

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JULIO DE MESQUITA FILHO"

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

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE UM SISTEMA  
EMULSIONADO CONTENDO EXTRATO DE *Ascophyllum nodosum*

Maria Gabriela José de Almeida

ORIENTADOR: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E SEGURANÇA DE UM SISTEMA  
EMULSIONADO CONTENDO EXTRATO DE *Ascophyllum nodosum*

Maria Gabriela José de Almeida

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 de Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Chung Man Chin

CO-ORIENTADOR: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2013

## **Ficha Catalográfica**

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

A447a Almeida, Maria Gabriela José de  
Avaliação da eficácia e segurança de um sistema emulsionado contendo extrato de *Ascophyllum nodosum* / Maria Gabriela José de Almeida. – Araraquara, 2013  
119 f.

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

Orientador: Chung Man Chin

Coorientador: Vera Lucia Borges Isaac

1. *Ascophyllum nodosum*. 2. Cosmético. 3. Desenvolvimento, eficácia e segurança. 4. I. Chung Man Chin, orient. II. Isaac, Vera Lucia Borges, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

## Dedicatória

A Deus, pela minha vida!

Aos meus pais, em especial a minha mãe Heloisa que sempre esteve ao meu lado me dando força e carinho não medindo esforços para que eu pudesse tornar-me quem eu sou e atingir meus objetivos, sendo meu exemplo de vida e meu porto seguro.

Muito obrigada por tudo!

À minha avó Vera que participou de toda minha caminhada até aqui sempre me dando muito carinho.

Ao meu namorado Fernando que esteve comigo em mais esta etapa ajudando-me sempre que preciso, tendo paciência e me dando apoio para chegar até aqui.

Muito obrigada por estar sempre ao meu lado!

A todos os meus familiares e amigos que de alguma maneira estiveram presentes em minha vida trazendo alegrias durante este período.

## **Agradecimentos**

À profa. **Dra. Vera Lucia Borges Isaac** que abriu as portas do Laboratório de Cosmetologia, me orientou durante um período de estágio e neste trabalho e se tornou, além de orientadora, uma amiga.

À profa. **Dra. Chung Man Chin** que, por um gesto de amizade, mesmo sem me conhecer aceitou que eu fosse sua aluna e possibilitou que este trabalho fosse realizado.

Ao prof. **Dr. Marcos Antonio Corrêa** pelos ensinamentos, pela contribuição nas bancas de qualificação e defesa e pela amizade.

A **Capex** (Coordenação de Aperfeiçoamento Profissional de Nível Superior) pela bolsa de estudos concedida.

À **Campo & Flores Comércio de Insumos Agrícolas** pela doação do extrato de *Ascophyllum nodosum*.

Ao **PADC – Programa de Apoio ao Desenvolvimento Científico – da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP** pelo apoio financeiro.

Ao **Laboratório Nacional de Luz Síncroton (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, Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos, Profa. Dra. Leila Ap. Chiavacci, Profa. Dra. Maria Palmira Daflon Gremião, Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa, Profa. Dra. Regina Maria Barreto Cicarelli por permitirem a utilização de seus laboratórios, cederem materiais, equipamentos ou ensinamentos que colaboraram para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao **Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho** e a **Profa. Dra. Helena Margarida Ribeiro** por colaborarem para o enriquecimento deste trabalho participando das bancas de qualificação e defesa.

---

Maria Gabriela José de Almeida

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: **Claúdia, Márcia, Daniela, Joyce, Fátima, Eduardo, Margarete, Mateus, Queila, Bete, Valéria** por estarem sempre prontos a ajudar.

A todos os **amigos do Laboratório de Cosmetologia e de república**: Amanda, Ana Carolina, Ana Paula, Ana Paula Zambon, Bruna, Camila, Carol, Daniele, Danila, Fernanda, Gisele, Guilherme, Ilza, José Ricardo, Nathália, Paula e Stefany, por toda a amizade, risadas, ajudas e companheirismo, muitos mesmo não estando mais presentes no laboratório.

E a todos os amigos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos que não são da Faculdade também!

**Muito obrigada a todos!**

## SUMÁRIO

RESUMO.....	12
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO.....	14
REVISÃO DA LITERATURA .....	16
A pele.....	16
Epiderme .....	17
Derme.....	17
Hipoderme (Tecido subcutâneo).....	18
Envelhecimento cutâneo.....	18
Hiperpigmentação cutânea .....	21
Melanogênese .....	21
Hiperchromia .....	24
Agentes despigmentantes.....	25
<i>Ascophyllum nodosum</i> .....	28
Avaliação da eficácia e segurança de cosméticos .....	30
OBJETIVOS.....	32
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
MATERIAL/EQUIPAMENTOS .....	33
MÉTODOS.....	34
1. Caracterização do extrato de <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	34
1.1. Doseamento de compostos fenólicos totais .....	34
1.2. Doseamento de flavonoides .....	34
1.3. Determinação da atividade antioxidante .....	35
1.3.1. Método de inibição do radical DPPH .....	35
1.3.2. Método de inibição do radical ABTS .....	36
1.4. Determinação da atividade inibidora de tirosinase .....	36
2. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de <i>A. nodosum</i> em células HepG2 e HaCat ..	37
3. Validação da metodologia de quantificação pelo método de inibição do radical ABTS .....	39
3.1. Linearidade .....	39
3.2. Exatidão .....	39
3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).....	40

3.4. Precisão .....	40
3.5. Especificidade e Seletividade .....	41
3.6. Robustez.....	41
3.7. Curva analítica com solvente diferente.....	42
4. Preparo das formulações.....	42
5. Caracterização reológica das formulações base e fitocosmética .....	43
6. Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas nas formulações base e fitocosmética.....	44
7. Avaliação do perfil de liberação do extrato de <i>A. nodosum</i> .....	45
8. Estabilidade físico química das formulações base e fitocosmética .....	45
9. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética.....	46
10. Análise estatística dos resultados .....	46
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
1. Caracterização do extrato de <i>Ascophyllum nodosum</i> .....	47
1.1. Doseamento de compostos fenólicos totais .....	47
1.2. Doseamento de flavonoides .....	50
1.3. Determinação da atividade antioxidante .....	51
1.3.1. Método de inibição do radical DPPH .....	51
1.3.2. Método de inibição do radical ABTS .....	54
1.3.3. Comparação da atividade antioxidante pelos métodos de inibição do radical DPPH e do radical ABTS .....	56
1.4. Determinação da atividade inibidora de tirosinase .....	57
2. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de <i>A. nodosum</i> em células HepG2 e HaCat ..	59
3. Validação da metodologia de quantificação pelo método de inibição do radical ABTS .....	63
3.1. Linearidade .....	63
3.2. Exatidão .....	66
3.3. Limite de detecção e quantificação.....	66
3.4. Precisão.....	67
3.4.1. Repetitividade ou precisão intra-corridas .....	68
3.4.2. Precisão intermediária ou precisão inter-corridas.....	68
3.4.3. Reprodutibilidade.....	69
3.5. Especificidade e Seletividade .....	70
3.6. Robustez.....	71



3.7. Curva analítica com solvente diferente.....	71
4. Preparo das formulações.....	72
5. Caracterização reológica das formulações base e fitocosmética .....	74
6. Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas nas formulações base e fitocosmética.....	84
7. Avaliação do potencial de liberação do extrato de <i>A. nodosum</i> .....	88
8. Avaliação da estabilidade físico química das formulações base e fitocosmética.....	91
9. Avaliação “ <i>in vitro</i> ” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética.....	99
CONCLUSÃO.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da pele humana (Adaptado Wolk et al., 2010).....	16
Figura 2. Representação esquemática da penetração da radiação ultravioleta na pele (Adaptado de www.afh.bio.br).....	20
Figura 3. Representação esquemática das etapas da melanogênese (Adaptado de Prota, 1980). .....	23
Figura 4. Estrutura molecular da hidroquinona.....	26
Figura 5. Estrutura molecular do ácido kójico.....	27
Figura 6. <i>Ascophyllum nodosum</i> (Guiry, 2012).....	28
Figura 7. Distribuição geográfica de <i>Ascophyllum nodosum</i> (Guiry, 2012).....	29
Figura 8. Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do extrato de <i>Ascophyllum nodosum</i> (Adaptado de Chiari et al, 2012a).....	38
Figura 9. Curva analítica do ácido gálico.....	48
Figura 10. Curva analítica da quercetina.....	50
Figura 11. Curva analítica do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH.....	51
Figura 12. Curva analítica das soluções do extrato de <i>A. nodosum</i> pelo método de inibição do radical DPPH.....	52
Figura 13. Curva analítica do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical ABTS.....	55
Figura 14. Curva analítica das soluções do extrato de <i>A. nodosum</i> pelo método de inibição do radical ABTS.....	55
Figura 15. Estrutura química dos radicais DPPH e ABTS.....	57
Figura 16. Perfil de inibição de tirosinase pelo extrato de <i>A. nodosum</i> .....	58
Figura 17. Perfil dose-resposta para as células HaCat após tratamento com diferentes concentrações de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	60
Figura 18. Perfil dose-resposta para as células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	61
Figura 19. Perfil dose-resposta para as células HaCat após tratamento com diferentes concentrações de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	62
Figura 20. Perfil dose-resposta para as células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	62
Figura 21. Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método.....	64
Figura 22. Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método.....	64
Figura 23. Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método.....	65
Figura 24. Média das três curvas para avaliação da linearidade do método.....	65
Figura 25. Curva analítica para quantificação de extrato de <i>A. nodosum</i> utilizando como solvente mistura etanol:água (8:2).....	72

Figura 26. Curvas de fluxo das formulações F3 base e F4 base.....	75
Figura 27. Curvas de fluxo F3 base e F3 fito. ....	75
Figura 28. Curvas de fluxo F4 base e F4 fito. ....	76
Figura 29. Curvas de fluxo F3 fito e F4 fito. ....	76
Figura 30. Varredura de tensão F3 base e F3 fito, respectivamente.....	78
Figura 31. Varredura de tensão F4 base e F4 fito, respectivamente.....	78
Figura 32. Varredura de frequência F3 base e F3 fito, respectivamente. ....	79
Figura 33. Varredura de frequência F4 base e F4 fito, respectivamente.....	79
Figura 34. Fluência e Relaxação F3 e F4 base (1 Pa).....	81
Figura 35. Fluência e Relaxação F3 base e fito (1 Pa). ....	81
Figura 36. Fluência e Relaxação F4 base e F4 fito (1 Pa). ....	82
Figura 37. Fluência e Relaxação F4 base e F4 fito (3 Pa). ....	82
Figura 38. Fotomicrografias de F3 base e fito e F4 base e fito (200X). ....	85
Figura 39. Gráfico de SAXS para a formulação F3 base e fito. ....	86
Figura 40. Gráfico de SAXS para a formulação F4 base e fito. ....	86
Figura 41. Perfil de liberação das formulações F3 fito e F4 fito nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.....	89
Figura 42. Quantidade de extrato de <i>A. nodosum</i> liberada por unidade de área (cm <sup>2</sup> ).....	90
Figura 43. Perfil cinético de liberação da formulação F4 fito. ....	91
Figura 44. Valores de pH para formulação base em diferentes condições de armazenagem durante o período de 90 dias.....	92
Figura 45. Valores de pH para o fitocosmético em diferentes condições de armazenagem durante o período de 90 dias.....	93
Figura 46. Valores de densidade relativa da formulação base exposta a diferentes condições de armazenagem em 90 dias.....	95
Figura 47. Valores de densidade relativa do fitocosmético exposto a diferentes condições de armazenagem em 90 dias.....	95
Figura 48. Porcentagem de extrato de <i>A. nodosum</i> no fitocosmético durante 90 dias. ....	97
Figura 49. Concentração do extrato de <i>A. nodosum</i> contido no fitocosmético nas diferentes condições de armazenagem durante 90 dias.....	98
Figura 50. Perfil de absorção do extrato de <i>A. nodosum</i> (50 mg/L) na região do UVB e UVA (260-400 nm). ....	100
Figura 51. Fator de proteção máximo (FPM) para cada formulação avaliada em relação ao comprimento de onda. ....	101

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição percentual das formulações.....	43
Tabela 2. Valores de absorbância obtidos para o extrato de <i>A. nodosum</i> na determinação de compostos fenólicos totais.....	47
Tabela 3. Teor de compostos fenólicos de diferentes espécies de algas. ....	49
Tabela 4. Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação do extrato de <i>A. nodosum</i> .....	66
Tabela 5. Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> . ....	67
Tabela 6. Avaliação da repetitividade do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	68
Tabela 7. Avaliação da precisão intermediária do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> . ....	69
Tabela 8. Avaliação da reprodutibilidade do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> . ....	70
Tabela 9. Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	70
Tabela 10. Avaliação da robustez do método analítico para determinação de extrato de <i>A. nodosum</i> .....	71
Tabela 11. Média e desvio padrão da área de histerese das formulações.....	77
Tabela 12. Viscosidade mínima aparente (Pa.s).....	78
Tabela 13. Valor inicial médio de G' e G'' (Pa) e desvio padrão para a formulação base e fito. ....	80
Tabela 14. Porcentagem de recuperação das amostras.....	83
Tabela 15. Valor máximo de compliância (1/Pa) das formulações.....	83
Tabela 16. Valores dos picos de refração e distância entre os objetos espalhadores. ....	87
Tabela 17. Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos fitocosméticos.....	90
Tabela 18. Valores médios de pH e desvio padrão para formulação base exposta a armazenamento durante os 90 dias.....	93
Tabela 19. Valores médios de pH e desvio padrão para o fitocosmético exposto a armazenamento durante os 90 dias.....	94

Tabela 20. Valores médios de densidade relativa e desvio padrão para formulação base durante 90 dias de armazenamento.....	96
Tabela 21. Valores médios de densidade relativa e desvio padrão para o fitocosmético exposto a armazenamento durante os 90 dias. ....	96
Tabela 22. Média da concentração do extrato de <i>A. nodosum</i> contido no fitocosmético nas diferentes condições de armazenagem durante 90 dias. ....	98
Tabela 23. Valores de FPS obtidos pela metodologia de espectrofotometria de reflectância no Optometrics SPF 290.....	101

## RESUMO

A tendência atual na indústria cosmética é o desenvolvimento de produtos multifuncionais, ou seja, aqueles com capacidade de apresentar diferentes funções, possibilitando diferentes resultados para o consumidor. Seguindo esta tendência, ativos naturais são alternativas interessantes como substitutos a um único composto ativo, uma vez que são matrizes complexas e apresentam diversos componentes que podem possuir diferentes mecanismos de ação e, assim, conferir ao produto mais de uma função. Por este motivo, nos últimos anos o uso de extratos naturais tem crescido muito nesta área. Com o aumento da aplicação de extratos naturais em produtos cosméticos, há também a necessidade de estudos que comprovem sua eficácia e segurança. Uma das principais funções buscadas em produtos cosméticos é a ação antienvelhecimento, ou seja, a capacidade dos produtos em atuar neutralizando radicais livres. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia e segurança do extrato de *Ascophyllum nodosum*, além de desenvolver um sistema emulsionado para sua incorporação e verificar a eficácia deste sistema. Os resultados de citotoxicidade mostraram que este extrato pode ser utilizado com segurança na concentração proposta (1,2% m/m). Além disso, foi avaliado, por metodologias *in vitro*, o potencial antioxidante e o potencial de inibir a atividade da tirosinase, sendo verificado que o extrato de *A. nodosum* apresenta a capacidade de atuar neutralizando radicais livres e inibindo a atividade enzimática da tirosinase no processo de melanogênese. Apesar de serem necessários estudos complementares para garantir a eficácia, o fitocosmético desenvolvido com o extrato aquoso de *A. nodosum* apresenta enorme potencial de aplicação podendo resultar em preparações cosméticas multifuncionais.

