES et al., 2009). O índice de comportamento de fluxo quando menor que 1 determina que o fluido é do tipo não-Newtoniano, pseudoplástico, como já havia sido detectado nas curvas de fluxo (BORGES et al., 2009).

Em seguida, foi efetuado o teste de limite de escoamento. O limite de escoamento é a característica que alguns fluídos apresentam em resistir ao fluxo, ou seja, é a tensão de cisalhamento mínima requerida para iniciar o fluxo (BARRY & WARBURTON, 1968). Através da reologia esta resistência pode ser determinada. Os gráficos do ensaio de limite de escoamento estão apresentados na Figura 39.

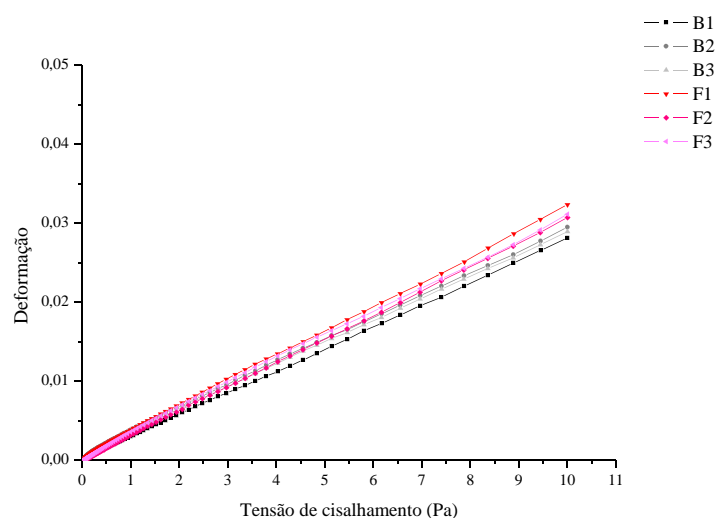


Figura 39. Limite de escoamento estático do creme base (B) e fitocosmético (F) (n=3).

Bruna Galdorfini Chiari

Por este ensaio podemos constatar que os produtos em análise apresentam muito baixa resistência ao fluxo, sofrendo deformação, ou seja, fluindo assim que uma pequena tensão de cisalhamento é aplicada sobre eles. Para que pudesse ser observada, mais claramente, qual a tensão necessária para provocar o início do fluxo nas formulações, o gráfico da Figura 39 teve sua escala modificada (Figura 40).

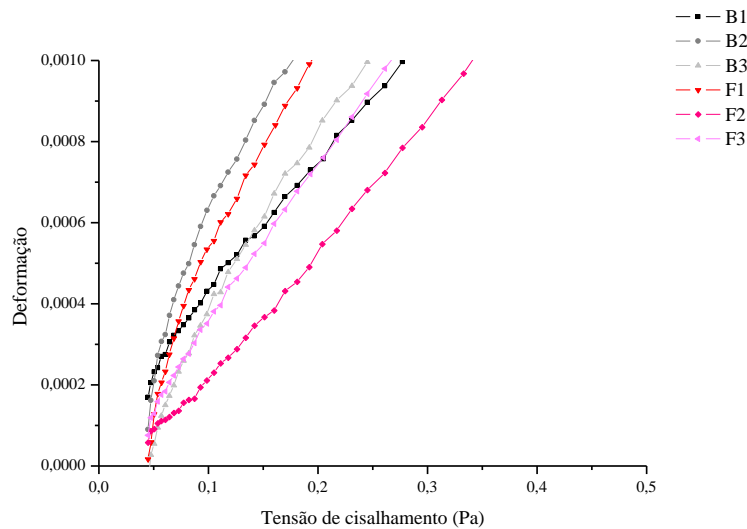


Figura 40. Gráfico do limite de escoamento estático do creme base (B) e do fitocosmético (F) ($n=3$) em menor escala.

Com a aproximação do gráfico (mudança de escala), foi possível observar que a tensão necessária para o início do fluxo do creme base e do fitocosmético é de aproximadamente 0,05 Pa. Segundo Barry & Warburton (1968) este parâmetro é denominado limite de escoamento estático. Também segundo estes autores, é possível calcular o limite de escoamento dinâmico a partir da curva de fluxo do produto em análise. O limite de escoamento dinâmico é a energia necessária para manter constante a relação entre taxa e tensão de cisalhamento em um sistema que teve sua estrutura parcialmente ou totalmente corrompida durante a curva de subida ($0-100 \text{ s}^{-1}$) da curva de fluxo. Este parâmetro é calculado pela extrapolação da porção linear da curva de fluxo de volta ($100-0 \text{ s}^{-1}$) para o eixo da tensão de cisalhamento (BARRY & WARBURTON, 1968) (Figura 41).

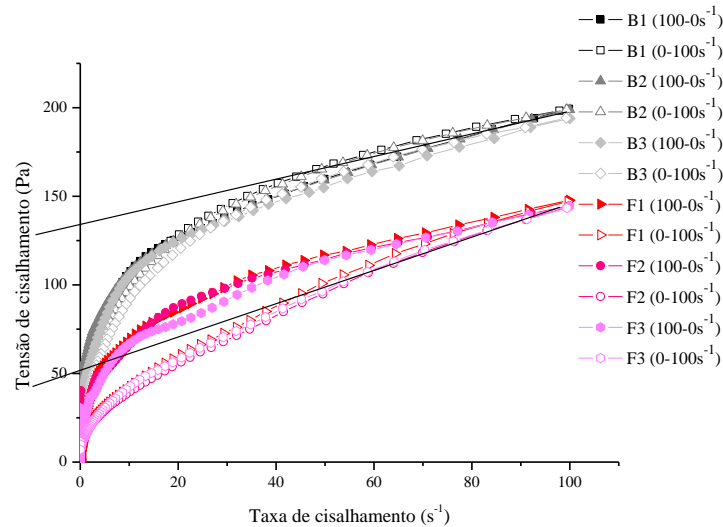


Figura 41. Avaliação do limite de escoamento dinâmico nas curvas de fluxo do creme base (B) e do fitocósmético (F) (n=3).

De acordo com esta análise, o limite de escoamento dinâmico para o creme base é de 134,07 Pa e para o fitocósmético de 50,92 Pa.

Em seguida, foram feitas análises das formulações submetidas a frequências constantes, mas com tensão de cisalhamento variável, de 0-100 Pa. Este ensaio, denominado varredura de tensão, é útil na observação da região viscoelástica linear, para a determinação de intervalos de tensão de cisalhamento que as amostras podem ser submetidas sem nenhum dano às suas estruturas e, também, tensões suficientes para promover o fluxo dos produtos.

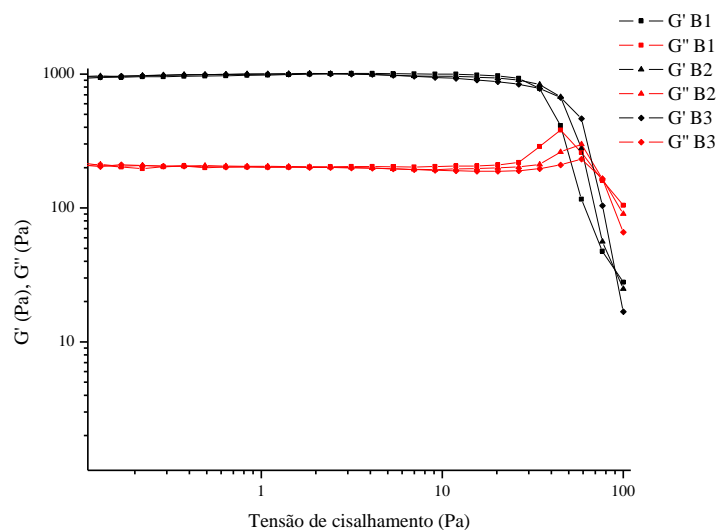


Figura 42. Varredura de tensão do creme base (n=3).

O gráfico obtido para o creme base (Fig. 42) mostra que esta formulação pode ser submetida à uma faixa de tensão de 0 a aproximadamente 10 Pa, sem nenhum tipo de alteração estrutural. Porém, como foi verificado um limite de escoamento de 0,05 Pa, os ensaios foram realizados em uma faixa de tensão de 0,05 a 10 Pa, garantindo a condição viscoelástica linear.

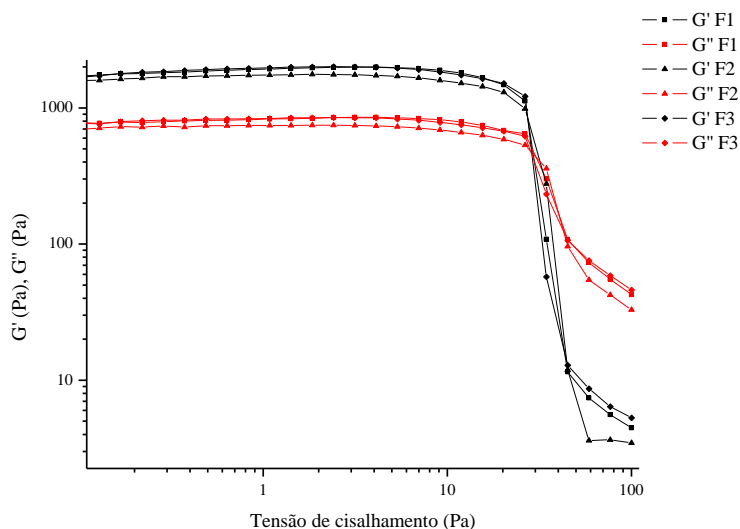


Figura 43. Varredura de tensão do fitocosmético (n=3).

Na avaliação da varredura de tensão do fitocosmético (Figura 43), um perfil semelhante ao do creme base foi observado, entretanto, ele se mostrou mais resistente a elevadas tensões de cisalhamento que o creme base, resistindo a tensões próximas a 12 Pa.

Para que se tivesse a garantia da integridade da estrutura das formulações em análise, e também para facilitar a comparação entre elas, os ensaios oscilatórios (varredura de frequência e de fluência e relaxação) foram realizados com uma tensão de 1 Pa.

O ensaio de varredura de frequência, apresentado nas Figuras 44 e 45, é útil na caracterização de produtos com características viscoelásticas.

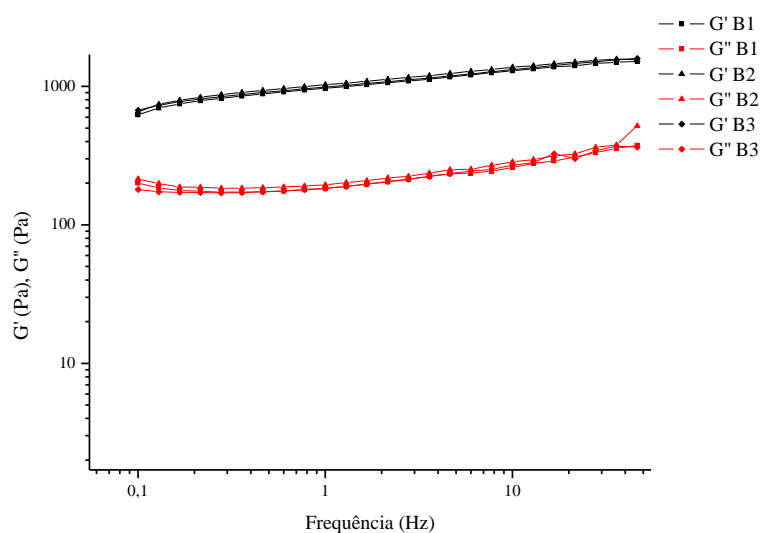


Figura 44. Varredura de frequência do creme base (n=3).

A Figura 44 mostra a varredura de frequência do creme base. Segundo este resultado, este creme pode ser caracterizado como viscoelástico, apresentando módulo elástico (G') superior ao viscoso (G''). Isto é uma característica vantajosa para uma emulsão, demonstrando maior estabilidade deste produto.

Para o fitocosmético (Figura 45), comportamento semelhante foi observado, mas os valores de G' e G'' são menores que o do creme base e, também, os valores de G' estão mais próximos aos de G'' , demonstrando uma característica menos elástica que o creme base. Estes dados podem ser facilmente visualizados na Tabela 21.

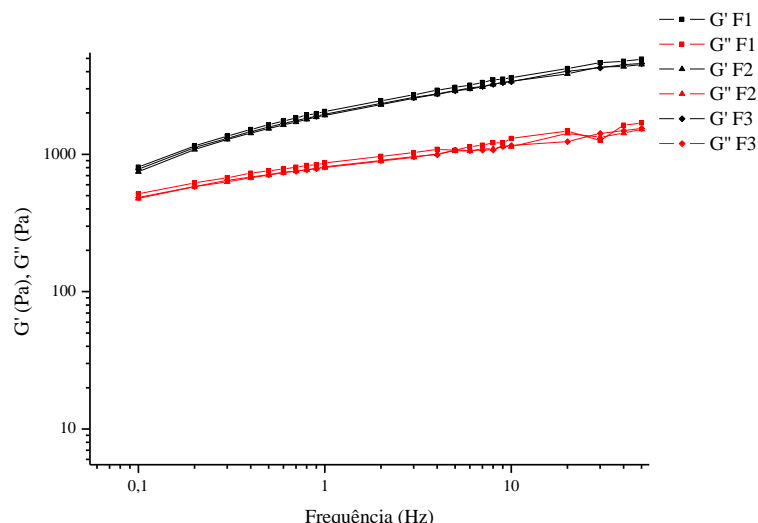


Figura 45. Varredura de frequência do fitocosmético (n=3).

Tabela 21. Valores iniciais de G' e G'' para o creme base (B) e para o fitocosmético (F)

Formulação	G'	G''
B1	624,0	200,5
B2	655,2	215,0
B3	674,6	180,2
Média de B	651,3±25,5 ^a	198,6±17,5 ^c
F1	805,3	515,6
F2	745,5	476,1
F3	778,1	484,2
Média de F	776,3±29,9 ^b	491,9±20,8 ^d

^{a,b,c,d} letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

Após o ensaio de varredura de frequência, as formulações foram avaliadas no teste de fluência e relaxação. Este é um ensaio que permite diferenciar, de forma bastante satisfatória, as respostas elásticas das viscosas (SCHRAMM, 2006).

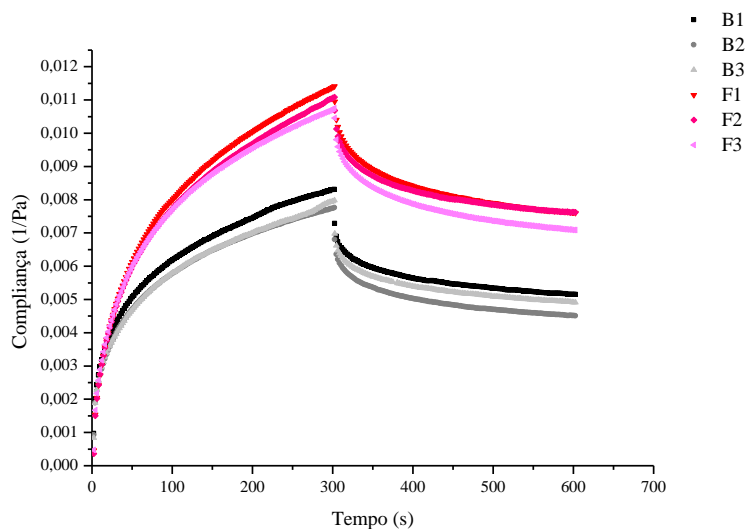


Figura 46. Ensaio de fluência e relaxação do creme base (B) e do fitocosmético (F) (n=3).

O perfil de resposta observado (Fig. 46) demonstra que o creme base e o fitocosmético são realmente formulações viscoelásticas, como já havia sido verificado na varredura de frequência (SCHRAMM, 2006). Evidencia, também, a capacidade de recuperação que estas formulações apresentam de aproximadamente $39,27 \pm 2,04\%$ para o creme base e de $32,8 \pm 1,44\%$ para o fitocosmético.

O comportamento viscoelástico de um fluido significa que ele apresenta características semelhantes às de um líquido e de um sólido, concomitantemente (BARRY & WARBUNTON, 1968). Eles têm sido descritos como uma dispersão de moléculas com segmentos intermitentes, tipo mola em um óleo altamente viscoso (SCHRAMM, 2006).

Neste ensaio, foi possível avaliar a compliança (J), uma variável que demonstra o quão complacente é uma amostra, ou seja, quanto mais alta for a compliança, mais fácil será de deformar por uma tensão aplicada (SCHRAMM, 2006). Com isso, é verificada uma maior compliança no gráfico para o fitocosmético em comparação ao creme base. Isto é uma característica esperada, já que apresenta menor viscosidade que o creme base.

A fluência das duas formulações (deformação quando submetidas a tensão de cisalhamento de 0-100 Pa) apresenta um comportamento que une o comportamento

apresentado por um fluido de Maxwell, de Kelvin-Voigt e de Burger, descrito no software RheoWin 3, utilizado para avaliação dos resultados obtidos, como modelo J3 (SCHRAMM, 2006). A união destes três modelos permite descrever melhor materiais reais.

Desta forma, três fases podem ser distinguidas na curva de fluência das formulações:

- 1^a) aumento instantâneo da deformação, com um comportamento de mola como de um fluido de Maxwell,
- 2^a) aumento gradual na curva de deformação devido ao elemento de Kelvin-Voigt,
- 3^a) uma resposta do modelo de Burger, puramente viscosa.

10.3) Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas no creme base e no fitocosmético

A utilização de veículos contendo estruturas líquido-cristalinas contendo um ativo para aplicação tópica permite difusão facilitada da substância ativa através da pele (FARKAS et al., 2000). Além disso, os cristais líquidos são termodinamicamente estáveis, produzindo emulsões que podem ser estocadas por longo período de tempo, sem separação de fases (MAKAI et al., 2003).

10.3.1) Avaliação das formulações utilizando microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma técnica adequada à detecção de estruturas líquido-cristalinas liotrópicas, que exibem birrefringência, assim como cristais verdadeiros, facilitando a observação neste aparato (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Nas Figuras 47 e 48 estão apresentadas as fotomicrografias das formulações em estudo. É fácil notar a presença de estruturas anisotrópicas, denominadas cristais líquidos. Este tipo de formação é muito desejável em formulações, pois indicam maior estabilidade do sistema.