**Palavras-chave:** *Ascophyllum nodosum*, cosmético, desenvolvimento, eficácia e segurança, fitocosmético.

## ABSTRACT

The current trend in the cosmetic industry is the development of multifunctional products, or, those with the ability to have different functions, facilitating the results to the consumer. Following this trend, natural actives are interesting alternatives as substitutes for a single active compound, since they are complex matrices and present various components that may have different mechanisms of action and thereby give the product more than one function. For this reason, in recent years the use of natural extracts has grown a lot in this area. With the increased use of natural extracts in cosmetic products, there is also a need for studies to prove its effectiveness and safety. A major function is sought in cosmetic anti-aging action, for instance, the ability of the products act by neutralizing free radicals. In this context, the aim of this study was to evaluate the effectiveness and safety of the extract of *Ascophyllum nodosum*, and develop a system for incorporation emulsified and verify the effectiveness of this system. The results of cytotoxicity have shown that this extract can be safely used in the proposed concentration (1.2% w/w). Furthermore, it was evaluated by in vitro methods, the antioxidant potential and the potential to inhibit the activity of tyrosinase, and found that the extract of *A. nodosum* has the ability to act by neutralizing free radicals and inhibiting the enzymatic activity of tyrosinase in the process of melanogenesis. Although additional studies are needed to ensure effectiveness, phytocosmetic developed with aqueous extract of *A. nodosum* has enormous potential application may result in multifunctional cosmetic preparations.

**Key-words:** *Ascophyllum nodosum*, cosmetic, development, security and safety, phytocosmetic.

## INTRODUÇÃO

A palavra cosmético teve sua origem a partir da palavra grega “*kosmein*” que tem como significado enfeitar, adornar, ornamentar, glorificar, homenagear. Antigamente, as preparações cosméticas estavam relacionadas apenas a enfeitar e, por definição, eram preparações destinadas a conservar a beleza da pele e cabelo (Corrêa, 2012).

Considerando esta definição, a cosmetologia era tratada como arte e não como ciência. Com o passar dos anos, esta “arte” começa a ter caráter científico e comprovações, antigamente desnecessárias, começam a ser fonte de pesquisas.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) produtos cosméticos não podem modificar as funções naturais da pele e não apresentam efeitos farmacológicos. Entretanto, por tratar-se de uma ciência é necessária a comprovação de seus benefícios, uma vez que produtos cosméticos podem apresentar multifuncionalidade (ANVISA, 2003a).

Devido à necessidade de comprovação da efetividade de ativos cosméticos, novos produtos e os já utilizados devem ser avaliados quanto à atividade proposta. Por exemplo, para produtos antienvelhecimento, a capacidade de diminuir os danos causados à pele, por radicais livres que aceleram o processo de envelhecimento cutâneo, deve ser comprovada cientificamente.

O processo de envelhecimento cronológico cutâneo é causado por reações de oxidação e enzimáticas, que geram radicais livres em nosso organismo. Para combater estes danos, o próprio organismo possui um sistema de proteção antioxidante, capaz de atuar neutralizando os radicais livres formados e, assim, manter um ritmo constante de envelhecimento. Porém, fatores extrínsecos como dieta alimentar deficiente em nutrientes, poluição e, principalmente, a exposição à radiação ultravioleta, são capazes de aumentar a quantidade de radicais livres e gerar um estresse oxidativo acelerando o processo de envelhecimento.

Além disso, a exposição excessiva à radiação ultravioleta sem proteção pode causar hiperpigmentação da pele provocando o aparecimento de manchas que, se não tratadas adequadamente, podem tornar-se permanentes.

A tendência atual é o desenvolvimento de cosméticos multifuncionais, ou seja, produtos com mais de uma função facilitando resultados ao consumidor.

Ativos naturais são interessantes no desenvolvimento desta categoria de produtos cosméticos devido à diversidade na composição química, que podem apresentar diferentes



mecanismos de ação e, assim, conferir mais de uma função ao produto desenvolvido. Por esse motivo, o uso de extratos naturais tem crescido muito nos últimos anos.

Pesquisas recentes têm mostrado que substâncias bioativas são encontradas em extratos de algas pertencentes à ordem *Fucales* (Audibert et al., 2010; Jimenez et al., 2010). Desta forma, neste trabalho foi utilizado o extrato de *Ascophyllum nodosum*, espécie de alga marinha marrom pertencente à ordem *Fucales*, para a preparação de um sistema emulsionado sendo avaliada sua eficácia e segurança através do uso de metodologias *in vitro*.

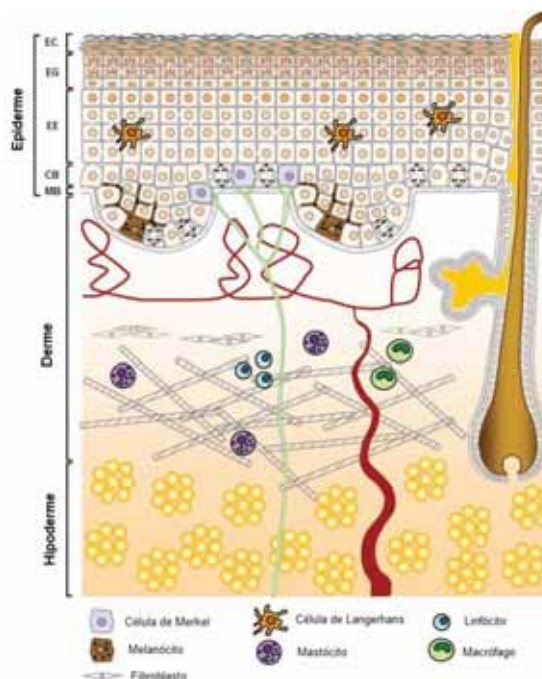
## REVISÃO DA LITERATURA

### A pele

A ciência cosmética tem como objetivo melhorar a aparência da pele ou, pelo menos, prevenir possíveis danos através da utilização de ativos que contribuam para isso, portanto, o conhecimento das estruturas da pele e seu funcionamento são de fundamental importância (Wilkinson & Moore, 1990).

A pele é o maior órgão do corpo humano, correspondendo a aproximadamente 5% do peso corporal total e apresenta variações nos valores de pH e espessura dependendo da região corpórea. Além disso, representa a fronteira ativa entre o organismo e o meio ambiente exercendo várias funções como: percepções sensoriais, regeneração tecidual, proteção contra radiação ultravioleta e contra agentes infecciosos, barreira contra perda de água, aparência individual, além de órgão de identidade pessoal através da impressão digital (Goldsmith, 1990; Spellberg, 2000; Wolk et al., 2010).

A pele é dividida em duas camadas principais: a epiderme (camada externa) e derme (camada interna), além do tecido subcutâneo (hipoderme) (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática da estrutura da pele humana (Adaptado Wolk et al., 2010).

## **Epiderme**

A epiderme é a camada mais externa da pele e é dividida em epiderme viável e estrato córneo. A epiderme viável é constituída de células metabolicamente ativas, é subdividida em quatro camadas principais, também denominadas estrato basal, estrato espinhoso, estrato lúcido (presente apenas nas palmas das mãos e planta dos pés) e estrato granuloso. O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é constituído por corneócitos, células queratinizadas, anucleadas e sem organelas (Corrêa, 2012).

A principal função da epiderme é produzir o estrato córneo para manutenção da hidratação natural da pele e controle de penetração de substâncias externas. Pode ser dito que o estrato córneo funciona como uma barreira que garante a homeostase cutânea, pois é formado por lamelas lipídico proteicas presentes nos espaços extracelulares entre os corneócitos protegendo os tecidos vivos da perda excessiva de água (Madison, 2003; Corrêa, 2012).

Além dos queratinócitos, células epiteliais estratificadas presente em todas as camadas da epiderme, outros tipos de células também constituem a epiderme.

Os melanócitos, presentes no estrato basal, são responsáveis pela síntese de melanina. As células de Merckel, que mantêm contato com fibras nervosas do sistema nervoso central garantem as percepções sensoriais e as células de Langerhans com função imunológica (Wolk et al., 2010).

A renovação epidérmica ocorre pela transição de queratinócitos do estrato basal até o estrato córneo com uma imperceptível descamação. Este ciclo tem duração de aproximadamente 30 dias, sendo necessário um período mais longo em pessoas com mais idade (Corrêa, 2012).

A epiderme é uma camada que não apresenta vascularização, portanto sua nutrição é realizada por difusão de nutrientes através de capilares sanguíneos presentes na derme (Kim et al, 2007).

## **Derme**

A derme é formada por tecido conjuntivo denso constituído de fibras de colágeno, elastina, sais minerais, ácido hialurônico, glicosaminoglicanas e, principalmente, água (20 a

40% da água do corpo). Possui pouca predominância celular sendo constituído basicamente por dois tipos de células: os fibroblastos, responsáveis pela síntese das macromoléculas que compõem a matriz extracelular e as células “migratórias” responsáveis pela defesa do organismo sendo constituintes do sistema imunológico, tais como, linfócitos, macrófagos e mastócitos (Campos, 2010; Corrêa, 2012).

Em função de seus componentes, a derme é dividida em duas partes: derme papilar ou superficial, constituída por fibras finas de colágeno e fibras elásticas organizadas em redes frouxas, fixas à junção dermoepidérmica, capilares sanguíneos e linfáticos que nutrem a epiderme e, derme reticular ou córion formada por fibras onduladas e maiores de colágeno entrelaçadas às fibras elásticas garantindo a sustentação da epiderme (Campos, 2010; Corrêa, 2012).

A espessura da derme aumenta durante a infância e adolescência e, começa a diminuir após os 50 anos. Devido a esta diminuição de espessura é que a pele perde rigidez (Campos, 2010).

### **Hipoderme (Tecido subcutâneo)**

A hipoderme não é considerada uma camada da pele. É um tecido subcutâneo de natureza adiposa, onde os adipócitos estão circundados por tecido conjuntivo frouxo. Possui várias funções: energética, pois através da lipólise libera ácidos graxos; termorreguladora, atuando como isolante térmico conservando a temperatura corporal; e função de proteção mecânica, pois se comporta como amortecedor que atua suavizando traumatismos devido à reserva de gordura (Spellberg, 2000).

### **Envelhecimento cutâneo**

O processo de envelhecimento cutâneo é um fenômeno biológico complexo em nosso organismo (Berra et al., 2006; Mccullough & Kelly, 2006).

O envelhecimento intrínseco, também denominado cronoenvelhecimento, é controlado por fatores genéticos que ocorrem devido à formação de radicais livres por processos do metabolismo celular. Por causa destes processos, alterações histológicas acometem a pele cronoenvelhecida sendo observado que células da camada basal da epiderme apresentam-se

com tamanho e volume modificado e com diminuição da atividade mitótica (50% de aumento no tempo de renovação epidérmica), as células de Langerhans perdem parte de sua capacidade em capturar antígenos diminuindo a função imunológica da pele e, os melanócitos apresentam alterações em sua morfologia sendo inativados, principalmente nos folículos pilosos. Estas alterações acabam por provocar secura, aparecimento de rugas finas, flacidez, entre outras modificações (Engelke et al., 1997; Grewe, 2001; Bhushan et al., 2002; Yaar et al., 2002; Brégégère et al., 2003).

Além disso, um afinamento geral da pele acontece devido à atrofia do estrato espinhoso da epiderme, o achatamento da junção dermo-epidérmica provoca maior fragilidade e a diminuição da circulação da derme com o estreitamento de vasos sanguíneos e linfáticos o que prejudica a nutrição da epiderme e drenagem linfática destes tecidos (Nardin & Guterrides, 1999; Oriá et al., 2003).

Os radicais livres que possuem em sua última camada eletrônica elétrons emparelhados e também livres gerando instabilidade, são os principais responsáveis pelo cronoenvelhecimento. O oxigênio molecular é o principal responsável pela produção destes radicais sendo capaz de formar espécies reativas de oxigênio (EROs), como é o caso do ânion superóxido, ânion hidroxila e peróxido de hidrogênio, e também de reagir com moléculas biológicas causando degradação das mesmas (Halliwell & Gutteridge, 1990).

O funcionamento ideal do organismo está baseado no equilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes, e as células possuem mecanismos de defesa (reações enzimáticas e não enzimáticas) para que este equilíbrio mantenha-se e o processo de envelhecimento cronológico ocorra no momento certo (Liu, 2003).

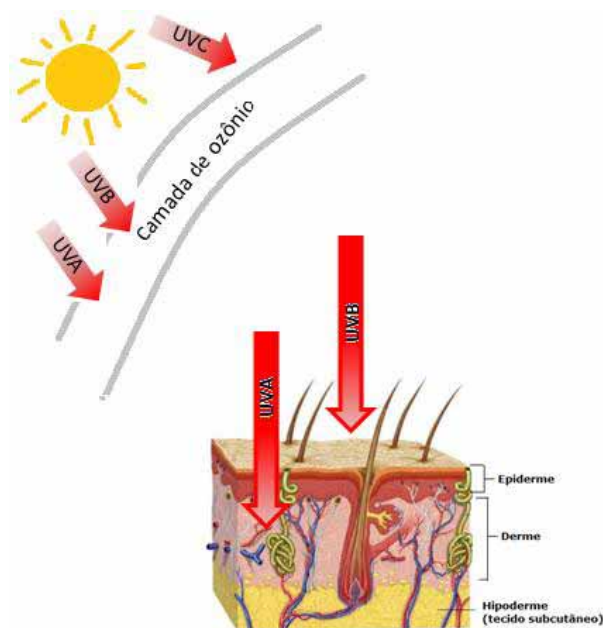
Tratamentos tópicos que utilizem substâncias antioxidantes não podem evitar o cronoenvelhecimento, porém os radicais livres também são os principais responsáveis pelo envelhecimento extrínseco, fotoenvelhecimento, e neste caso o tratamento tópico é eficaz, pois é capaz de diminuir o desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes.

No processo de fotoenvelhecimento são observadas modificações moleculares que induzem as alterações nas propriedades morfológicas e biofísicas da pele causando atrofia da derme com conseqüente redução da biossíntese de colágeno. Este processo é causado pela poluição ambiental, fumo, dieta alimentar pobre em nutrientes benéficos e, principalmente, pela exposição da pele à radiação ultravioleta (Wulf et al., 2004; Berra et al., 2006).

A radiação ultravioleta faz parte do espectro de radiações emitidas pelo sol e é dividida em três classes: radiação ultravioleta A (UVA, 320 – 400 nm), radiação ultravioleta B (UVB, 280 – 320 nm) e radiação ultravioleta C (UVC, 100 – 280 nm). Quanto maior o comprimento de onda, menor é a energia armazenada na radiação e disto depende a penetração destas radiações no organismo (Couteau et al., 2001).