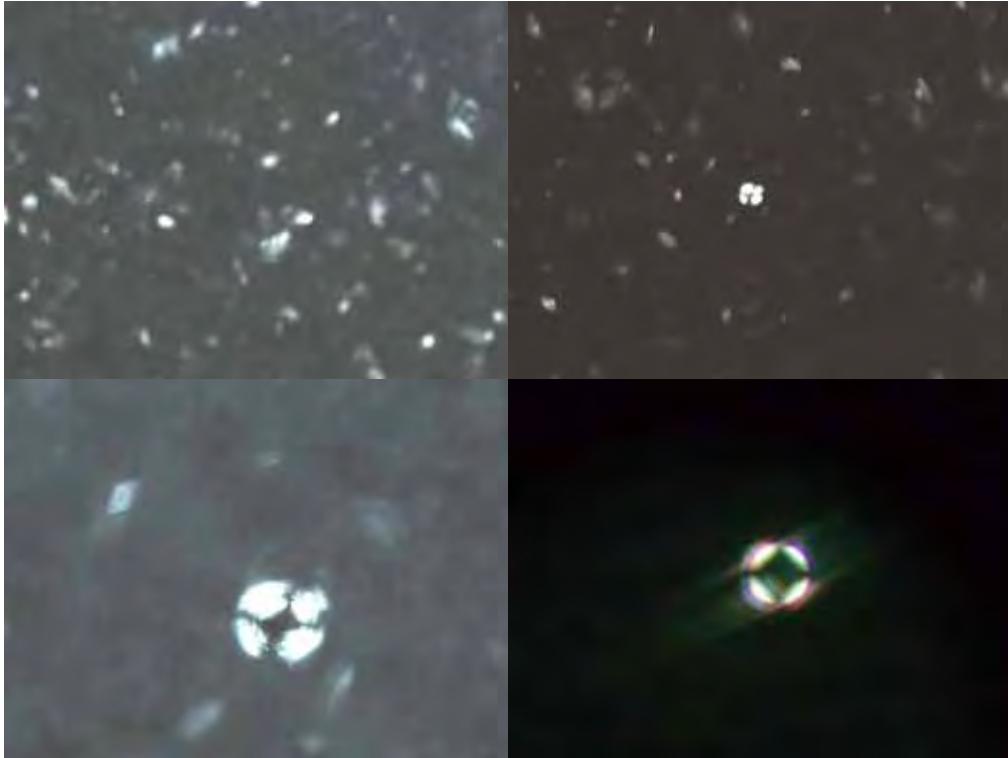


Figura 47. Fotomicrografia do creme base (aumentos de 50 e 200 vezes).

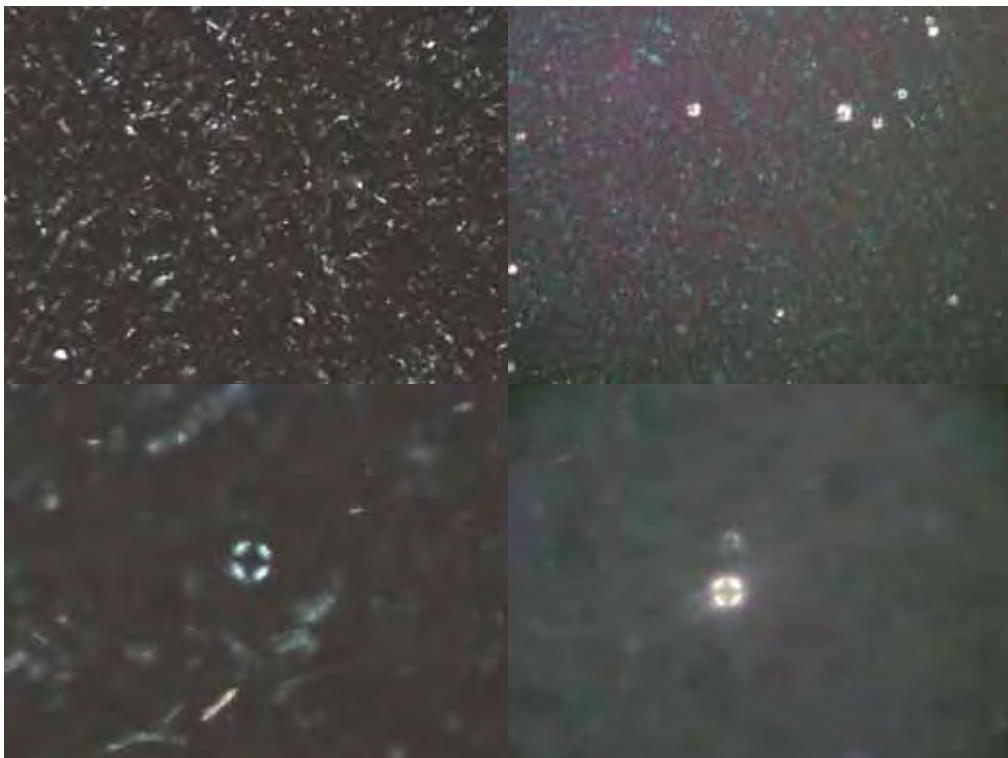


Figura 48. Fotomicrografia do fitocosmético (aumentos de 50 e 200 vezes).

Para confirmar a presença deste tipo de formação nos produtos, as formulações foram submetidas a outro ensaio, mais sensível, que é a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

10.3.2) Avaliação das formulações pela técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS)

Os gráficos obtidos para as medidas de SAXS para as formulações base e contendo o extrato foram os das Figuras 49 e 50.

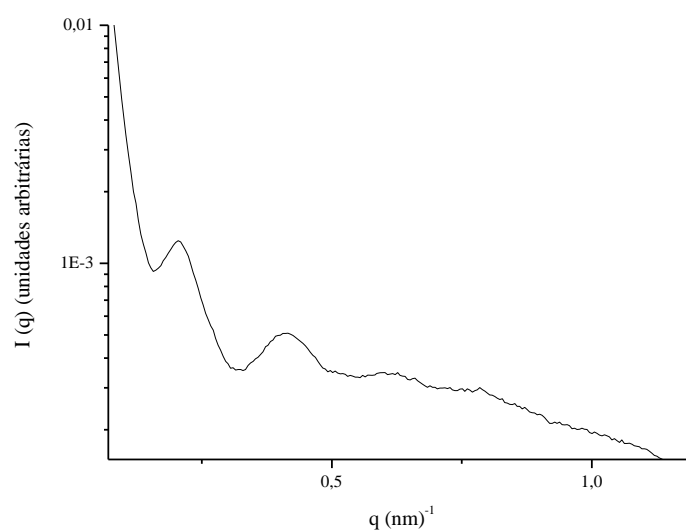


Figura 49. Resultados do ensaio de SAXS para o creme base.

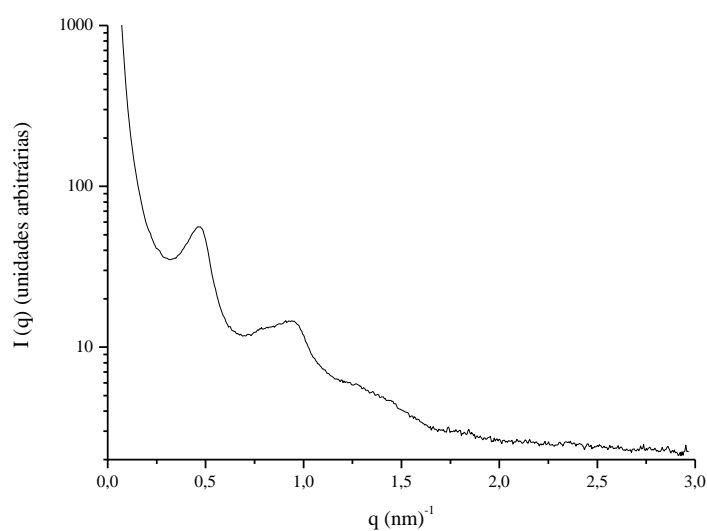


Figura 50. Resultados do ensaio de SAXS para o fitocosmético.

Os gráficos foram construídos a partir dos valores de intensidade de espalhamento dos raios-X ($I(q)$) em função vetor de espalhamento (q). Através destes valores é possível definir o tipo de estrutura formada.

Utilizando os valores de q para cada um dos picos existentes, é possível determinar a distância entre os objetos espalhadores (d), que é calculada a partir da equação:

$$d = \frac{2\pi}{q}, \text{ onde}$$

q é a posição máxima do pico.

A relação entre a distância dos objetos espalhadores possibilita a caracterização do tipo de sistema em análise (Tabela 22) (ALEXANDRIDIS et al., 1998).

Tabela 22. Parâmetros determinados pelo ensaio de SAXS para o creme base e fitocosmético

Formulação	q1 (1º pico)	d1 ($2\pi/q1$)	q2 (2º pico)	d2 ($2\pi/q2$)	d1/d2	Estrutura
Creme Base	0,2033	30,8903	0,4096	15,3320	2,0	Líquido-cristalina lamelar
Fitocosmético	0,4658	13,4821	0,9537	6,5848	2,0	Líquido-cristalina lamelar

Em ambas as formulações, a relação entre a distância dos objetos espalhadores ($d1/d2$) foi igual a 2, caracterizando formações líquido cristalinas do tipo lamelar (ALEXANDRIDIS et al., 1998).

Com base nos resultados obtidos a partir da microscopia de luz polarizada e da técnica de SAXS, é possível inferir que o sistema obtido contém estruturas líquido-cristalinas. Estas estruturas são descritas como a combinação das propriedades do estado líquido e sólido, ou seja, apresentam a habilidade de fluir como líquidos, e a organização cristalina organizada de um sólido, sendo assim, são estados

intermediários, denominados também, mesofase (MARSH, 1973). A formação deste tipo de estrutura em sistemas para uso tópico são propiciadas pelo uso de componentes anfifílicos, como os tensoativos (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

A presença destas estruturas confirma a característica de fluidos pseudoplásticos, tanto do creme base quanto do fitocosmético, verificada na avaliação das curvas de fluxo das formulações, já que cristais-líquidos do tipo lamelar costumam apresentar características de fluidos pseudoplásticos. Também justifica o comportamento tixotrópico dos cosméticos (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

Além disso, a formação de estruturas lamelares são essenciais para obtenção de sistemas emulsionados óleo/água finamente dispersos. Em ambas as fases, as propriedades hidrofílica-lipofílica estão balanceadas, resultando em mínima tensão interfacial entre as fases aquosa e graxa, contribuindo para a estabilidade do sistema (ENGELS et al., 1995). A estabilidade do sistema também é propiciada pela formação das fases lamelares em torno das micelas do sistema, dificultando a coalescência.

Outra vantagem da presença deste tipo de organização no sistema em estudo é o aumento da hidratação cutânea. Em um estudo de Friedman et al. (1995), foi demonstrado que a presença de estruturas lamelares promove maior penetração da água contribuindo, portanto, para melhor hidratação cutânea. Isto é muito desejável em um fitocosmético para uso como cosmético antienvhecimento, uma vez que além do potencial antioxidante, proporcionará melhor hidratação da pele, o que é de grande importância na desaceleração do envelhecimento cutâneo, mais especificamente, do retardamento no processo de aparecimento de rugas e na melhoria do aspecto da pele. A melhoria na hidratação cutânea foi descrita por Boddé (1995) e a redução na evaporação de água da pele foi descrita por Moaddel & Friberg (1995).

10.4) Avaliação da estabilidade das formulações

As formulações foram avaliadas quanto à estabilidade.

Ambas as formulações foram aprovadas no teste da centrifugação, pois não foi observada separação de fases.

As características organolépticas (aspecto, cor e odor) das formulações foram mantidas durante o período de estudo (90 dias), com exceção da cor do fitocosmético

submetido à temperatura de $45\pm 2^\circ\text{C}$, no qual foi observado um escurecimento a partir do 7º dia. Entretanto, este escurecimento é facilmente explicado pelo elevado teor de açúcares contidos no E70, que sofre o processo de caramelização, que é favorecido por temperaturas elevadas e umidade, como encontrado no fitocosmético (SOUSA et al., 2003; TASCA, 2007). Também não foi observada separação de fases em nenhuma das formulações, mesmo quando submetidas às condições de estresse.

Quanto ao valor de pH das formulações, foi possível observar pequenas variações entre os valores determinados nos dias de análise como demonstrado nas Figuras 51 e 52 e Tabelas 23 e 24.

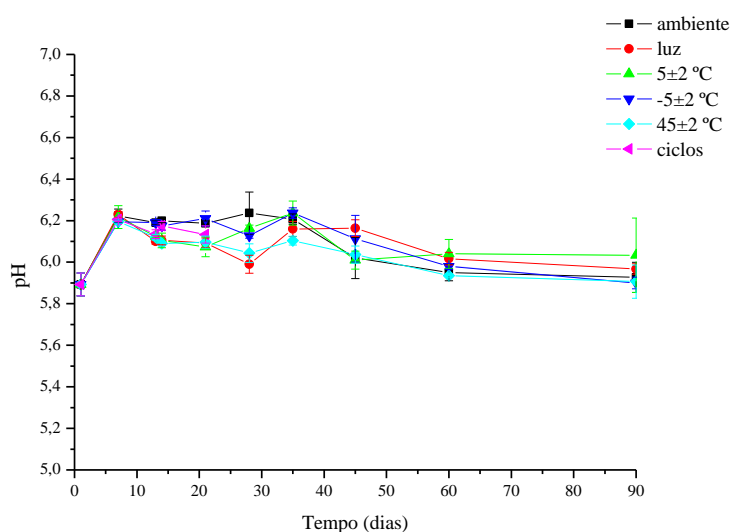


Figura 51. Valores de pH do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

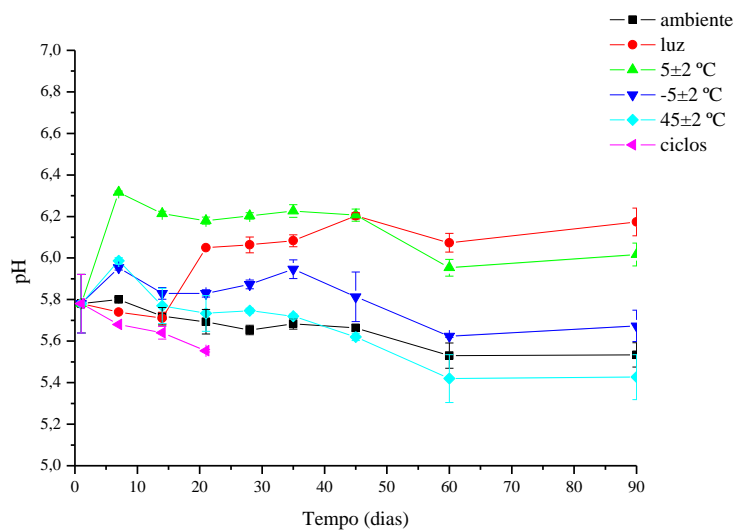


Figura 52. Valores de pH do fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

Tabela 23. Média e desvio padrão (DP) dos valores de pH durante o estudo de estabilidade do creme base

dias	Amb.	DP	Luz	DP	5±2°C	DP	-5±2°C	DP	45±2°C	DP	Ciclos	DP
1	5,89	0,06	5,89	0,06	5,89	0,06	5,89	0,06	5,89	0,06	5,89	0,06
2	6,00	0,01	5,98	0,01	6,01	0,01	5,97	0,01	6,01	0,02	5,96	0,01
3	5,90	0,01	5,94	0,01	5,81	0,05	5,82	0,01	5,91	0,02	5,97	0,03
4	6,24	0,07	6,20	0,01	6,13	0,05	6,10	0,01	6,23	0,11	6,16	0,04
5	6,28	0,03	6,17	0,04	6,10	0,08	6,16	0,02	6,17	0,01	6,26	0,05
6	6,17	0,08	6,09	0,01	6,03	0,03	6,11	0,04	6,14	0,01	6,15	0,02
7	6,22	0,03	6,23	0,01	6,22	0,06	6,20	0,01	6,20	0,01	6,21	0,01
8	6,21	0,02	6,17	0,02	6,08	0,04	6,17	0,04	6,19	0,02	6,21	0,01
9	6,21	0,01	6,12	0,06	6,09	0,01	6,16	0,01	6,22	0,00	6,18	0,01
10	6,20	0,01	6,14	0,02	6,15	0,04	6,14	0,01	6,21	0,01	6,17	0,01
11	6,20	0,02	6,09	0,02	6,17	0,12	6,14	0,04	6,17	0,01	6,20	0,01
12	6,21	0,02	6,10	0,02	6,13	0,04	6,17	0,04	6,12	0,04	6,16	0,02
13	6,19	0,01	6,10	0,01	6,13	0,01	6,19	0,01	6,12	0,01	6,14	0,02
14	6,20	0,01	6,11	0,02	6,11	0,04	6,18	0,02	6,09	0,00	6,18	0,02
21	6,19	0,01	6,09	0,02	6,07	0,05	6,21	0,04	6,10	0,03	6,13	0,04
28	6,24	0,10	5,99	0,04	6,16	0,02	6,13	0,01	6,04	0,05		
35	6,21	0,03	6,16	0,04	6,24	0,06	6,24	0,03	6,10	0,02		
45	6,02	0,10	6,16	0,04	6,01	0,04	6,11	0,11	6,04	0,04		
60	5,95	0,04	6,02	0,03	6,04	0,07	5,98	0,01	5,94	0,01		
90	5,93	0,07	5,97	0,03	6,03	0,18	5,90	0,03	5,91	0,08		