Apesar de sua alta energia, a radiação UVC é bloqueada pela camada de ozônio e, por isso, não atinge a pele humana. Desta forma devemos nos preocupar com os danos causados a pele pela radiação UVB e UVA que não são bloqueadas pela camada de ozônio e atingem mucosas, os olhos e a pele (Couteau et al., 2001).

A radiação UVB possui menor poder de penetração na pele que a radiação UVA e, por possuir maior energia causa danos imediatos e tardios, sendo a maior responsável pelo aparecimento de eritemas. Mesmo que a radiação UVA seja capaz de causar eritema é necessária uma dose mil vezes maior da mesma em relação à UVB para que seja atingido o mesmo efeito (Kaidbey & Kligman, 1978).



**Figura 2.** Representação esquemática da penetração da radiação ultravioleta na pele (Adaptado de [www.afh.bio.br](http://www.afh.bio.br)).

A radiação ultravioleta, tanto UVA quanto UVB, quando atinge a pele pode ser refletida, espalhada ou absorvida. Ao ser absorvida produz modificações em moléculas

(cromóforos: melanina, ácidos nucleicos, aminoácidos e ácido urocânico) gerando radicais livres que causam danos oxidativos ao material genético, proteínas e lipídios celulares (Pinnell, 2003; Mccullough & Kelly, 2006).

Os danos causados pela radiação ultravioleta podem ser classificados como: agudos, que são causados por inflamação (eritema, edema e sensibilidade ao toque) e bronzeamento (aumento na taxa de melanogênese), ou crônicos, causando fotoenvelhecimento e até câncer de pele (Wulf et al., 2004; Matsumura & Ananthaswamy, 2004).

Contudo, a pele possui alguns sistemas naturais de proteção à penetração da radiação ultravioleta, sendo eles, a camada córnea, a secreção sudorípara e a pigmentação .

A camada córnea, além de impedir a perda de água e de não permitir a penetração de substâncias indesejáveis, reflete de 5 a 10% da radiação ultravioleta incidente e, portanto, quanto mais fino o estrato córneo a pele torna-se mais sensível à radiação (Thomson, 1955; Pereira, 2008).

O ácido urocânico, presente na secreção sudorípara tem capacidade de absorver radiação ultravioleta tendo como comprimento de onda máximo 277 nm, contido na faixa de radiação UVB (Anderson & Parrish, 1981; Hanson et al., 1997; Hanson & Simon, 1998).

A melanina, pigmento responsável pela coloração da pele, absorve em ampla faixa de comprimento de onda além de atuar sinergicamente com antioxidantes. Além disso, verificou-se que a mesma tende a manter-se na parte superior ao núcleo das células da pele para proteger o DNA da incidência de radiação (Nielsen et al., 2006; Brenner & Hearing, 2008).

Portanto, é necessário o uso de substâncias antioxidantes diariamente a fim de minimizar os efeitos causados pela radiação ultravioleta e outros fatores extrínsecos capazes de gerar radicais livres e, com isso, aumentar a velocidade do envelhecimento.

## **Hiperpigmentação cutânea**

### **Melanogênese**

O termo melanina refere-se não a uma única molécula, mas a um grupo de biopolímeros pigmentados, polifenólicos de alto peso molecular, responsável pela coloração da pele, cabelos e pelos. Sua síntese ocorre nos melanossomos, organelas presentes nos

melanócitos, células dendríticas da camada basal da epiderme, na proporção de 1:35 em relação aos queratinócitos (Beny, 2000).

Dois principais tipos de melanina (eumelanina e feomelanina) são sintetizados pelo nosso organismo sendo estes, devido à diferença de coloração, responsáveis pelo fototipo da pele humana (Passeron et al., 2005).

A coloração da pele sofre influência da quantidade de caroteno, fatores vasculares e nível de melanina, este último influenciado por fatores genéticos e raciais, hormonais e externos, como é o caso da radiação ultravioleta, capaz de promover aumento da síntese de melanina e, conseqüentemente, da quantidade de pigmento melânico (Steiner, 1996ac; Su, 1999).

A quantidade de melanócitos não sofre variação, podendo aumentar em tamanho e, conseqüentemente, em taxa de produção e atividade enzimática. Portanto, a cor da pele, cabelos e pelos depende da quantidade e do tipo de melanina produzida e da taxa de transferência dos melanosomos dos melanócitos para os queratinócitos não sendo dependente do aumento de melanócitos (Steiner, 1996b; Briganti et al., 2003).

Além de conferir coloração, a melanina protege o DNA celular dos queratinócitos dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta. Parte da melanina liberada para os queratinócitos esta posicionada ao redor do núcleo celular e assim absorvem a radiação ultravioleta evitando danos ao mesmo (Gallarate et al., 2004; Kang et al., 2008). Tipo de pele branca possui menor quantidade de melanina que peles negras, sendo a proteção destas últimas, contra radiação ultravioleta, dez vezes maior.

A melanina é responsável pela termorregulação já que ao absorver a radiação ultravioleta libera a energia em forma de calor (radiação infravermelho) e pela regulação da síntese de vitamina D (Slominski et al., 2004; Brenner & Hearing, 2008; Margalida et al., 2008).

A síntese e a distribuição da melanina ocorrem em diversas etapas: transcrição de proteínas, biossíntese de melanosomos, triagem de proteínas melanogênicas, transporte de melanosomos até a borda dos dendritos e transferência dos melanosomos para os queratinócitos (Curto et al., 1998).

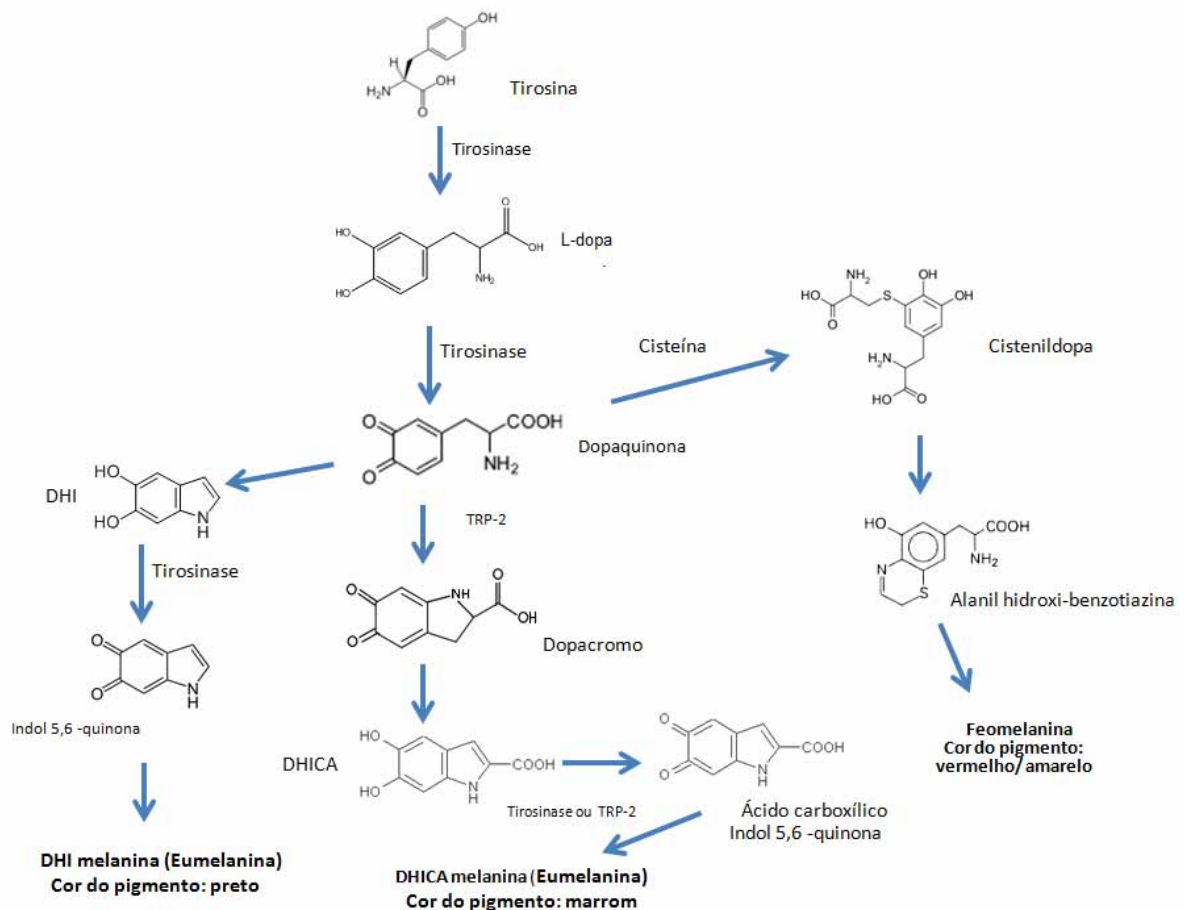
A melanogênese, síntese da melanina, é iniciada pela hidroxilação da L-tirosina à L-dopa (L-3,4-dihidroxifenilalanina) seguida pela oxidação da L-dopa à dopaquinona, intermediário reativo para as vias da eumelanogênese e feomelanogênese. Na ausência de



tióis, ocorre a ciclização da dopaquinona e segue-se a via da eumelanogênese, na presença de tióis segue-se a via da feomelanogênese (Figura 3) (Prota, 1980; Curto et al., 1998; Slominski et al., 2004 Passeron et al., 2005).

Na etapa de hidroxilação da L-tirosina à L-dopa o valor de pH do melanossomo é acidificado por uma bomba de prótons, essencial para a atividade da enzima tirosinase. Na sequência, este valor de pH do meio sofre alterações para atingir a neutralidade mantendo a estabilidade da L-dopa formada continuando o processo de síntese da melanina (Fuller et al., 2001).

Existem diferenças significativas entre a eumelanina (polímero fotoestável, fotoprotetor e insolúvel na maioria de solventes) e a feomelanina (fotolável, fotossensível e solúvel em álcalis) (Duval et al., 2002; Slominski et al., 2004).



**Figura 3.** Representação esquemática das etapas da melanogênese (Adaptado de Prota, 1980).

A tirosinase, polifenol oxidase, é uma enzima cobre-dependente que atua em várias etapas da síntese de melanina, sendo considerada uma molécula chave para este processo. Com o envelhecimento do indivíduo a produção de melanina é reduzida, pois ocorre diminuição natural da atividade enzimática (Passeron et al., 2005).

Devido à hiperpigmentação que pode ser causada pela síntese exagerada de melanina, causada, principalmente, pela exposição à radiação ultravioleta, compostos que apresentam efeitos inibitórios sobre a melanogênese através da inibição da atividade enzimática da tirosinase (compostos fenólicos ou quelantes de metais) têm sido alvo de estudos.

### **Hipercromia**

O Brasil é um país tropical e seus habitantes são provenientes de uma miscigenação do povo europeu, oriental (pele clara) e africano (pele escura). Independente de qual origem, as pessoas buscam por uma pele com aparência uniforme, principalmente no que diz respeito à cor (Ortonne & Bissett, 2008).

Alterações no sistema pigmentar podem causar hipopigmentação, aparecimento de manchas mais claras que a cor da pele, e hiperpigmentação, aparecimento de manchas com tonalidade mais escura que a da pele. A hiperpigmentação, anomalia causada pelo aumento da concentração de melanina em algumas regiões do corpo, é a principal causa de reclamações aos dermatologistas.

Os fatores que influenciam na hiperpigmentação são envelhecimento, uso de contraceptivos orais ou outro tratamento hormonal, gravidez, inflamações e, principalmente, exposição à radiação ultravioleta, sendo que, este último, provoca reações que são capazes de aumentar a taxa de transferência de melanina dos melanócitos para os queratinócitos provocando o aumento em sua concentração e, conseqüentemente, a intensidade da cor (Nicoletti et al., 2002; Ortonne & Bissett, 2008).

Os tipos mais comuns de hiperchromias são: melasma, cloasma, efélides, lentigens senis e hiperpigmentação pós-inflamatória. Com exceção de efélides, as outras hiperchromias citadas podem ser tratadas com o uso de substâncias químicas de uso tópico para efeito de clareamento.

Cloasmas e melasmas são hiperchromias adquiridas que ocorrem principalmente na face de mulheres estando, na maioria das vezes, relacionadas à gravidez. Porém, podem

ocorrer também devido a distúrbios hormonais, uso de produtos cosméticos fotossensibilizantes, uso de contraceptivos orais e exposição à radiação solar. Este tipo de hiperpigmentação pode atingir qualquer tipo de pele e pessoas em qualquer idade, principalmente mulheres. O pigmento acumulado pode estar tanto na epiderme quanto na derme e se instalado na derme é impossível reverter o quadro apenas com aplicação de produtos tópicos (Grimes, 1995; Steiner, 1996c; Ortonne & Bissett, 2008).

Lentigens senis, também denominadas “manchas de sol” são manchas escuras de tamanho variado (0,5 a 2,0 cm) que se formam em áreas expostas ao sol (rosto, pescoço e braços). Normalmente aparecem em pessoas com mais de 40 anos com histórico de exposição solar repetida (Steiner, 1996c; Ortonne & Bissett, 2008).

A hiperpigmentação pós-inflamatória, como o próprio nome já diz, origina-se a partir de uma inflamação. Pode ter início na epiderme e transformar-se em hiperpigmentação dérmica, devido ao aumento de melanófagos (macrófagos que fagocitam melanina) na derme, o que torna o tratamento mais difícil. Pode ser localizada ou difusa, dependendo do grau e extensão da inflamação. Normalmente são causados por reações alérgicas (picadas de insetos), reações a medicamentos, afecções cutâneas, erupções fototóxicas e até por agentes físicos (processos de esfoliação profunda da pele) (Pandya & Guevara, 2000; Nicoletti et al., 2002; Ortonne & Bissett, 2008).

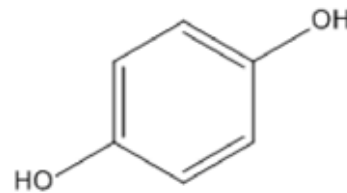
Os tratamentos para clareamento da hiperpigmentação epidérmica podem ser realizados topicamente e estão baseados em diferentes mecanismos, como inibição da atividade da enzima tirosinase, inibição da síntese de tirosina, esfoliação para eliminação da melanina formada, entre outros (Maeda & Fukuda, 1991).

### **Agentes despigmentantes**

Algumas técnicas são utilizadas para clarear a hiperpigmentação, tais como, uso de substâncias químicas incorporadas em diferentes produtos cosméticos, esfoliação profunda “peeling”, que diminui o tempo de contato entre o melanócito e o queratinócito através do aumento da taxa de renovação celular e, incidência de raios “laser” para tratamento de hiperpigmentação em nível dérmico.

O uso de substâncias clareadoras em veículos cosméticos é o tratamento mais utilizado para diminuição das hiperpigmentações epidérmicas.