Tabela 24. Média e desvio padrão (DP) dos valores de pH durante o estudo de estabilidade do fitocosmético

dias	Amb.	DP	Luz	DP	5±2°C	DP	-5±2°C	DP	45±2°C	DP	Ciclos	DP
1	5,78	0,14	5,78	0,14	5,78	0,14	5,78	0,14	5,78	0,14	5,78	0,14
2	5,79	0,00	5,62	0,02	6,21	0,00	5,72	0,08	6,11	0,03	5,82	0,02
3	5,60	0,01	5,52	0,02	6,16	0,03	5,71	0,09	5,93	0,01	5,64	0,01
4	5,81	0,09	5,72	0,03	6,21	0,05	5,81	0,09	6,07	0,01	5,76	0,03
5	5,78	0,00	5,70	0,02	6,26	0,03	5,79	0,01	6,01	0,01	5,70	0,02
6	5,76	0,00	5,70	0,05	6,28	0,04	5,78	0,05	5,96	0,02	5,69	0,01
7	5,80	0,01	5,74	0,00	6,32	0,01	5,95	0,01	5,99	0,02	5,68	0,00
8	5,81	0,02	5,73	0,01	6,24	0,03	5,91	0,04	5,92	0,01	5,69	0,01
9	5,76	0,01	5,68	0,01	6,27	0,01	5,90	0,01	5,92	0,01	5,65	0,01
10	5,75	0,03	5,69	0,01	6,28	0,01	5,91	0,01	5,96	0,02	5,68	0,03
11	5,76	0,01	5,71	0,01	6,37	0,01	5,95	0,01	6,02	0,04	5,67	0,01
12	5,72	0,04	5,76	0,01	6,27	0,04	5,90	0,02	5,91	0,03	5,69	0,04
13	5,76	0,04	5,73	0,01	6,22	0,04	5,84	0,02	5,89	0,06	5,69	0,02
14	5,72	0,04	5,71	0,03	6,21	0,01	5,83	0,03	5,77	0,08	5,64	0,03
21	5,69	0,06	6,05	0,00	6,18	0,02	5,83	0,02	5,73	0,09	5,55	0,01
28	5,65	0,02	6,06	0,04	6,20	0,02	5,87	0,02	5,75	0,01		
35	5,68	0,03	6,08	0,03	6,23	0,03	5,95	0,05	5,72	0,01		
45	5,66	0,02	6,20	0,02	6,21	0,03	5,81	0,12	5,62	0,02		
60	5,53	0,06	6,07	0,05	5,95	0,04	5,62	0,01	5,42	0,12		
90	5,53	0,06	6,17	0,07	6,02	0,06	5,67	0,08	5,43	0,11		

Nas Figuras 53 e 54 e Tabelas 25 e 26 estão dispostos os valores de viscosidade aparente mínima das formulações durante o tempo de investigação da estabilidade das formulações. Este parâmetro é denominado viscosidade aparente mínima pois é obtido através de um ensaio dinâmico, a curva de fluxo, em que a amostra é submetida a um

aumento gradual de cisalhamento e, em seguida, a uma redução gradual desta taxa de cisalhamento. A viscosidade aparente é denominada mínima, pois é determinada no ponto de maior cisalhamento deste ensaio (100 s^{-1}).

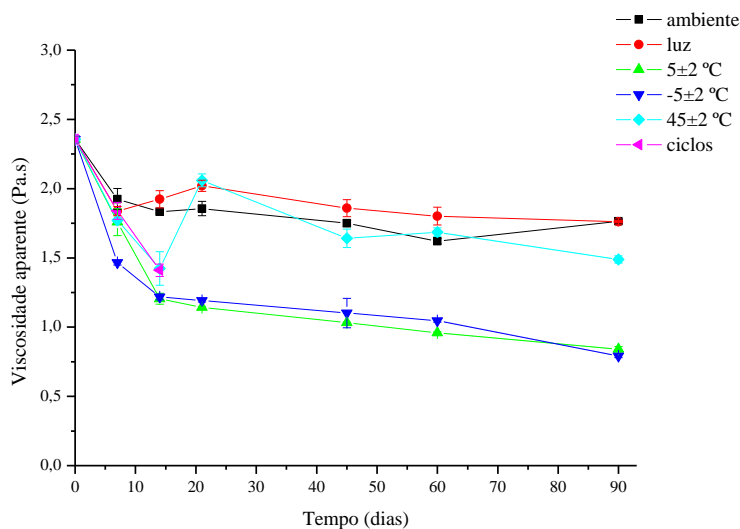


Figura 53. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

Tabela 25. Média e desvio padrão (DP) dos valores de viscosidade aparente mínima durante o estudo de estabilidade do creme base

dias	Amb.	DP	Luz	DP	5±2°C	DP	-5±2°C	DP	45±2°C	DP	Ciclos	DP
0	2,36	0,03	2,36	0,03	2,36	0,03	2,36	0,03	2,36	0,03	2,36	0,03
7	1,92	0,08	1,84	0,03	1,76	0,10	1,47	0,02	1,77	0,01	1,84	0,06
14	1,83	0,01	1,92	0,06	1,20	0,04	1,22	0,02	1,42	0,12	1,41	0,04
21	1,86	0,05	2,02	0,04	1,14	0,01	1,19	0,01	2,06	0,05		
45	1,75	0,02	1,86	0,06	1,03	0,00	1,10	0,11	1,64	0,07		
60	1,62	0,02	1,80	0,06	0,96	0,01	1,05	0,01	1,69	0,03		
90	1,76	0,02	1,76	0,01	0,84	0,02	0,79	0,01	1,49	0,03		

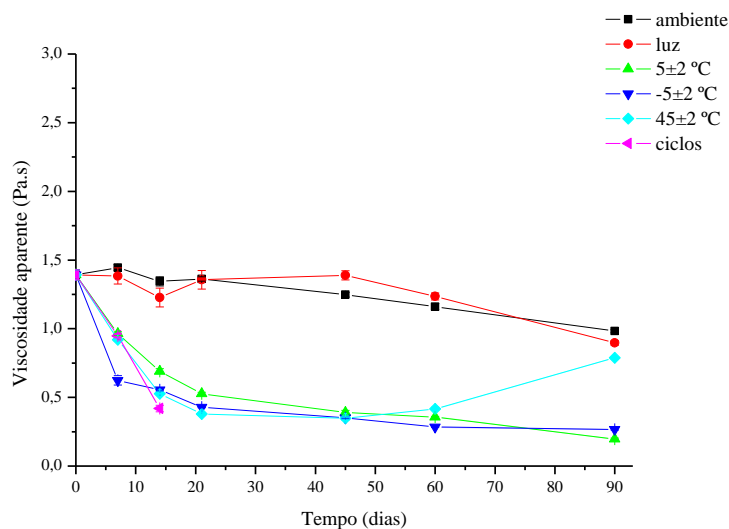


Figura 54. Valores de viscosidade aparente mínima (taxa de cisalhamento = 100s^{-1}) do fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

Tabela 26. Média e desvio padrão (DP) dos valores de viscosidade aparente mínima durante o estudo de estabilidade do fitocosmético

dias	Amb.	DP	Luz	DP	5±2°C	DP	-5±2°C	DP	45±2°C	DP	Ciclos	DP
0	1,39	0,04	1,39	0,04	1,39	0,04	1,39	0,04	1,39	0,04	1,39	0,04
7	1,44	0,02	1,38	0,06	0,96	0,01	0,62	0,03	0,92	0,01	0,95	0,01
14	1,35	0,03	1,23	0,07	0,69	0,02	0,56	0,01	0,53	0,00	0,42	0,02
21	1,36	0,02	1,36	0,07	0,53	0,01	0,43	0,00	0,38	0,01		
45	1,25	0,02	1,39	0,03	0,39	0,02	0,35	0,01	0,35	0,01		
60	1,16	0,02	1,24	0,03	0,36	0,01	0,28	0,00	0,42	0,01		
90	0,98	0,01	0,90	0,02	0,20	0,01	0,27	0,01	0,79	0,01		

Foi possível notar uma redução dos valores da viscosidade das formulações. Estas reduções foram acentuadas nas condições mais extremas de estresse térmico, ou seja $-5\pm 2^\circ\text{C}$, $45\pm 2^\circ\text{C}$ e ciclos de congelamento e descongelamento. No caso do creme base, não foi observada esta acentuação da redução da viscosidade na amostra acondicionada a $45\pm 2^\circ\text{C}$.

A seguir estão apresentados os valores de densidade aparente das formulações (Figuras 55 e 56 e Tabela 27).