Por aproximadamente 50 anos, a hidroquinona (HQ) (Figura 4) foi o principal ativo utilizado em produtos despigmentantes por possuir ação inibitória da atividade da tirosinase e permitir rápida melhora nos casos de hiperpigmentação cutânea (Gallarate et al., 2004; Nordlund et al., 2006). Por ser um composto fenólico, a HQ é capaz de interagir com o cobre e, com isso, inibir a atividade da enzima tirosinase; além disso, também permite a inibição da síntese de DNA e RNA sendo prejudicial aos melanócitos, gerando diminuição da produção de melanina, o que pode ocasionar uma despigmentação irreversível (Halder & Richards, 2004; Draelos, 2007).



**Figura 4.** Estrutura molecular da hidroquinona.

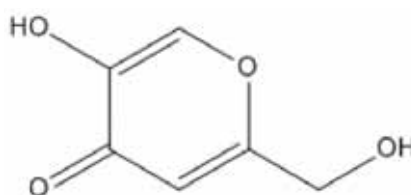
Alguns autores (Cummings & Nordlund, 1995; Nordlund et al., 2006) sugerem que a HQ possui potencial mutagênico e carcinogênico. No Japão, o uso de HQ é proibido e, nos últimos anos, devido aos motivos acima apresentados, a venda de produtos cosméticos contendo HQ, sem prescrição médica, foi proibida na Europa (Grimes, 1995; Nordlund et al., 2006). Nos Estados Unidos (EUA), o “Food and Drug Administration” (FDA) ainda não proibiu o uso da HQ em cosméticos, mas restringiu seu uso a 2%, assim como no Brasil (ANVISA, 2000; Draelos, 2007).

Além de possuir potencial carcinogênico, a HQ também apresenta efeitos adversos, como dermatite de contato irritativa e alérgica (Nordlund et al., 2006; Draelos, 2007; Costa et al., 2010) e pode ocasionar despigmentação irreversível, por ser tóxica ao melanócito, quando utilizada de maneira inadequada (Gallarate et al., 2004; Madhogaria & Ahmed, 2009).

Devido à retirada da HQ de grandes mercados cosméticos, as indústrias resolveram substituí-la por outros compostos com atividade despigmentante, tais como ácidos kójico, glicólico, retinóico, azelaico, salicílico; vitaminas e derivados como a niacinamida, o retinol, além de extratos de algas e vegetais, entre outros (Gallarate et al., 2004; Nordlund et al., 2006; Draelos, 2007; Madhogaria & Ahmed, 2009; Jiménez et al., 2010).

Dentre os substitutos da HQ, o ácido kójico (AK) é o mais frequentemente utilizado, pois age como bloqueador da tirosinase na produção de L-dopa, pois atua como quelante de íons cobre nos sítios ativos da enzima (Draelos, 2007; Jiménez et al., 2010). Além disso, o AK é uma substância antioxidante e, portanto, é capaz de minimizar a ocorrência de processos oxidativos necessários para a síntese de melanina (Kobayashi et al., 1995).

O AK (Figura 5) é um metabólito hidrofílico obtido das espécies de fungos *Aspergillus* e *Penicillium* e, por ser hidrofílico, é facilmente incorporado em emulsões (Draelos, 2007; Via Farma, 2011). Porém a maior dificuldade para o uso de AK em produtos de uso tópico está relacionada à estabilidade, uma vez que pode facilmente sofrer oxidação, além da instabilidade em presença de luz e calor, ocasionando mudança de coloração do produto, o que não é desejado. Além disso, não suporta grande variação nos valores de pH da formulação (Via Farma, 2011). Outro problema relacionado ao uso do AK, assim como da HQ e outros agentes sintéticos, está relacionado à capacidade de provocar reações inflamatórias na pele, podendo ocasionar lesões o que pode comprometer o tratamento (Jiménez et al., 2010).



**Figura 5.** Estrutura molecular do ácido kójico.

Considerando as desvantagens em utilizar estes agentes em formulações cosméticas para clareamento da pele, tem sido sugerida a substituição por ativos de origem natural; por exemplo, extratos de plantas e algas (Jiménez et al, 2010).

Baurin et al. (2002) avaliaram a atividade inibitória de tirosinase de 67 plantas tropicais pertencentes a 38 diferentes famílias. Os resultados mostraram que os extratos de *Stryphnodendron barbatimao*, *Portulaca pilosa*, *Cariniana brasiliensis*, *Entada africana* e *Prosopis africana* apresentaram inibição da tirosinase igual ou superior a 90%, resultado similar ao controle positivo.

Maeda et al. (2007) identificaram nas folhas da planta *Arnica Montana L.* (*Compositae*) um triterpeno 3 $\beta$ -16 $\beta$ -dihidroxi-21 $\alpha$ -hidroperoxi-20(30)-taraxasteno, composto

capaz de inibir a biossíntese de melanina, sendo considerado um inibidor potente, pois a ação inibitória é 50 vezes maior que a do 4-metoxifenol (derivado da hidroquinona).

O composto 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)propano (UP302) foi isolado da planta *Dianella ensifolis* (*Liliacea*) por Nesterov et al. (2008). Os resultados sugeriram que este composto é um importante inibidor de tirosinase, uma vez que se apresentou atividade 22 vezes mais potente que o AK.

Seguindo a tendência do uso de ativos naturais este trabalho apresenta o extrato de *Ascophyllum nodosum* como proposta de ativo antioxidante e inibidor de tirosinase.

### *Ascophyllum nodosum*

Será utilizado o extrato de *Ascophyllum nodosum* (Figura 6), uma espécie de alga marinha marrom pertencente à ordem *Fucales*, filo *Phaeophycota*. Esta espécie tem origem em clima temperado, locais rochosos e protegidos, onde se encontram grande parte da biomassa de algas. Ocorrem principalmente na costa do mar do Norte e no Atlântico Norte, sendo mais facilmente encontrada na costa irlandesa (Figura 7) (Parys et al., 2009; Jiménez et al., 2010; Guiry, 2012).



**Figura 6.** *Ascophyllum nodosum* (Guiry, 2012).



**Figura 7.** Distribuição geográfica de *Ascophyllum nodosum* (Guiry, 2012).

Sabe-se que compostos fenólicos são encontrados em plantas superiores e algas. Estes compostos apresentam atividade antioxidante, sendo substâncias importantes em cosméticos com função antienvhecimento (Audibert et al., 2010). Algas marinhas são ricas em antioxidantes naturais tais como, plorotanos, ácido ascórbico, tocoferol e carotenoides (Jiménez et al., 2010). Algas do filo *Phaeophyta* exibem altos níveis de plorotanos (compostos fenólicos), porém a quantidade é dependente da estação do ano (Pavia & Aberg, 1996; Stengel & Dring, 1997; Parys et al., 2007; Parys et al., 2009; Audibert et al., 2010).

Além da atividade antioxidante, os plorotanos são compostos importantes para fotoproteção, uma vez que são capazes de neutralizar os efeitos citotóxicos da radiação UV (Audibert et al., 2010).

Por tratar-se de uma matriz complexa, extratos vegetais são compostos por diversas substâncias que podem apresentar efeito sinérgico, muitas vezes mais potente do que o efeito das substâncias isoladas (Baniyas et al., 1992; Hras et al., 2000). Este fato é extremamente interessante em produtos cosméticos, pois o ativo natural pode, além de substituir uma substância sintética ou isolada, apresentar várias substâncias que contribuem para a ação multifuncional do produto cosmético.

Os compostos bioativos presentes no extrato de *A. nodosum* possuem propriedades antioxidante, antibacteriana, inibidora de tirosinase e fotoprotetora (Tutour et al., 1998; Parys

et al., 2007; Parys et al., 2009; Audibert et al., 2010; Jiménez et al., 2010). Além de ser um ativo importante para indústria de cosméticos, este extrato também é considerado um conservante natural para indústrias de alimentos, devido à ação antibacteriana.

A utilização deste extrato em indústrias de alimentos e cosméticos envolve o conceito de sustentabilidade.

Dependendo dos outros tipos de matérias primas utilizadas, por exemplo, na indústria cosmética o produto pode ser enquadrado como cosmético orgânico, oferecendo ao consumidor o valor de sustentabilidade (Jiménez et al., 2010).

### **Avaliação da eficácia e segurança de cosméticos**

Com o aumento da expectativa de vida da população, cada vez mais as pessoas estão se preocupando com a aparência e procurando produtos multifuncionais que tenham eficácia e segurança comprovadas (Migliato et al., 2007).

A eficácia de um produto depende quase que exclusivamente da ação do ativo, mas também é importante o tipo de excipientes ao qual ele será incorporado. Por este motivo, a avaliação da atividade do ativo é importante.

O uso de ativos naturais tem sido alvo de estudos, pois a incorporação de extratos naturais em bases cosméticas pode apresentar vantagens, em comparação com a utilização de um ativo único, por ser capaz de apresentar efeito sinérgico entre seus constituintes (Baniyas et al., 1992; Bonina et al., 1998; Eberhardt et al., 2000; Sun et al., 2002; Seeram et al., 2004; Sforcin et al., 2005; De Kok et al., 2008; Chiari, 2011). Este fato aumenta a necessidade de comprovação da eficácia dos ativos.

Ensaio como a avaliação da atividade antioxidante, avaliação da atividade inibidora de tirosinase, determinação do fator de proteção solar (FPS) da formulação, avaliação do perfil de liberação da formulação, entre outros, são técnicas utilizadas na avaliação da eficácia de produtos cosméticos. Todos estes ensaios podem ser realizados inicialmente *in vitro* podendo predizer a eficácia evitando o uso de animais em etapas pré-clínicas.

Assim como a avaliação da eficácia, a segurança de produtos cosméticos pode ser avaliada com testes *in vitro* como é o caso do ensaio de citotoxicidade.

Este teste tem a função de predizer se o produto pode ser indicado para etapas clínicas de avaliação, já que no ensaio de citotoxicidade é verificada a viabilidade celular e a



quantidade de substância testada capaz de inviabilizar 50% das células. Os resultados deste teste representam qual o índice de segurança esperado para o ativo.

## OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum* por metodologias espectrofotométricas e formular um sistema emulsionado para sua incorporação, caracterizando este sistema, além de avaliar sua eficácia e segurança utilizando metodologias *in vitro*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial antioxidante do extrato de *A. nodosum*;
- Avaliar o potencial do extrato de *A. nodosum* em inibir a atividade da enzima tirosinase;
- Avaliar o potencial citotóxico do extrato de *A. nodosum*;
- Validar metodologia analítica para quantificação do extrato de *A. nodosum*;
- Desenvolver um sistema emulsionado para incorporação do extrato de *A. nodosum*;
- Caracterizar as formulações por reologia e SAXS;
- Avaliar a estabilidade das formulações;
- Avaliar o fator de proteção solar das formulações;
- Avaliar o perfil de liberação da formulação desenvolvida.

## MATERIAL E MÉTODOS

### MATERIAL/EQUIPAMENTOS

Material: extrato aquoso de *Ascophyllum nodosum* (BioAtlantis); reagente Folin-Ciocalteu (Imbralab); ácido gálico (Sigma); carbonato de sódio; quercetina (Sigma); nitrito de sódio; cloreto de alumínio; hidróxido de sódio; radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPH, Sigma); metanol (Chemys); radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6- sulfonic acid (ABTS, Sigma); etanol (Chemys e TecLab); L-Dopa (Sigma); solução tampão fosfato pH 6,8; tirosinase (Sigma); 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Sigma); meio de cultura MEM (minimal essential médium) (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); placa de 96 poços para cultura celular (TPP); tubos de 15 mL (TPP); garrafas de cultura celular de 25 e 75 cm<sup>2</sup> (TPP); seringa de plástico 10 mL; filtro de seringa 0,22 µm; membranas de celulose para tubos de diálise de 76 mm (Sigma-Aldrich); picnômetro; fita Transpore; linhagens celulares HepG2 e HaCat; matérias primas (INCI Name): *Cetearyl Alcohol; Cetareth-20; Shea butter; Glyceryl Stearate; Phenoxyethanol, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutylparaben; Ammonium Acryloyldimethyltaurate VP copolymer; Sodium polyacrylate, hydrogenated polydecene, trideceth-6; Dissodium EDTA; Propylene glycol; Cyclomethicone; Ethylhexyl metoxicinamate;*.

Equipamentos: espectrofotômetro UV/Vis (Hitachi U-2001); espectrofotômetro UV/Vis (Beckman); leitor de placas (Bio-rad Model 550); estufa de CO<sub>2</sub> (Shel Lab); agitador (Labor Technik RW20DZM.n); Reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS-RS1; sensor do tipo cone-placa (C35/2°Ti); microscópio de luz polarizada (Leica Leitz DM RXE) com capturador de imagens (Moticam 2000); equipamento de permeação Microette (Hanson Research); optometrics; SPF-290S; estufa (Quimis); peagômetro (GeHaka PG 1800); centrífuga; geladeira; pipetadores automáticos com volume variável (Eppendorf).

## MÉTODOS

### 1. Caracterização do extrato de *Ascophyllum nodosum*

#### 1.1. Doseamento de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais do extrato de *A. nodosum* foi determinado utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e curva analítica de ácido gálico segundo metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965) e Kähkönen et al. (1999).

Foram adicionados 2,0 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10, v/v) em tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 400 µL de solução de ácido gálico em 9 diferentes concentrações (1,27 a 10,15 µg/mL). Após 8 minutos foram adicionados 1,6 mL de solução de carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 7,5% (m/v). Os tubos foram agitados e mantidos em repouso durante 30 minutos. Posteriormente, as soluções foram avaliadas em espectrofotômetro UV/Vis em 765 nm.

O mesmo procedimento foi realizado para o extrato de *A. nodosum* na concentração de 102 µg/mL. Os resultados foram expressos em µg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por 100 µg do extrato.

#### 1.2. Doseamento de flavonoides

Para a avaliação do teor de flavonoides do extrato de *A. nodosum* foi realizada a metodologia descrita por Zhishen et al. (1999). A quercetina foi utilizada como padrão de flavonoide.

Em tubos de ensaio foram adicionados 1,0 mL de solução etanólica de quercetina (0 a 180 µg/mL). Em seguida foram adicionados 60 µL de solução aquosa de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) (1:20, m/v) e os tubos foram mantidos em repouso. Decorridos 5 minutos foram adicionados 120 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) (1:10, m/v) e a solução foi mantida em repouso. Após 6 minutos 400 µL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M foram adicionados para que a reação fosse interrompida. Para finalizar 420 µL de água destilada foram adicionados para completar o volume para 2,0 mL. As soluções foram

avaliadas espectrofotometricamente em 510 nm. Todas as concentrações foram avaliadas em triplicata.

Para determinação do teor de flavonoides no extrato de *A. nodosum* uma solução aquosa do extrato (500 µg/mL) foi utilizada seguindo a metodologia anteriormente descrita. O resultado foi expresso em mg de flavonoides equivalentes a quercetina por 100 mg de extrato.

### 1.3. Determinação da atividade antioxidante

#### 1.3.1. Método de inibição do radical DPPH

A avaliação da atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum* foi realizada pelo método de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH<sup>•</sup>) seguindo a metodologia descrita por Chiari (2011).