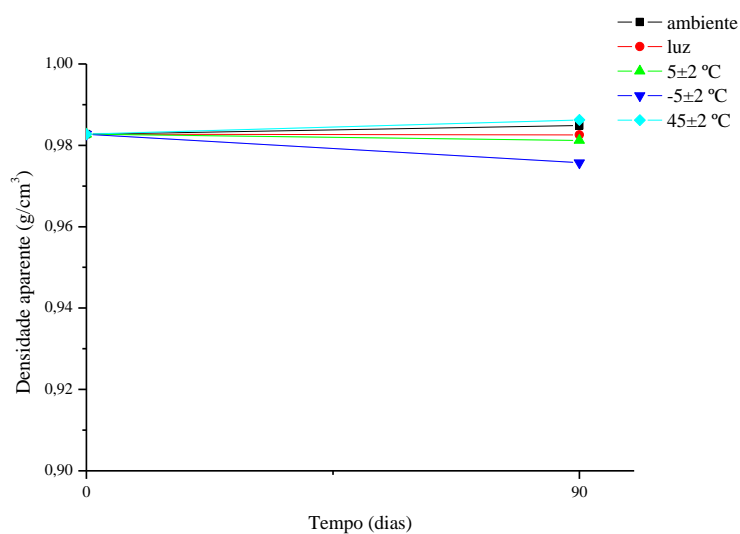


Figura 55. Valores de densidade aparente do creme base submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

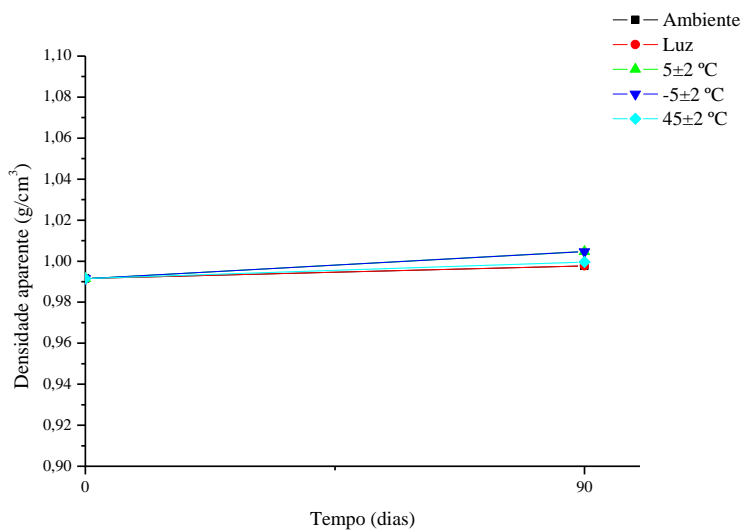


Figura 56. Valores de densidade aparente do fitocósmico submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

Tabela 27. Média dos valores da densidade aparente do creme base e do fitocosmético durante o estudo de estabilidade, no intervalo de 90 dias

Creme base					
	ambiente	luz	5±2° C	-5±2° C	45±2° C
Dia 0	0,982733 ^a	0,982733 ^a	0,982733 ^a	0,982733 ^a	0,982733 ^a
Dia 90	0,984869 ^a	0,982577 ^a	0,98120 ^{a,b}	0,975699 ^b	0,986245 ^a
Fitocosmético					
Dia 0	0,991513 ^c	0,991513 ^c	0,991513 ^c	0,991513 ^c	0,991513 ^c
Dia 90	0,997707 ^c	0,997707 ^c	1,004585 ^d	1,004585 ^d	0,999541 ^c

^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes (p<0,05).

A densidade aparente das formulações sofreu discreta variação apenas nas amostras armazenadas a 5±2° C e -5±2° C. Entretanto, são variações muito pequenas, que não indicam instabilidade do sistema.

A estabilidade química, ou seja, a estabilidade do ativo presente no fitocosmético também foi avaliada e os resultados estão mostrados na Figura 57 e Tabela 28. Este tipo de avaliação é importante para um conhecimento preciso da estabilidade do ativo presente na formulação, garantindo a eficácia e segurança do produto. Isto é ainda mais importante, no caso de ativos antioxidantes, que podem perder sua eficiência sem nenhum tipo de alteração perceptível no produto (VICENTINI et al., 2008). Neste trabalho, foi avaliada a estabilidade funcional do produto, pois a atividade antioxidante é que foi acompanhada durante o período de análise. Este procedimento também foi utilizado no trabalho de Vicentini et al. (2008), em que os resultados foram também comparados com análises do teor de ativo em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, indicando que a utilização do método do DPPH é adequado.

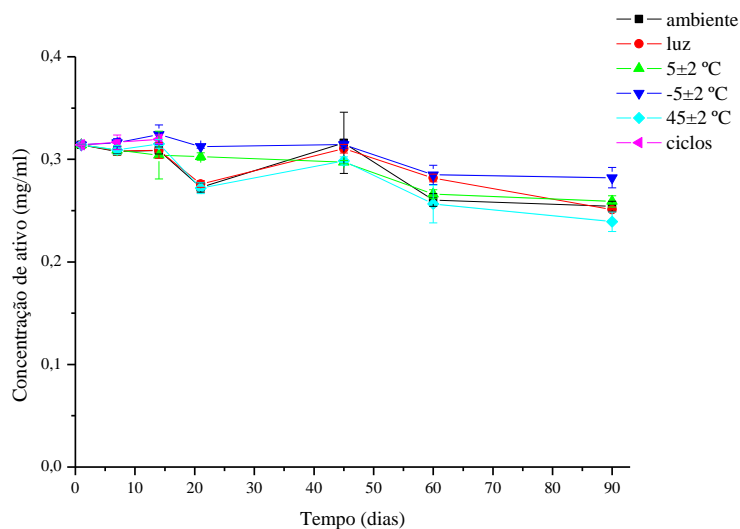


Figura 57. Concentração do extrato E70 contido no fitocosmético submetido a condições de estresse durante 90 dias de análise.

Foi possível observar uma queda na concentração do E70 nas amostras do fitocosmético expostas a diferentes condições ambientais.

Como o método utilizado para a quantificação do extrato no fitocosmético é um método indireto, baseado na atividade antioxidante, pode ser dito que este declínio no teor de ativo, na verdade, é uma redução na eficácia do fitocosmético, que pode ser atribuída a degradações nos componentes deste extrato.

Tabela 28. Média da concentração (mg/mL) e porcentagem de redução do E70 no fitocosmético durante o estudo de estabilidade

	ambiente	luz	5±2° C	-5±2° C	45±2° C	ciclos
Dia 0	0,31414 ^a	0,31414 ^a	0,31414 ^a	0,31414 ^a	0,31414 ^a	0,31414 ^a
Redução dia 0	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Dia 7	0,30745 ^a	0,30829 ^a	0,30884 ^a	0,31632 ^a	0,30912 ^a	0,3166 ^a
Redução dia 7	2,12%	1,86%	1,68%	0%	1,59%	0%
Dia 14	0,30861 ^a	0,30861 ^a	0,30415 ^a	0,32422 ^a	0,31502 ^a	0,31948 ^a
Redução dia 14	1,76%	1,76%	3,18%	0%	0%	0%
Dia 21	0,2726 ^b	0,27591 ^b	0,30266 ^a	0,31237 ^a	0,27189 ^b	-
Redução dia 21	13,22%	12,16%	3,65%	0,56%	13,44%	-
Dia 45	0,31609 ^a	0,31043 ^a	0,29733 ^a	0,31432 ^a	0,29839 ^a	-
Redução dia 45	0%	1,18%	5,35%	0%	5,01%	-
Dia 60	0,26037 ^b	0,2818 ^b	0,26601 ^b	0,28491 ^b	0,25643 ^b	-
Redução dia 60	17,11%	10,29%	15,32%	9,30%	18,37%	-
Dia 90	0,25416 ^b	0,25093 ^b	0,25900 ^b	0,28214 ^b	0,2391 ^b	-
Redução dia 90	19,09%	20,12%	17,55%	10,18%	23,88%	-

^{a,b,c,d} Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Avaliando a análise estatística (ANOVA) realizada entre os dias de análise (Tabela 28), para cada condição de estresse a que as amostras foram submetidas, pode ser percebido que a redução no teor de ativo foi significativa a partir do 60° dia de estudo da estabilidade do fitocosmético. Para as amostras armazenadas a temperatura ambiente, luz e 45±2° C, um comportamento interessante foi verificado. No 21° dia de análise, a avaliação estatística demonstrou uma redução no teor de ativo comparado aos

dias 0, 7 e 14, entretanto, pela análise estatística a concentração de ativo no dia 45 foi igual a dos dias 0, 7 e 14, por isso, a redução no teor de ativo foi considerada apenas após o 60º dia de estudo de estabilidade para todas as amostras submetidas à diferentes condições ambientais.

Em um estudo desenvolvido por Vicentini et al. (2008), em que a quercetina foi incorporada à uma formulação contendo cristais líquidos, foi verificada uma redução de 40% do teor de ativo durante o primeiro mês de estudo da estabilidade. Isto mostra que foi obtido um resultado satisfatório, pois a redução significativa só foi observada após 2 meses de estudo da estabilidade, e em 90 dias de análise a redução média da concentração de ativo foi de 18,16%.



Conclusão

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um fitocosmético com base em uma fruta de grande disponibilidade no território brasileiro, a partir da qual são produzidos alimentos de grande importância, mas que não apresentam elevado valor agregado como poderia ter um cosmético contendo ativo vegetal.

Além disso, os resultados obtidos com os ensaios de atividade antioxidante, liberação, permeação e retenção cutâneas mostram que o produto é eficaz como auxiliar na prevenção do envelhecimento cutâneo e pode, possivelmente, atuar na prevenção de danos causados por radicais livres à pele como, por exemplo, os radicais livres gerados pela radiação ultravioleta emitida pelo sol.

Ainda, o produto foi desenvolvido baseado em dados de citotoxicidade que indicam segurança ao possível usuário deste fitocosmético.

Esta pesquisa também buscou empregar metodologias alternativas à experimentação animal no estudo da eficácia e segurança de um fitocosmético. Demonstrou que estas metodologias podem, senão substituir, ao menos reduzir a experimentação com animais, e fazer com que, na etapa dos ensaios *in vivo*, o produto tenha se mostrado eficaz e seguro nos ensaios *in vitro*, evitando sofrimento aos animais.

Para que o produto desenvolvido possa ser comercializado, algumas fases ainda devem ser cumpridas como, por exemplo, a avaliação clínica e sensorial.



Referências

ABU-YOUSIF, A.O.; SMITH, K.A.; GETSIOS, S.; GREEN, K.J.; VAN DROSS, R.T.; PELLING, J.C. Enhancement of UVB-induced apoptosis by apigenin in human keratinocytes and organotypic keratinocyte cultures. **Cancer Res.**, v.68, n.8, p. 3057-3065, 2008.

AGARWAL, R.; KATIYAR, S.K.; KHAN, S.G.; MUKHTAR, H. Protection against ultraviolet B radiation-induced effects in the skin of SKH-1 hairless mice by a polyphenolic fraction isolated from green tea. **Photochem. Photobiol.**, v. 58, n. 5, p. 695-700, 1993.

ALBERTON, J.R.; RIBEIRO, A.; SACRAMENTO, L.V.S.; FRANCO, S.L.; LIMA, M.A.P. Caracterização farmacognóstica do jambolão (*Syzygium cumini* (L.) skulls). **Rev. Bras. Farmacog.**, v.11, n.1, p.37-50, 2001.

ALEXANDRIDIS, P.; OLSSON, U.; LINDMAN, B. A record nine different phases (four cubic, two hexagonal, and one lamellar lyotropic liquid crystalline and two micellar solutions) in a ternary isothermal system of an amphiphilic block copolymer and selective solvents (water and oil). **Langmuir**, v.14, p.2627-2638, 1998.

ALMEIDA, R.L.; DA SILVA, V.V.; RIVELLI, D.P.; MIRANDA, D.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B.M.; ROPKE, C.D. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteinases 2 e 9 na pele. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 44, n. 1, p.43-50, 2008.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. **Cerrado**: espécies vegetais úteis. Distrito federal: EMBRAPA-CPAC, 1998. p.38-39.

AMES, B.N.; GOLD, L.S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutat. Res.**, v.250, p. 3-16, 1991.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **B. CEPPA Curitiba**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANVISA. **Resolução-RE N° 899**, de 29 de maio de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: nov. 2010.

ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**, 2004. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm. Acesso em: nov. 2010.

AUGUSTIN, C.; FREI, V.; PERRIER, E.; COLLOMBEL, C.; DAMOUR, O. Cellular engineering for cosmetology trials: dermal equivalent for determining cutaneous irritation and efficiency. ANNUAL INTERNATIONAL CONFERENCE OF THE IEEE ENGINEERING IN MEDICINE AND BIOLOGY SOCIETY.18., Amsterdam, 1996 7.7.1: Cellular Engineering.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, v.99, p.191-203, 2006.

BARRY, B.W.; WARBURTON, B. Some rheological aspects of cosmetics. **J. Soc. Cosmetic Chem.**, v.19, p.725-744, 1968.

BARTSCH, H.; HIROSHI, O.; PIGNATELLI, B. Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanisms and implications in human cancer prevention. **Mutat. Res.**, v.202, p.307-324, 1988.

BEDONI, M.; SFORZA, C.; DOLCI, C.; DONETTI, E. Proliferation and differentiation biomarkers in normal human breast skin organotypic cultures. **J. Dermatol. Sci.**, v.46, n.2, p.139-142, 2007.

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.

BIRCH-MACHIN, M.A.; SWALWELL, H. How mitochondria record the effects of UV exposure and oxidative stress using human skin as a model tissue. **Mutagenesis**, v. 25, n. 2, p. 101–107, 2010.

BLANK, I. H. Transport across the stratum corneum. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, suppl. 3, p. 23-29, 1969.

BODDE, H.E. Evaluation of cosmetic effects' on living human skin. In: SKIN CARE Forum 13. CHASSAING, F.; RAABE, K.; WALLAT, S.(Ed). Dusseldorf: Henkel KgaA, 1995.p. 4-9.

BORGES, C.D.; VENDRUSCOLO, C.T.; MARTINS, A.L.; LOMBA, R.F.T. Comportamento reológico de xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni para aplicação em fluido de perfuração de poços de petróleo. **Polímeros: ciência e tecnologia**, v. 19, n. 2, p. 160-165, 2009.

BOTHAM, P.A.; EARL, L.K.; FENTEM, J.H.; ROGUET, R.; VAN DE SANDT, J.J.M. Alternative methods for skin irritation testing: The current status. **ATLA-Altern. Lab. Anim.**, n.26, p.195-211, 1998.

BRASH, D. E. Sunlight and the onset of skin cancer. **Trends Genet.**, v.13, p.410–414, 1997.

BRUGGINSSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, p. 445-448, 2002.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Annu. Rev. Biochem.**, v.58, p.79-110, 1989.

CID, E.C. **Cinética de dissolução de medicamentos**. Washington: Organización de los Estados Americanos, 1981. 102 p.

CÓRDOVA, K.R.V.; GAMA, T.M.M.T.B.; WINTER, C.M.G.; KASKANTZIS NETO, G.; DE FREITAS, R.J.S. Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* degener) obtida por secagem. **B. CEPPA Curitiba**, v.23, n.2, p. 221-230, 2005.

DAVIS, H.M. Analysis of creams and lotion. In: **Newburguer's manual of cosmetic analysis**. Washington: Association of Official Analytical Chemists, Senzel, AJ, 1977. p.32.

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**, 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.

ELIAS, P.M.; FRIEND, D.S. The permeability barrier in mammalian epidermis. **J. Cell Biol.**, v.65, p. 180-191, 1975.

ENGELS, T.; FÖRSTER, T.; VON RYBINSKI, W. The influence of coemulsifier type on the stability of oil-in-water emulsions. **Colloids Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.99, p.141-149, 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.

ETCHEVERRY, S.B.; FERRER, E.G.; NASO, L.; RIVADENEIRA, J.; SALINAS, V.; WILLIAMS, P.A. Antioxidant effects of the VO(IV) hesperidin complex and its role in cancer chemoprevention. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v.13, n.3, p.435-447, 2008.

FALCÃO, D.Q.; COSTA, E.R.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; KUSTER, R.M.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.16, p.73-76, 2006.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Z.S.; PÁLINKÁS, J.; MARTON, S.; RÁCZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. **Int. J. Pharm.**, v.193, p.239-245, 2000.

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

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.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 9.ed. São Paulo, SP: Atheneu, 2003. 307p.

FRIEDMAN, D.I.; SCHWARZ, J.S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Pharm. Sci.**, v. 84, p.324-329, 1995.

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.

GALLEGOS, C.; FRANCO, J.M. Rheology of food, cosmetics and pharmaceuticals. **Curr. Opin. Colloid & Interface Sci.**, v.4, p.288-293, 1999.

HANSON, K.M.; SIMON, J.D. Epidermal trans-urocanic acid and the UVA induced photoaging of the skin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10576–10578, 1998.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, p.572-584, 2002.

HEISE, R.; MEY, J.; NEIS, M.M.; MARQUARDT, Y.; JOUSSEN, S.; OTT, H.; WIEDERHOLT, T.; KURSCHAT, P.; MEGAHED, M.; BICKERS, D.R.; MERK, H.F.; BARON, J.M. Skin retinoid concentrations are modulated by CYP26A1 expression restricted to basal keratinocytes in normal human skin and differentiated 3D skin models. **J. Invest. Dermatol.**, v.126, n.11, p.2473-2480, 2006.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL, M.M. **Manual de cosmetologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.

HIRUMA-LIMA, C.A.; SANTOS, L.C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C.H.; SILVEIRA, G.G.; VASCONCELOS, P.C.P.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A.R.M., *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medical plant presents an important antiulcer activity. **J. Ethnopharmacol.**, v.104, p. 207-214, 2006.

HRYNTSEVICH, I.B.; SHADYRO, O.I. Reactions of α -hydroxyethyl radicals with flavonoids of various structures. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.15, p.4252-4255, 2005.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

IEA Instituto de Economia Agrícola. Disponível em <ftp://ftp.sp.gov.br/ftpiea/publicacoes/ie/2010/tec6-0910.pdf>. Acesso em: out. 2010.

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.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.; CORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.**, v. 29, n.1, p. 85-100, 2008.

IWASHINA, T.; BENITEZ, E.R.; TAKAHASHI, R. Analysis of flavonoids in pubescence of soybean near-isogenic lines for pubescence color loci. **J. Heredity**, v.97, n.5, p.438–443, 2006.

JEON, O.; KANG, S.; LIM, H.; CHUNG, J.H.; KIM, B. Long-term and zero-order release of basic fibroblast growth factor from heparin-conjugated poly (L-lactide-co-glycolide) nanospheres and fibrin gel. **Biomaterials**, v.27, p.1598–1607, 2006.

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

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 359-365.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v.47, p.3954-3962, 1999.

KIM, B.J.; KIM, J.H.; KIM, H.P.; HEO, M.Y. Biological screening of 100 plant extracts for cosmetic use (II): anti-oxidative activity and free radical scavenging activity. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.19, p.299–307, 1997.

KRAEMER, K. H. Sunlight and skin cancer: another link revealed. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p. 11–14, 1997.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAVKER, R.M.; VERES, D.A.; IRWIN, C.J.; KAIDBEY, K.H. Quantitative assessment of cumulative damage from repetitive exposures to suberythemogenic doses of UVA in human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.62, p.348–352, 1995.