Neste ensaio, 1,0 mL de solução aquosa do extrato em diferentes concentrações (0 a 58 µg/mL) foi adicionado a 2,5 mL de solução metanólica de DPPH<sup>•</sup> (0,004%; m/v). A reação foi mantida ao abrigo de luz durante 30 minutos para posterior avaliação espectrofotométrica, com determinação dos valores de absorbância a 515 nm.

Como branco da reação foi utilizado 1,0 mL de água destilada ao invés da solução do extrato. O ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração de extrato. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada pela equação (1) (Molyneux, 2004):

$$\% \text{ Inibição} = \frac{A_{\max} - A_{\text{amostra}}}{A_{\max}} \times 100 \quad (\text{Equação 1}),$$

onde:

% Inibição = porcentagem de inibição do radical DPPH;

$A_{\max}$  = absorbância do radical DPPH na ausência de amostra em 515 nm;

$A_{\text{amostra}}$  = absorbância do radical DPPH na presença de amostra em 515 nm.

A partir dos valores de porcentagem de inibição foi possível obter uma curva analítica e calcular a concentração expressa em valor de IC<sub>50</sub>, representando a quantidade de extrato necessária para inibir 50% dos radicais DPPH em solução.

O mesmo procedimento foi repetido para o ácido ascórbico (0 a 5 µg/mL), padrão antioxidante.

### **1.3.2. Método de inibição do radical ABTS**

A atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum* pelo método de inibição do radical 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS<sup>•+</sup>) foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Rufino et al. (2007) com modificações.

Foi preparada uma solução estoque do sal de ABTS (7 mM). A seguir, a 5,0 mL desta solução foram adicionados 88,0 µL de uma solução de persulfato de potássio (140 mM). A reação foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, por 18 horas, para formação do radical ABTS.

Para avaliação da atividade antioxidante, a solução de radical ABTS foi diluída em etanol até que a absorbância fosse  $1,00 \pm 0,05$  quando medida em espectrofotômetro a 734 nm. Em seguida, 2,0 mL da solução do radical ABTS foram adicionados a 1030 µL de solução do extrato em diferentes concentrações (0 a 26,0 µg/mL) em tubos de ensaio. Após 6 minutos, a absorbância das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 734 nm.

A porcentagem de inibição do radical ABTS em relação à concentração de extrato foi determinada pela mesma equação utilizada na avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH (Equação 1).

O mesmo procedimento foi realizado utilizando o ácido ascórbico, padrão antioxidante. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **1.4. Determinação da atividade inibidora de tirosinase**

A avaliação da atividade inibidora de tirosinase do extrato de *A. nodosum* foi realizada segundo Khazaeli et al. (2009). Este método tem como princípio a inibição da atividade da tirosinase o que implica diminuição da transformação de L-dopa em dopaquinona por reações catalisadas pela enzima. Em placas de 96 poços foram adicionados 80 µL da solução de extrato em diferentes concentrações (0 a 1900 µg/mL), 45 µL de solução de L-dopa (4,5 mM) e 25 µL de solução de tirosinase (80 unidades/mL), em todas as soluções utilizou-se tampão fosfato pH 6,8 como solvente. Após 10 minutos, os valores de absorbância foram analisados

em leitor de placas a 490 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando a solução tampão fosfato pH 6,8 sem a presença de enzima para calcular a absorvância real (Equação 2), uma vez que o extrato de *A. nodosum* apresenta coloração marrom.

$$A_{real} = A_{CE} - A_{SE} \quad (\text{Equação 2}),$$

onde:

$A_{real}$  = absorvância real em 490 nm;

$A_{CE}$  = absorvância na presença de enzima em 490 nm;

$A_{SE}$  = absorvância na ausência de enzima em 490 nm.

Os resultados são expressos em porcentagem de inibição da atividade da tirosinase e são calculados segundo a equação (3):

$$\%Inibição = \left(1 - \frac{A_{real}}{A_{controle}}\right) \times 100 \quad (\text{Equação 3}),$$

onde,

% Inibição = porcentagem de inibição da atividade da tirosinase;

$A_{real}$  = absorvância real em 490 nm;

$A_{controle}$  = absorvância quando a concentração de extrato é nula em 490 nm.

A partir dos valores de porcentagem de inibição foi possível obter uma curva analítica e calcular a porcentagem de inibição expressa em valor de  $IC_{50}$ , quantidade de extrato necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase.

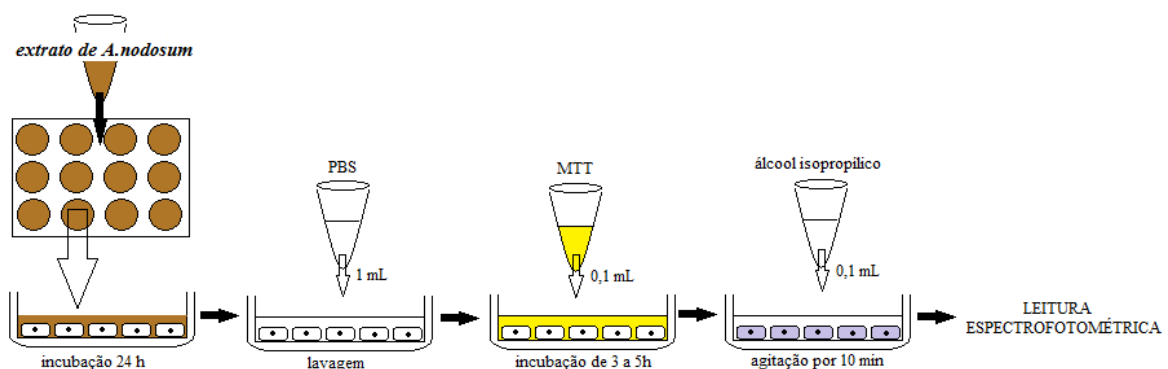
## **2. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de *A. nodosum* em células HepG2 e HaCat**

Para a avaliação do potencial citotóxico do extrato de *A. nodosum* foi utilizado o método do 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) que tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem o MTT,

formando cristais insolúveis de formazana de coloração violeta. 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). As células foram cultivadas em meio de cultura MEM (minimal essential médium) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino e antibióticos (penicilina 100 U/mL; estreptomicina 0,1 mg/mL). As culturas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As células com confluência de 80 a 90% foram tripsinizadas. A atividade da tripsina foi interrompida pela neutralização com MEM com soro e a suspensão foi centrifugada a 1300 rpm por 3 minutos. Em seguida, as células foram semeada em placas de 96 poços com densidade celular de  $1,0 \times 10^6$  células/mL. As placas foram incubadas por 24 horas para a completa adesão das células às placas.

Em seguida, as células foram tratadas com 100 µL de controle positivo (DMSO a 10% em MEM sem soro), controle negativo (MEM sem soro), e diferentes concentrações do extrato (solubilizado em MEM sem soro), durante 24 horas.

Após o tratamento, o meio de cultura foi removido, as placas foram lavadas delicadamente com tampão fosfato (*phosphate buffer saline* – PBS) (Bruggisser et al., 2002) e 100 µL de MTT (1mg/ml em PBS) foram adicionados a cada poço. As placas foram incubadas a 37 °C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazana (3 a 5 horas). A solução de MTT foi retirada da placa e, para a solubilização dos cristais de formazana, 100 µL de álcool isopropílico absoluto foram adicionados a cada poço e a leitura espectrofotométrica da absorbância a 595 nm, foi realizada em leitor de placas (Figura 8).



**Figura 8.** Esquema do procedimento utilizado para avaliar a citotoxicidade do extrato de *Ascophyllum nodosum* (Adaptado de Chiari et al, 2012a).



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, também foi determinada a porcentagem de células vivas. A partir das curvas obtidas calculou-se o  $IC_{50}$ , quantidade de extrato necessária para que 50% das células permanecessem vivas.

### **3. Validação da metodologia de quantificação pelo método de inibição do radical ABTS**

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).

#### **3.1. Linearidade**

Para avaliar a linearidade do método foram obtidas três curvas experimentais. Foram utilizadas soluções aquosas de extrato de *A. nodosum* em uma faixa de concentração que variou de 0 a 26,0  $\mu\text{g/mL}$ . Decorridos seis minutos de reação entre a amostra e o cátion radical, as soluções foram analisadas em espectrofotômetro a 734 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A equação que descreve a curva analítica e o coeficiente linear foram obtidos através da regressão linear. Foram consideradas lineares equações onde o valor do coeficiente linear foi igual ou superior a 0,99 (ANVISA, 2003b).

#### **3.2. Exatidão**

A exatidão foi determinada pela avaliação da recuperação, ou seja, três concentrações de extrato de *A. nodosum* conhecidas (6,0; 13,0; 21,5  $\mu\text{g/mL}$ ) e compreendidas no intervalo de linearidade do método foram utilizadas e a relação entre a concentração experimental observada e a concentração teórica foi avaliada. O método foi considerado exato quando os valores de recuperação foram entre 95 e 105% (ANVISA, 2003b).

### 3.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

A estimativa do limite de detecção foi realizada com base na relação de três vezes o ruído da linha de base, através da equação (4):

$$LD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 4}),$$

onde,

$DP_a$  = 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;

$IC$  = inclinação da curva analítica (ANVISA, 2003b).

O limite de quantificação foi calculado da mesma maneira que o limite de detecção, porém ao invés de três vezes o ruído da linha de base foi calculado por dez vezes este valor, pela equação (5):

$$LQ = \frac{DP_a \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 5}),$$

onde:

$DP_a$  = 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;

$IC$  = inclinação da curva analítica (ANVISA, 2003b).

### 3.4. Precisão

A precisão do método analítico pode ser avaliada em três níveis: repetitividade (precisão intracorrída), precisão intermediária (precisão intercorrída) e reprodutibilidade (precisão interlaboratorial). Em ambos os casos é calculada como desvio padrão relativo, segundo a equação (6):

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad (\text{Equação 6}),$$

onde:

*DPR* = desvio padrão relativo;

*DP* = desvio padrão;

*CMD* = concentração média determinada (ANVISA, 2003b).

O método é considerado preciso quando o DPR não ultrapassa 5% (ANVISA, 2003b).

Para avaliação da precisão do método foram realizadas determinações em triplicata de três diferentes concentrações da solução de extrato de *A. nodosum* compreendidas no intervalo de linearidade do método. Para avaliação da repetitividade (precisão intra-dia) as análises foram realizadas em um mesmo dia, porém em períodos diferentes, utilizando o mesmo equipamento e o mesmo analista. Para a avaliação da precisão intermediária (precisão inter-dia) as análises foram realizadas com as mesmas condições que para repetitividade, porém em dias diferentes. Para análise da reprodutibilidade os ensaios foram realizados pelo mesmo analista, porém houve a troca do equipamento.

### 3.5. Especificidade e Seletividade

Para avaliar a especificidade e seletividade do método foram realizadas determinações em triplicata de três diferentes concentrações do extrato de *A. nodosum* compreendidas na faixa de linearidade do método. As soluções de extrato de *A. nodosum* foram contaminadas com uma formulação emulsionada e, em seguida, os resultados obtidos foram comparados com o da curva de linearidade. A especificidade e seletividade foram expressas como DPR. O método é considerado específico e seletivo quando o DPR observado é igual ou menor que 5% (ANVISA, 2003b).

### 3.6. Robustez

A robustez do método foi realizada variando o fabricante do etanol utilizado na diluição do cátion radical. Para isso foram realizadas determinações em triplicata de três diferentes concentrações do extrato de *A. nodosum* compreendidas na faixa de linearidade do

método. O método foi considerado robusto quando o valor do DPR não ultrapassou 5% (ANVISA, 2003b).

### 3.7. Curva analítica com solvente diferente

Após o método ter sido validado, uma nova curva analítica foi construída utilizando como solvente da solução de extrato uma mistura de etanol e água (8:2, v/v), pois na avaliação da retenção cutânea e no estudo da estabilidade do extrato de *A. nodosum* no fitocosmético este sistema solvente foi utilizado.

## 4. Preparo das formulações

Durante o desenvolvimento da formulação buscou-se obter uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) utilizando componentes que proporcionassem sensorial agradável e toque pouco oleoso, visto que a finalidade do produto é para uso facial.

Foram testadas quatro formulações utilizando como agente emulsionante *Ceteareth-20* (álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE) e espessante lipofílico o *Cetearyl Alcohol* (álcool cetoestearílico) modificando entre elas os agentes de consistência (*Gliceryl Stearate*, *Ammoniun Acryloyldimethyltaurate VP Copolymer* e *Sodium polyacrylate, hydrogenated polydecene, trideceth-6*).

Inicialmente foram desenvolvidas formulações sem a adição de extrato, denominadas formulação base. A Tabela 1 apresenta a composição percentual de cada formulação testada.

**Tabela 1.** Composição percentual das formulações.

INCI Name	F1(% m/m)	F2 (% m/m)	F3 (% m/m)	F4 (% m/m)
<i>Cetearyl Alcohol</i>	4,0	4,0	4,0	4,0
<i>Ceteareth-20</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Shea Butter</i>	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Glyceryl Stearate</i>	-	<b>3,0</b>	-	-
<i>Ammonium</i>				
<i>Acryloyldimethyltaurate VP</i>	<b>0,2</b>	-	-	-
<i>Copolymer</i>				
<i>Sodium polyacrylate,</i> <i>hydrogenated polydecene,</i> <i>trideceth-6</i>	-	-	<b>1,0</b>	<b>3,0</b>
<i>Propylene Glycol</i>	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Dissodium EDTA</i>	0,1	0,1	0,1	0,1
<i>Phenoxyethanol, Methylparaben,</i> <i>Ethylparaben, Propylparaben,</i> <i>Butylparaben, Isobutylparaben</i>	0,8	0,8	0,8	0,8
<i>Cyclomethicone</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Aqua qsp</i>	100	100	100	100

Para a obtenção do fitocosmético foram adicionados, a cada formulação, 1,2%, em massa, do extrato de *A. nodosum*, cuja quantidade foi determinada após avaliação da atividade antioxidante e do potencial citotóxico do extrato. A partir deste ponto, as formulações serão denominadas pelas siglas da Tabela 1 seguidas de base ou fito, para classificação em formulação base ou fitocosmética.

### 5. Caracterização reológica das formulações base e fitocosmética

As formulações F3 e F4 (base e fito) foram caracterizadas quanto à reologia em reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS-RS1. Os ensaios foram realizados utilizando sensor do tipo cone-placa (diâmetro = 35 mm e angulação = 2°) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.

O comportamento reológico das amostras foi avaliado pela determinação de:

- propriedade de fluxo, com taxa de cisalhamento de 0 - 100 s<sup>-1</sup> para curva ascendente e de 100 - 0 s<sup>-1</sup> para curva descendente, durante 120 segundos cada.
- varredura de tensão, com frequência constante de 1,0 Hz e tensão de cisalhamento de 0 – 10 Pa.

- varredura de frequência, com tensão constante de 1,0 Pa e frequências variáveis de 0,1 – 100 Hz.

- fluência e relaxação com tensão de cisalhamento constante de 1 Pa por 175 segundos e recuperação, cessando a tensão aplicada, por 175 segundos e, para apenas para F4 base e fito fluência e relaxação com tensão de cisalhamento constante de 3 Pa por 175 segundos e recuperação, cessando a tensão aplicada, por 175 segundos.

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

## **6. Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas nas formulações base e fitocosmética**

As formulações F3 e F4 (base e fito) foram avaliadas quanto à presença de estruturas líquido-cristalinas. Para isso, foram preparadas lamínas com alíquotas da formulação base e fitocosmética que foram analisadas por microscopia de luz polarizada em microscópio de luz polarizada com capturador de imagens.

Além disso, as formulações base e fitocosmética foram analisadas por medidas de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (*small angle X-ray scattering* – SAXS) para avaliar as nanoestruturas que as compõem. Os dados foram coletados no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS – Campinas/SP), na linha para SAXS, equipadas com um monocromador ( $\lambda = 1.608\text{Å}$ ) 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  $\varepsilon$  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 comparação quantitativa, 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.

## 7. Avaliação do perfil de liberação do extrato de *A. nodosum*

A avaliação do perfil de liberação foi realizada para as formulações F3 e F4. A avaliação da liberação do extrato de *A. nodosum* a partir do fitocosmético foi efetuada de acordo com descrito por Marquele et al. (2006).

Foram utilizadas células de difusão de Franz modificadas com área de difusão de 1,77 cm<sup>2</sup>, no equipamento Microette (Hanson Research), acoplada a um sistema de agitação magnética. O sistema de difusão foi acoplado a um banho-maria termostatzado com circulação externa, para a manutenção da temperatura em  $32,5 \pm 0,5$  °C (Marquele et al., 2006). Para a determinação do perfil de liberação da formulação foi utilizada membrana sintética de acetato de celulose. O compartimento receptor da célula de Franz modificada foi preenchido com 7,0 mL de água deionizada que foi continuamente agitada a 300 rpm com a utilização da agitação magnética. Amostras de 273,4 mg do fitocosmético foram adicionadas sobre a membrana e, para garantir *sink conditions*, a solubilidade do extrato de *A. nodosum* em solução receptora foi avaliada.

A quantidade de extrato de *A. nodosum* liberada da formulação foi avaliada após 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas de ensaio. Os experimentos foram repetidos cinco vezes para cada tempo. A quantificação foi realizada em triplicata pelo método de inibição do radical ABTS e um volume de 3090 µL de amostra foi necessário. Por este motivo, a cada coleta o experimento foi recommçado desde o inicio sendo, portanto, realizados experimentos independentes.

## 8. Estabilidade físico química das formulações base e fitocosmética

A avaliação da estabilidade da formulação consiste em verificar a manutenção das características organolépticas (cor, odor, aspecto, pH e densidade) e do teor do ativo.

O estudo da estabilidade foi realizado apenas para formulação F4 base e fito por um período de 90 dias e as amostras foram submetidas a diferentes condições de armazenagem. Os testes foram realizados em triplicata. As avaliações foram realizadas conforme preconizado pela ANVISA (Brasil,2004) e Isaac et al (2008).

O inicio da avaliação da estabilidade é marcado pelo teste de centrifugação realizado, a 3000 rpm durante 30 minutos, 24 horas após a manipulação das formulações para que possa

adquirir viscosidade e consistência final, após sua maturação.

O aspecto e a cor foram avaliados visualmente; o odor através do sensorial e o valor de pH com auxílio do peagômetro digital (GeHaka PG 1800). A densidade foi avaliada com o uso de um picnômetro (Brasil, 2004; Isaac et al, 2008).

As amostras foram submetidas a diferentes condições de armazenagem: temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), exposição à luz indireta,  $-5 \pm 2$  °C,  $5 \pm 2$  °C,  $45 \pm 2$  °C e ciclos de congelamento e descongelamento (Brasil, 2004; Isaac et al, 2008).

A avaliação do teor de ativo, denominada estabilidade química, foi avaliada através da atividade antioxidante do fitocosmético pelo método de inibição do radical ABTS. Todas as análises foram realizadas nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 50, 60 e 90, exceto a determinação da densidade, que foi avaliada nos dias 1, 15 e 90.

### **9. Avaliação “*in vitro*” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética**

O fator de proteção solar (FPS) da formulação base e fitocosmética foi avaliado utilizando o equipamento Optometrics SPF-290S seguindo as determinações do fabricante. Para isto foram aplicados 110 mg de formulação sobre uma fita Transpore<sup>®</sup> a fim de se obter um filme de amostra de  $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ . Em seguida, a amostra foi submetida à incidência de radiação ultravioleta na faixa de comprimento de onda de 290 a 400 nm (por uma lâmpada de Xenônio). As leituras foram repetidas doze vezes e o fator de proteção solar foi calculado pelo software SPF (Kale et al., 2010; Duraisamy et al., 2011). A fim de verificar se o extrato de *A. nodosum* potencializa o fator de proteção solar de filtros solares químicos, as formulações foram acrescidas de *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (3,5%; m/m) e avaliadas pela mesma metodologia.

### **10. Análise estatística dos resultados**

A análise estatística e a aquisição das figuras 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

O extrato aquoso de *A. nodosum* utilizado no estudo foi obtido comercialmente (ALGA 95 – Bioatlantis) e o fornecedor informou que, após análise, foram encontrados macronutrientes, micronutrientes, mais de 60 oligoelementos, aminoácidos, carboidratos, substâncias antioxidantes e estimuladoras de crescimento de plantas (Campo & Flores, 2012).

### 1. Caracterização do extrato de *Ascophyllum nodosum*

#### 1.1. Doseamento de compostos fenólicos totais

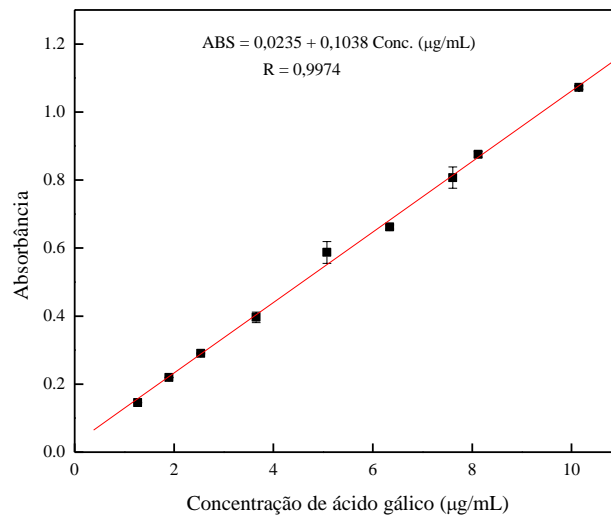
O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato aquoso de *A. nodosum* foi avaliado sendo utilizada uma curva analítica do ácido gálico (composto fenólico padrão), como padrão de quantificação (Figura 9). Os resultados foram avaliados a partir da equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica do ácido gálico e foram expressos em  $\mu\text{g}$  de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico por 100  $\mu\text{g}$  de extrato de *A. nodosum*.

Os valores de absorvância obtidos para o extrato de *A. nodosum* na determinação de compostos fenólicos totais estão descritos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores de absorvância obtidos para o extrato de *A. nodosum* na determinação de compostos fenólicos totais.

	<b>ABS 1</b>	<b>ABS 2</b>	<b>ABS 3</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	0,019	0,019	0,018	0,018	0,001
<b>Amostra</b>	0,783	0,795	0,785	0,787	0,006

ABS = Absorvância



**Figura 9.** Curva analítica do ácido gálico.

A partir da média da absorbância do controle (branco da reação) e da amostra foi calculada a absorbância real da amostra conforme a equação 7.

$$A_{real} = A_{amostra} - A_{controle} \quad (\text{Equação 7}),$$

onde:

$A_{real}$  = absorbância real da amostra;

$A_{amostra}$  = absorbância experimental da amostra;

$A_{controle}$  = absorbância do branco da reação (todos os reagentes exceto a amostra).

Considerando o valor real de absorbância da amostra (0,769), a equação da reta que descreve a curva analítica do ácido gálico e a concentração de extrato de *A. nodosum* utilizada durante o experimento (102 µg/mL) foi determinado que o extrato de *A. nodosum* contém 7,04 µg de compostos fenólicos equivalentes ao ácido gálico (CFEAG) por 100 µg de extrato (7% (m/m) de compostos fenólicos), o que equivale a 70 mg de CFEAG por grama de extrato seco.

Quando comparado com o teor de compostos fenólicos de outras algas (Tabela 3) o valor obtido para o extrato de *A. nodosum* indica um resultado bastante interessante, pois a quantidade de compostos fenólicos é muito maior do que para outras algas pertencentes ao

mesmo filo e, quando comparado entre algas de diferentes filos também foi superior a algumas espécies. Dos valores comparados, apenas o extrato etanólico de *Sargassum siliquastrum* apresentou teor de fenólicos superior ao encontrado no extrato aquoso de *A. nodosum*.

**Tabela 3. Teor de compostos fenólicos de diferentes espécies de algas.**

	Filo	Espécie	Teor de compostos fenólicos (mg CFEAG/ g de extrato seco)
Zhang et al., 2007	Rodophyta	<i>Symphyocladia latiucula</i>	8,0
		<i>Heterosiphonia japonica</i>	3,06
		<i>Chondria crassicaulis</i>	2,36
Zhang et al., 2007	Phaeophyta	<i>Desmarestia viridis</i>	1,42
		<i>Dictyopteris divaricata</i>	0,96
		<i>Ectocarpus siliculosus</i>	0,87
Sreenivasan et al., 2007	Rodophyta	<i>Gracilaria changii</i>	5,0
Cho et al., 2007	Ochrophyta	<i>Sargassum siliquastrum (EA)*</i>	27,15
		<i>Sargassum siliquastrum (EE)*</i>	127,37
		<i>Sargassum siliquastrum (EC)*</i>	33,21

EA: extrato aquoso; EE: extrato etanólico; EC: extrato clorofórmico

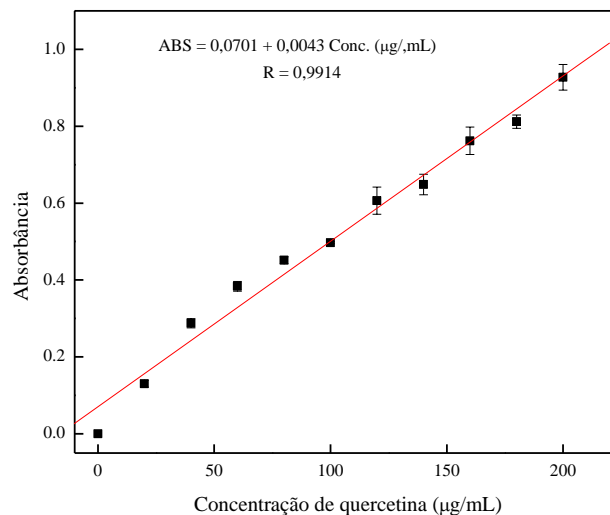
Audibert et al (2010) prepararam dois diferentes extratos de *A. nodosum*, extração com metanol 100% (M100) e extração do resíduo do M100 com metanol 50% (M50) e avaliaram o teor de compostos fenólicos, sendo observado 1,5% e 0,95% de compostos fenólicos para M100 e M50, respectivamente. Estes valores encontrados são inferiores ao obtido para o extrato aquoso de *A. nodosum*, nas condições propostas neste estudo.

Estes resultados remetem à possibilidade do extrato de *A. nodosum* apresentar atividade antioxidante, uma vez que compostos fenólicos estão entre as substâncias antioxidantes mais eficientes presentes em algas marinhas marron (Jimenez-Escrig et al., 2001).

Portanto, a confirmação da presença destes compostos no extrato sugere a possibilidade de empregar tal extrato em preparações cosméticas com objetivo de ação antioxidante, uma vez que a presença destes compostos sobre a pele podem protegê-la de danos oxidativos e foto-oxidativos (Rosa, 1996).

## 1.2. Doseamento de flavonoides

Flavonoides são metabólitos secundários da classe dos polifenóis apresentando alto poder antioxidante (Kim et al., 1997; Pietta, 2000, Pinnell, 2003). Por se tratar de compostos sintetizados por espécies vegetais e devido ao interesse em substâncias antioxidantes em produtos cosméticos com ação antienvhecimento, o teor de flavonoides no extrato de *A. nodosum* foi avaliado. Foi obtida uma curva analítica de quercetina (substância utilizada como padrão de flavonoide) (Figura 10) para que o resultado fosse expresso em  $\mu\text{g}$  de flavonoides equivalentes a quercetina por 100  $\mu\text{g}$  de extrato de *A. nodosum*.



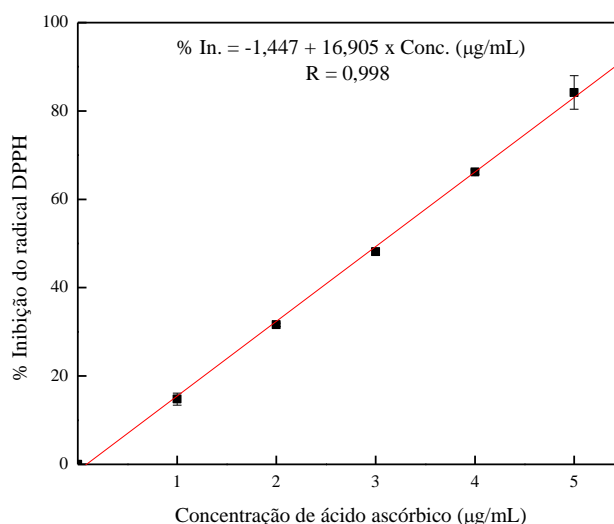
**Figura 10.** Curva analítica da quercetina.

Uma solução de extrato de *A. nodosum* de concentração 250 µg/mL foi utilizada para a determinação, porém os valores de absorvância obtidos foram menores que o equivalente a 20 µg/mL de quercetina. Este fato revela que o extrato de *A. nodosum* não apresenta flavonoides ou não apresenta um teor de flavonoides significativo, sendo necessária uma análise mais detalhada, possivelmente por cromatografia líquida de alta eficiência, para um resultado mais preciso.

### 1.3. Determinação da atividade antioxidante

#### 1.3.1. Método de inibição do radical DPPH

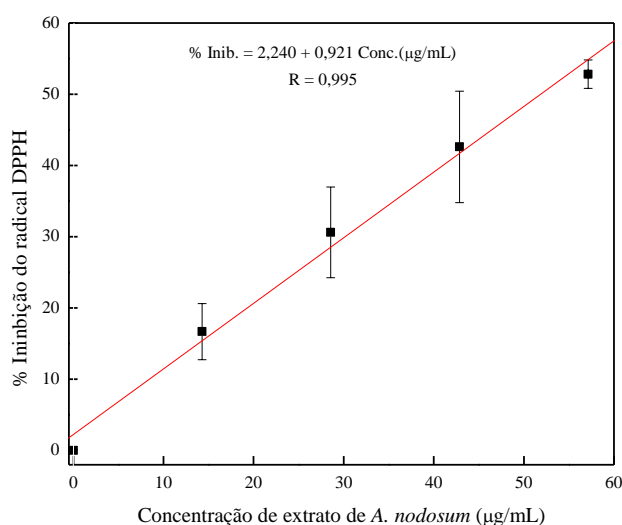
A avaliação da atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum* foi realizada pelo método da inibição do radical DPPH. Primeiramente, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações (0 a 5 µg/mL) de ácido ascórbico, substância padrão com atividade antioxidante. Com os resultados obtidos foi possível obter uma curva analítica do ácido ascórbico para ter certeza de que o método foi efetivo para determinação da atividade antioxidante (Figura 11) e, também, para comparar o potencial antioxidante do extrato de *A. nodosum* com o de uma substância padrão com atividade antioxidante.