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.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, suppl, p.517S–20S, 2003.

LIVNY, O.; KAPLAN, I.; REIFEN, R.; POLAK-CHARCON, S.; MADAR, Z.; SCHWARTZ, B. Oral cancer cells differ from normal oral epithelial cells in tissue like organization and in response to lycopene treatment: an organotypic cell culture study. **Nutr. Câncer**, v.47, n.2, p.195-209, 2003.

MADISON, K.C. Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. **The J. Investigative Dermatol.**, v. 121, n. 2, p. 231-241, 2003.

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

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, Z.S.; PÁLINKÁS, J.; ERÓS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v.256, p.95–107, 2003.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. **Pharmacognosy Reviews**, v.1, n.1, p.7-18, 2007.

MARONA, H.R.N. Princípios éticos na experimentação animal. **Rev. Ciênc. Farm.**, v.24, n.2, p.97-105, 2003.

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

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

MARSH, H. Carbonization and liquid-crystal (mesophase) development: Part 1. The significance of the mesophase during carbonization of coking coals. **Fuel**, v.52, p. 205-212, 1973.

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.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Short-term and long-term cellular and molecular events following UV irradiation of skin: implications for molecular medicine. **Expert Rev. Mol. Med.**, v.2, p.1-22, 2002.

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

MEDINA, J.; BRUGEROLLE DE FRAISSINETTE, A.; CHIBOUT, S.; KOLOPP, M.; KAMMERMANN, R.; BURTIN, P.; EBELIN, M.; CORDIER, A. Use of human skin equivalent apligraf for in vitro assessment of cumulative skin irritation potential of topical products. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 164, n.38-45, 2000.

MEDINA M. L. B.; PAGANO F.G. Characterization of guava pulp (*Psidium guajava* L.) “Criolla Roja”. **Rev. Fac. Agron.**, v.20, p.72-86, 2003.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.44, n.2, 2008a.

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.

MENDONÇA, C.C.; SILVA, I.C.L.; RODRIGUES, K.A.; CAMPOS, M.A.L.; MEDEIROS, M.C.M.; CASTELI, V.C.; FERRARI, M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação *in vitro*. **Rev. Cienc. Farm. Basica Apl.**, v.30, n.1, p.26-37, 2009.

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

MICHAEL, H.N.; SALIB, J.Y.; ISAAC, M.S. Acylated flavonol glycoside from *Psidium guajava* L. seeds. **Pharmazie**, v.57, p.859–860, 2002.

MIEAN, K.H.; MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.3106-3112, 2001.

MILAN, A.L.K.; MILÃO, D.; SOUTO, A.A.; CORTE, T.W.F. Estudo da hidratação da pele por emulsões cosméticas para xerose e sua estabilidade por reologia. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 43, n. 4, p.649-657, 2007.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chem.**, v.85, p.231–237, 2004.

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.; 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.

MOADDEL, T.; FRIBERG, S.E. Phase equilibria and evaporation rates in a four component emulsion. **J. Disp. Sci. Techno.**, v.16, p.69-97, 1995.

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

MONTEIRO, L.M.; SOUZA, A.E.; GIANOTTO, E.A.S.; NERY, M.M.F.; DUARTE, J.C.; FREITAS, O.; CASAGRANDE, R.; BARACAT, M.M. Comprimidos matriciais preparados com hidroxipropilmetilcelulose e pectina contendo quercetina para liberaçãõ cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179-184, 2007.

MONTEIRO, S. Esperança das goiabas. **Rev. Frutas Derivados**, n. 3. p. 27–30, 2006.

MORAIS, G.G.; SANTOS, O.D.H.; MASSON, D.S.; OLIVEIRA, W.P.; ROCHA FILHO, P.A. Development of O/W emulsions with annato oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v.26, n.5, p.591-596, 2005.

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

MUKHOPADHYAY, S.; LUTHRIA, D.L.; ROBBINS, R.J. Optimization of extraction process for phenolic acids from black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) by pressurized liquid extraction. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.156–162, 2006.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, p.343–356, 2004.

OECD-ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document for the conduct of skin absorption studies, n.28, Paris, 2004.

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

PRIOR, R.L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, suppl, p.570S–8S, 2003.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **Hortic. Sci.**, v.35, p.588-592, 2000.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. p.600.

PROENÇA DA CUNHA, A.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004, p.49, 50 e 54.

PRUNIERAS, M. **Manual de cosmetologia dermatológica**. 2. ed. São Paulo: Editora Andrei, 1994.

RABACHINI, T. Efeito da rapamicina em culturas organotípicas de queratinócitos que expressam oncoproteínas de papilomavírus humano tipo 16. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. 148f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RANDAU, K.P.; MEIRA, J.L.; FARIAS BRAGA, J.M.; MONTEIRO, D.B.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação analítica para anti-retroviral zidovudina (AZT) - Matéria-Prima. **Acta Farm. Bonaer.**, v. 24, n. 1, p. 104-108, 2005.

RENARD, C.M.G.C.; VORAGEN, A.G.J.; THIBAUT, J-E.; PILNIK, W. Studies on apple protopectin. IV: apple xyloglucans and influence of pectin extraction treatments on their solubility. **Carbohydrate Polymers**, v.15, p.387-403, 1991.

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.

ROPKE, C.D.; SAWADA, T.C.; SILVA, V.V.; MICHALANY, N.S.; BARROS, S.B.M. Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* root extract against ultraviolet radiation induced chronic skin damage in the hairless mouse. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.30, p. 272-276, 2005.

ROSA, M.P. La domanda di olio d'oliva. **Olivae**, v. 63, p.24, 1996.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; DE MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **Comunicado Técnico on line (EMBRAPA)** n.128, 2007.

SALIB, J.Y.; MICHAEL, H.N. Cytotoxic phenylethanol glycosides from *Psidium guajava* seeds. **Phytochemistry**, v.65, p.2091–2093, 2004.

SANCTIS, D.S. Emulsões aspectos técnicos e práticos para o desenvolvimento de formulações. **Rev. Racine**, p.51, 2000.

SASAKI, H.; KOJIMA, M.; MORI, Y.; NAKAMURA, J.; SHIBASAKI, J.; Enhancing effect of pyrrolidone derivatives on transdermal penetration of 5- fluorouracil, triamcinolona, acetone, indomethacin and flubiprofen. **J. Pharm. Sci.**, v. 80, n. 6, p. 533-538, 1991.

SCHARFETTER-KOSHANEK, K.; Wlaschek, M.; Brenneisen, P.; Schauen, M.; Blandschun, R.; Wenk, J. UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging, **Biol. Chem.**, v. 387, n.11, p.1247–1257, 1997.

SCHESHOWITSCH, K.; PEREIRA, A.; CRUZ, A.; SILVA, M. A. S.; STULZER, H. K. Avaliação da qualidade e perfil de dissolução de cápsulas manipuladas de Piroxicam. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 26, n. 5, p. 645-51, 2007.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2. ed. São Paulo: Artliber, 2006.

SHAH, J. Analysis of permeation data: evaluation of lag time method. **Int. J. Pharm.**, v.90, p.161–169, 1993.

SILVA, E.L. DA; PISKULA M.K; YAMAMOTO, N.; MOON, J.H; TERAQ, J. Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Lett.**, v.430, p.405-408, 1998.

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.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.16, p.144-158, 1965.

SHOUQIN, Z.; JUN, X.; CHANGZHENG, W. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from própolis. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v.80, p.50–54, 2005.

SOUSA, P.H.M.; MAIA, G.A.; SOUZA FILHO, M.S.M.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUZA, A.C.R. Goiabas desidratadas osmoticamente seguidas de secagem em estufa. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 25, n. 3, p. 414-416, 2003.

TASCA, A.P.W. Efeito do processamento industrial para obtenção de goiabada sobre os compostos antioxidantes e cor. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2007. 121f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

TAUBER, U.; TODA, T. Biotransformation von Diflucortolon valerate in der Haut von Ratte. **Arzneim- Forsch.**, v. 26, n. 7b, p. 1484-1487, 1976.

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutrition**, v.15, p.790- 791, 1999.

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

VICENTINI, F.T.M.C.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR., W.A.; GEORGETTI, S.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Quercetin in lyotropic liquid crystalline formulations: physical, chemical and functional stability. **AAPS PharmSciTech.**, v. 9, n. 2, p.591-596, 2008.

VIRAVAIIDYA, K.; SIN, A.; SHULER, M.L. Development of a microscale cell culture analog to probe naphthalene toxicity. **Biotechnol. Prog.**, v.20, p.316-323, 2004.

WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends Food Scie Technol.**, v.17, p.300–312, 2006.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **J Agric. Food Chem.**, v.48, n.2, p.140-146, 2000.

WILKINSON, J.B.; MOORE, R.J. **Cosmetología de Harry**. Madri: Ediciones Díaz Santos, 1990.

WILMS, L.C.; HOLLMAN, P.C.H.; BOOTS, A.W.; KLEINJANS, J.C.S. Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. **Mutation Res.**, v.582, p.155–162, 2005.

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.

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

ZISHEN, H.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chem.** v.64, p.555-559, 1999.