**Figura 11.** Curva analítica do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical DPPH.

A partir da equação da reta (Figura 11) foi possível calcular o valor de  $IC_{50}$ , que corresponde à quantidade de ácido ascórbico necessária para inibir 50% dos radicais DPPH em solução. O valor de  $IC_{50}$  obtido foi 3,04  $\mu\text{g/mL}$ .

Em seguida, foram avaliadas soluções de diferentes concentrações de extrato de *A. nodosum* (0 a 57  $\mu\text{g/mL}$ ) e obtida uma curva analítica da concentração de extrato de *A. nodosum* frente à porcentagem de inibição do radical DPPH (Figura 12).



**Figura 12.** Curva analítica das soluções do extrato de *A. nodosum* pelo método de inibição do radical DPPH.

O radical DPPH apresenta coloração violeta, que pode ser observada espectrofotometricamente em 515 nm. Quando uma solução de substâncias, que possuem atividade antioxidante, é adicionada a uma solução contendo radical DPPH, ocorre uma mudança na coloração da solução, pois o radical reage com a substância e apresenta-se em solução em sua forma reduzida, possuindo coloração amarelada.

Extratos vegetais normalmente contêm substâncias as quais lhes conferem coloração, o que pode provocar absorção no comprimento de onda de reação do radical DPPH, com substâncias antioxidantes.

Arnao (2000) verificou que amostras contendo antocianinas apresentaram valor de potencial antioxidante contestável, pelo fato de interferirem na absorção em 515 nm. Por este motivo, concentrações do extrato de *A. nodosum* acima de 60  $\mu\text{g/mL}$  não puderam ser

avaliadas por esta metodologia, uma vez que a coloração marrom-amarelada da solução do extrato interferiu na coloração amarelada da solução do radical prejudicando a confiabilidade do resultado analisado a partir desta concentração.

A partir da equação da reta (Figura 12) foi calculado o valor de  $IC_{50}$ , correspondendo à quantidade de extrato necessária para inibir 50% dos radicais livres presentes na solução. Para este ensaio, o valor obtido foi de 51,88  $\mu\text{g/mL}$ . Como o valor de  $IC_{50}$  calculado para o extrato de *A. nodosum* apresentou-se próximo ao último ponto da curva analítica, julgou-se necessária a utilização de uma metodologia mais sensível, na qual fosse possível utilizar uma menor quantidade de extrato ou uma metodologia na qual a coloração do extrato não interferisse na leitura final.

Cho et al. (2007) avaliaram o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante de extratos de *Sargassum siliquastrum* preparados com diferentes solventes extratores e foi observado que o extrato com maior teor de compostos fenólicos foi também o que apresentou maior potencial antioxidante (extrato etanólico: teor de fenólicos 127,37 mg de CFEAG/g de extrato seco e 66,31% de inibição do radical DPPH para concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ; extrato aquoso: teor de compostos fenólicos 27,15 mg CFEAG/g de extrato seco e 30,64 % de inibição do radical DPPH para concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ ).

Audibert et al. (2010) observaram que o teor de compostos fenólicos em extratos de algas está relacionado com o potencial antioxidante deste extrato. Foram avaliados extrato metanólico (M100) e hidrometanólico (metanol 50% - M50) e foi verificado que M100 apresentou teor de compostos fenólicos de 1,5% e quantidade em massa seca para inibir 50% dos radicais DPPH em solução de 120  $\mu\text{g}$ , o que corresponde a 36,36  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que M50 apresentou teor de compostos fenólicos de 0,95% e quantidade em massa seca para inibir 50% dos radicais DPPH em solução de 129  $\mu\text{g}$ , o que corresponde a 39,1  $\mu\text{g/mL}$ .

Comparando este resultado com o obtido para o extrato aquoso de *A. nodosum* é possível dizer que o teor de compostos fenólicos está relacionado com o potencial antioxidante, pois o teor de compostos fenólicos para o extrato aquoso de *A. nodosum* é maior do que para M100 e M50 e a atividade antioxidante entre os três extratos obedece à proporcionalidade do teor de compostos fenólicos. Portanto, é possível inferir que o extrato aquoso de *A. nodosum* apresenta teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante significativa, apesar do potencial antioxidante ser menor que o do ácido ascórbico; entretanto,

pelo fato do extrato de *A. nodosum* apresentar maior estabilidade que o ácido ascórbico, pode ser considerado um substituto em potencial para uso cosmético.

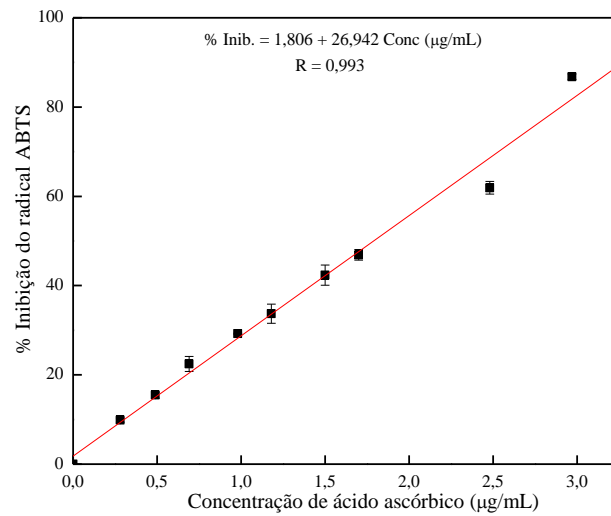
### 1.3.2. Método de inibição do radical ABTS

Devido à interferência observada pela coloração do extrato de *A. nodosum* no método de inibição do radical DPPH, executou-se outra metodologia a fim de evitar esta interferência. Foi realizado o ensaio de determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS, uma vez que o cátion radical,  $ABTS^{*+}$ , apresenta absorção em vários comprimentos de onda, possibilitando a escolha a 734 nm, o que elimina a possibilidade de interferência da coloração do extrato (Brand-Willians et al., 1995; Arnao, 2000; Li et al., 2008).

Além disso, o método de inibição do radical DPPH é sensível em meio ácido e o radical é solúvel apenas em solventes orgânicos enquanto o método de inibição do radical ABTS pode ser utilizado em ampla faixa de pH e soluções aquosas, facilitando a avaliação da atividade antioxidante de substâncias hidrossolúveis (Tyrakowska et al., 1999; Lemanska et al., 2001; Awika et al., 2003). Outro fator determinante na escolha do método de inibição do radical ABTS é o tempo de reação que, quando comparado com o método de inibição do radical DPPH, é relativamente mais curto (Brand-Willians et al., 1995; Awika et al., 2003; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008).

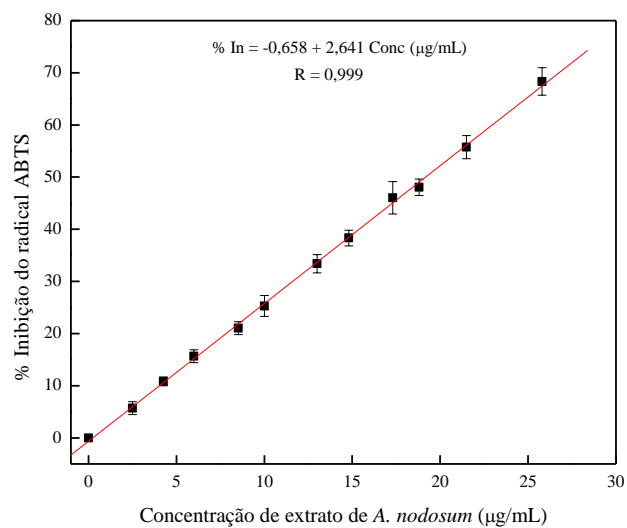
Neste ensaio utilizou-se como substância padrão antioxidante o ácido ascórbico. A Figura 13 apresenta a curva analítica obtida para o ácido ascórbico (0 a 3,0  $\mu\text{g/mL}$ ).





**Figura 13.** Curva analítica do ácido ascórbico pelo método de inibição do radical ABTS.

O extrato de *A. nodosum* também foi avaliado (0 a 26 µg/mL de concentração) e a Figura 14 apresenta a curva analítica obtida.



**Figura 14.** Curva analítica das soluções do extrato de *A. nodosum* pelo método de inibição do radical ABTS.

Da mesma maneira, como no método de inibição do radical DPPH, foi calculado o valor de IC<sub>50</sub> para o extrato de *A. nodosum* e para o ácido ascórbico. Os valores obtidos foram 19,18 e 1,98 µg/mL, respectivamente. Estes valores indicam que o ácido ascórbico é uma substância antioxidante mais potente que o extrato de *A. nodosum*, porém a quantidade de extrato necessária para inibir 50% dos radicais ABTS em solução não é significativamente alta quando comparada com outros extratos. Chiari (2011) avaliou a atividade antioxidante de extrato de goiaba (extração com etanol 70° GL) e obteve IC<sub>50</sub> de 0,1144mg/mL, sendo aproximadamente 6 vezes maior que o obtido para o extrato de *A. nodosum*.

### **1.3.3. Comparação da atividade antioxidante pelos métodos de inibição do radical DPPH e do radical ABTS**

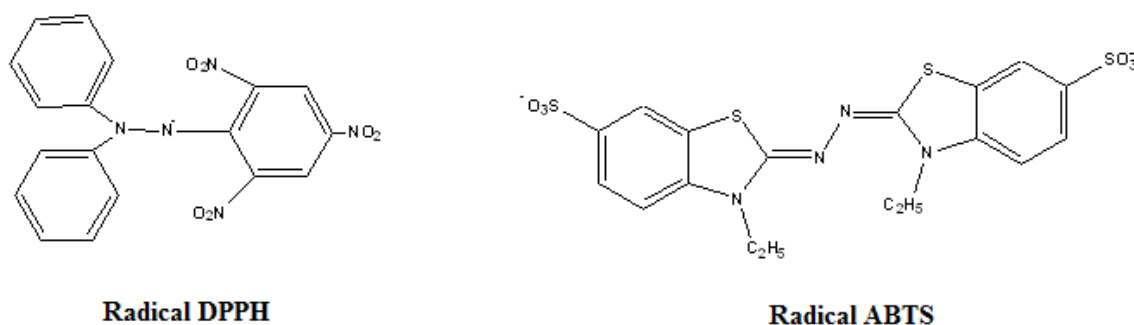
Quando os valores de IC<sub>50</sub> do ácido ascórbico são comparados com os valores de IC<sub>50</sub> para o extrato de *A. nodosum*, em ambos os métodos (DPPH e ABTS), os valores para o ácido ascórbico são menores, o que significa que uma menor concentração de ácido ascórbico é necessária para que a mesma atividade seja atingida. Para o método de inibição do radical DPPH, a concentração do extrato deve ser aproximadamente 17 vezes maior que a do ácido ascórbico e, pela metodologia do ABTS<sup>++</sup>, a concentração do extrato deve ser aproximadamente 10 vezes maior que a do ácido ascórbico. Este fato sugere que a metodologia do ABTS<sup>++</sup> é mais sensível.

Apesar de o ácido ascórbico ser uma referência em relação a sua atividade antioxidante, seu emprego em preparações cosméticas é dificultado devido à baixa estabilidade (Kleszczewska, 2000). Neste caso, para melhorar a estabilidade do ácido ascórbico, uma alternativa é sintetizar derivados, o que demanda tempo e nem sempre apresentam alto rendimento. Por estes motivos, a utilização de extratos vegetais com atividade antioxidante pode ser uma boa opção, pois além de não necessitarem de síntese, possuem vários compostos, que podem apresentar ação sinérgica possibilitando o desenvolvimento de produtos cosméticos multifuncionais. Desta forma, a incorporação do extrato de *A. nodosum* em bases cosméticas, mesmo que em maior concentração que a do ácido ascórbico, parece ser bastante viável.

Os resultados entre as diferentes metodologias nem sempre são iguais (Okonogi et al., 2007) e, em pesquisas realizadas em nosso grupo, aplicando a mesma metodologia em outros

extratos, foi verificado que não existe uma proporcionalidade entre os resultados obtidos pelo método de inibição do radical DPPH e do radical ABTS. Provavelmente, isto seja devido ao fato de que o radical DPPH e o radical ABTS apresentam diferenças estereoquímicas em sua estrutura (Figura 15) o que pode gerar influência no mecanismo de reação dos diferentes compostos antioxidantes presentes em extratos vegetais (Wang et al., 1998; Prior & Cao, 1999; Arnao, 2000; Yu et al., 2002; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008).

Com resultados anteriores obtidos por Almeida et al (2012), é possível inferir que o impedimento estérico dos compostos antioxidantes presentes no extrato também influencia na reação, uma vez que quanto maior o impedimento estérico dos compostos antioxidantes (por exemplo, compostos fenólicos), maior é a facilidade de reagir com radicais ABTS, uma vez que o elétron livre de sua estrutura não está na cavidade da estrutura como ocorre com o radical DPPH (Arnao, 2000; Prior et al., 2005; Pérez-Jiménez & Saura-Calixto, 2008, Dudone et al., 2009).



**Figura 15.** Estrutura química dos radicais DPPH e ABTS.

Frente aos resultados obtidos, o extrato de *A. nodosum* apresenta potencial promissor para incorporação em bases cosméticas, uma vez que foi verificada a presença de compostos fenólicos em sua composição e potencial antioxidante em baixas concentrações, o que significa que com pouca quantidade de extrato pode ser obtida elevada atividade antioxidante.

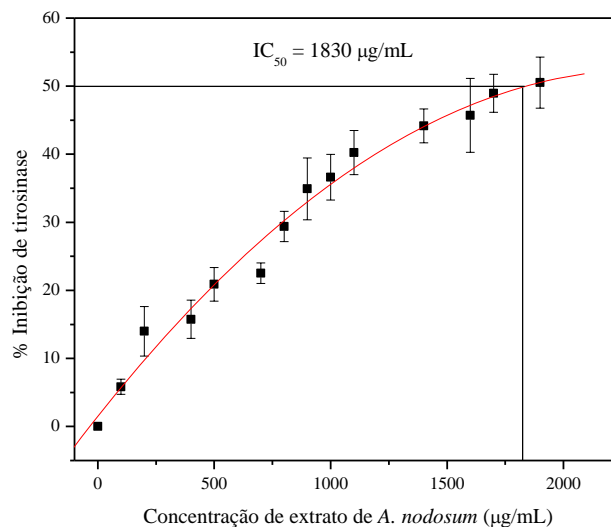
#### 1.4. Determinação da atividade inibidora de tirosinase

A tirosinase é uma enzima cobre-dependente (metaloenzima) que participa da biossíntese de melanina, pigmento responsável pela coloração da pele de mamíferos.

Compostos que inibem a ação desta enzima podem ser utilizados em produtos cosméticos a fim de diminuir a produção de melanina e assim, clarear a pele.

Uma das reações no processo de biossíntese de melanina catalisada pela tirosinase é a oxidação da L-dopa a dopaquinona, portanto, como o extrato de *A. nodosum* apresentou potencial antioxidante, também foi avaliado seu potencial de inibir a atividade da tirosinase.

A Figura 16 apresenta o perfil de inibição de tirosinase causada pelo extrato.



**Figura 16.** Perfil de inibição de tirosinase pelo extrato de *A. nodosum*.

De acordo com a Figura 16 o valor obtido para o  $IC_{50}$  foi de 1830  $\mu\text{g/mL}$ , podendo considerar o extrato com potencial atividade inibitória de tirosinase. Entretanto, para obtenção da Figura 16, devido à solução de extrato de *A. nodosum* apresentar coloração marrom e interferir na absorvância real da reação final, foram realizadas leituras sem adição de tirosinase, apenas com L-dopa e amostra, para calcular a absorvância da reação (equação 8):

$$A_{real} = A_{final} - A_{controle} \text{ (Equação 8),}$$

onde:

$A_{real}$  = absorvância real da amostra;

$A_{final}$  = absorvância experimental da amostra;

$A_{controle}$  = absorvância do branco da reação (todos os reagentes exceto a enzima).

Kang et al. (2004) avaliou 17 extratos de algas de 3 diferentes filos (2 espécies do filo *Chlorophyta*, 11 espécies do filo *Rhodophyta* e 4 espécies do filo *Phaeophyta* destas, 3 da espécie *Sargassum* e uma da espécie *Ecklonia*) e apenas o extrato de *Ecklonia stolonifera* apresentou valor exato de  $IC_{50}$  para atividade inibitória de tirosinase 345  $\mu\text{g/ml}$ , para os extratos restantes foram testadas concentrações até 500  $\mu\text{g/ml}$  e não foi possível obter o valor de  $IC_{50}$ .

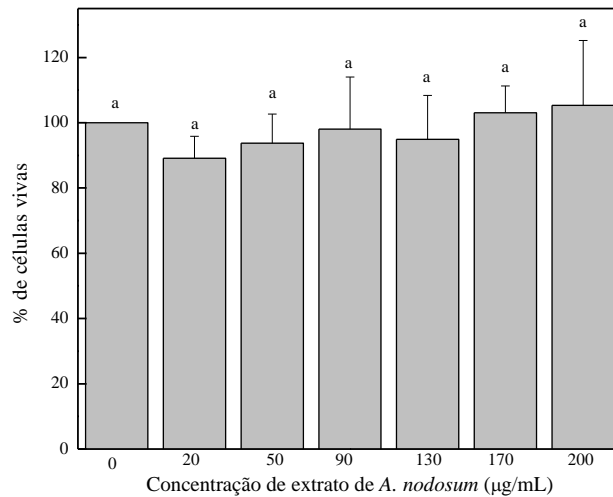
Comparando estes resultados com o obtido para o extrato de *A. nodosum* é possível supor que algas marinhas apresentam atividade inibitória de tirosinase, porém são necessárias concentrações superiores daquelas necessárias para atingir o  $IC_{50}$  do potencial antioxidante, sendo desta forma mais adequado indicar o extrato proposto como um agente antienvhecimento, devido a sua atividade antioxidante, do que sugerir atividade despigmentante, a qual poderia até ser considerada quando o extrato for aplicado em elevadas concentrações.

## **2. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de *A. nodosum* em células HepG2 e HaCat**

Para a avaliação da citotoxicidade do extrato de *A. nodosum* foram utilizadas linhagens celulares HepG2 (células de hepatoma humano) que, por ser uma célula metabolizadora, permite que a toxicidade do metabólito do produto em estudo possa ser avaliada (Chiari et al, 2012a) e HaCat (queratinócitos) por se tratar de um ativo de uso tópico e, portanto, aplicado sobre a pele na qual o principal tipo celular é o queratinócito.

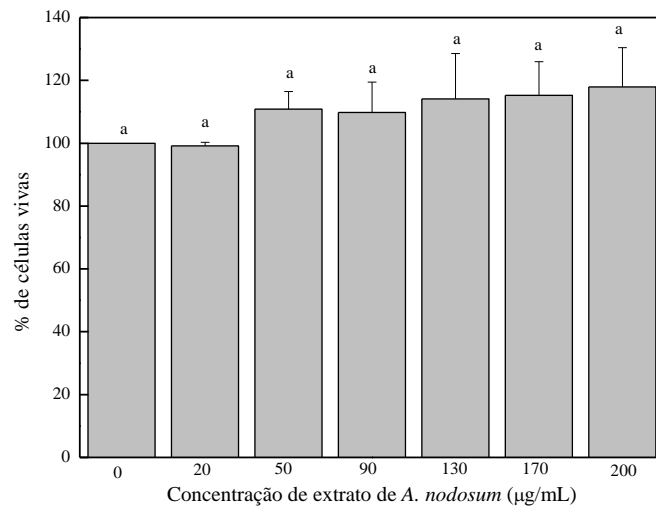
A Figura 17 apresenta o perfil dose-resposta para a linhagem de HaCat. Observando o perfil obtido foi verificado que concentrações de extrato de *A. nodosum* em concentrações de até 200  $\mu\text{g/mL}$  não são tóxicas para células desta linhagem. A porcentagem de células viáveis

presentes para cada concentração estudada apresentou-se próxima a 100% não sendo estatisticamente significativa a variação entre as concentrações estudadas.



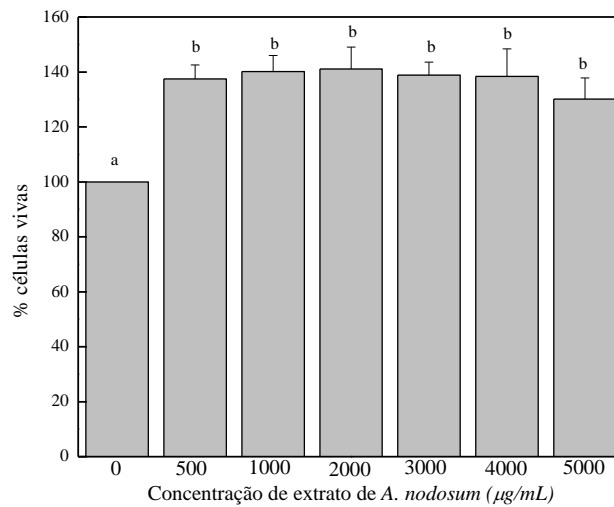
**Figura 17.** Perfil dose-resposta para as células HaCat após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *A. nodosum*.

Para a linhagem de HepG2 o mesmo procedimento foi realizado e foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados. A Figura 18 apresenta o perfil dose-resposta para o estudo em células HepG2.

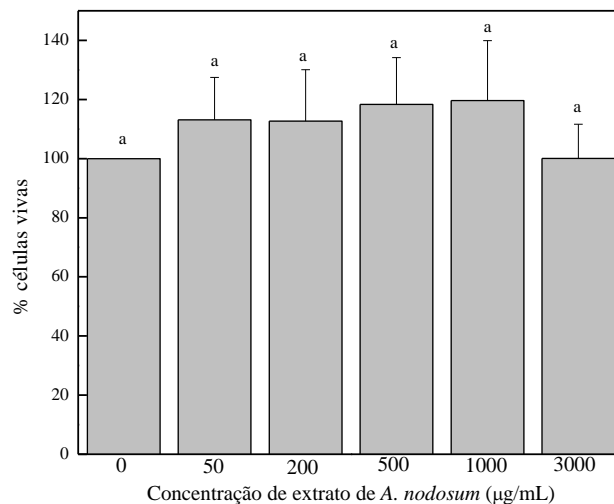


**Figura 18.** Perfil dose-resposta para as células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *A. nodosum*.

Estes resultados são promissores, pois a concentração máxima testada (200 µg/mL) é dez vezes maior que a concentração necessária para inibir 50% de radicais ABTS. Sendo assim, o extrato pode ser considerado seguro para utilização em cosméticos antienvhecimento. Porém, como a concentração de extrato de *A. nodosum* necessária para inibir 50% da atividade da tirosinase é 1830 µg/mL foi necessário o aumento da concentração testada para avaliação do potencial citotóxico. Para células da linhagem HaCat foram testadas concentrações de até 5000 µg/mL e para células HepG2 até 3000 µg/mL. As Figuras 19 e 20 apresentam os resultados obtidos.



**Figura 19.** Perfil dose-resposta para as células HaCat após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *A. nodosum*.



**Figura 20.** Perfil dose-resposta para as células HepG2 após tratamento com diferentes concentrações de extrato de *A. nodosum*.

Observando a Figura 19 foi possível verificar um aumento significativo na quantidade de células vivas após o tratamento da linhagem celular HaCat com o extrato de *A. nodosum*. Este fato pode ter ocorrido devido a um aumento do metabolismo celular que pode ter sido provocado pelas substâncias presentes no extrato (carboidratos, aminoácidos e estimulantes de



crescimento de plantas) (Campo & Flores, 2012). Entretanto, não houve morte celular após o tratamento e, por este motivo, o extrato pode ser considerado seguro.

Para a linhagem celular HepG2 (Figura 20) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de células vivas no controle negativo (concentração de extrato nula) e os tratamentos com extrato, não havendo morte celular significativa para nenhuma das concentrações testadas.

Portanto, a utilização do extrato de *A. nodosum* em produtos cosméticos com até 3000 µg de extrato/g de formulação pode ser considerada segura para as linhagens celulares avaliadas.

### **3. Validação da metodologia de quantificação pelo método de inibição do radical ABTS**

A validação de uma metodologia é realizada quando se tem a necessidade de demonstrar que o método é apropriado para a avaliação desejada, seja determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias utilizadas com finalidade farmacêutica (Randau et al., 2005).

Para a quantificação do extrato de *A. nodosum* foi utilizada a avaliação do potencial antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS devido à necessidade de avaliar a atividade antioxidante total do extrato e não de apenas uma das substâncias que o compõe.

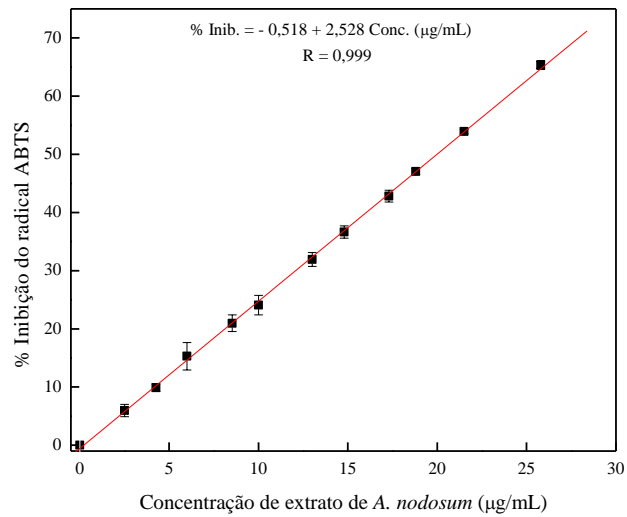
O método foi validado de acordo com a Resolução-RE Nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Segundo esta resolução, a validação deve garantir a confiabilidade dos resultados, portanto, a validação da metodologia de quantificação do extrato de *A. nodosum* pelo método ABTS foi realizada com a finalidade de demonstrar que a quantificação do extrato de *A. nodosum* por esta metodologia é adequada para o desenvolvimento deste.

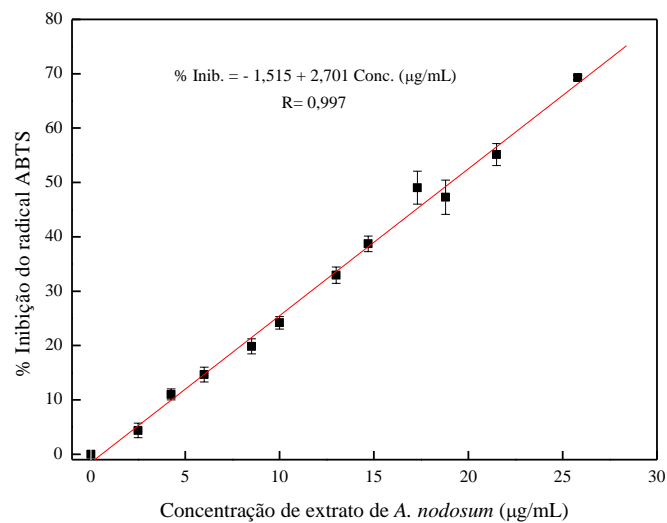
#### **3.1. Linearidade**

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, 2003b).

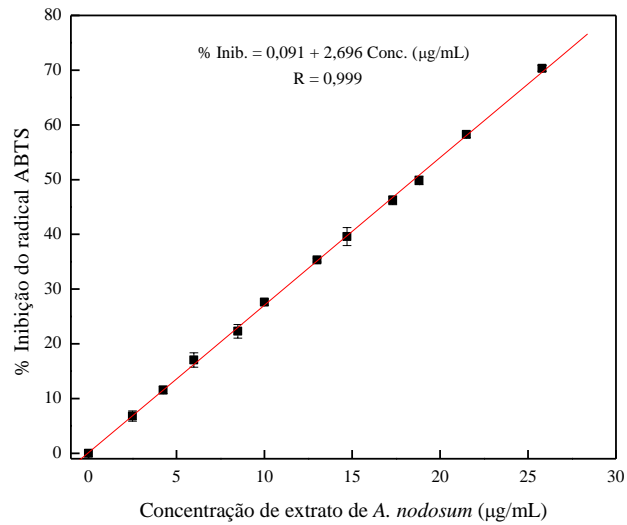
Foram construídas três curvas analíticas da porcentagem de inibição do radical ABTS frente à concentração de extrato de *A. nodosum* (Figuras 21 a 23).



**Figura 21.** Curva analítica 1 para avaliação da linearidade do método.

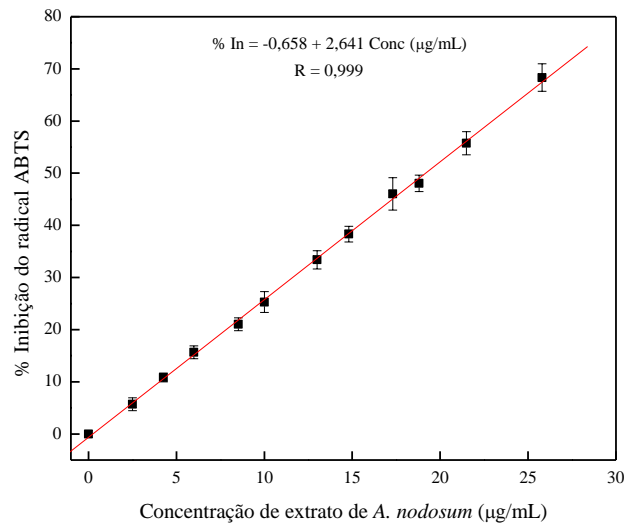


**Figura 22.** Curva analítica 2 para avaliação da linearidade do método.



**Figura 23.** Curva analítica 3 para avaliação da linearidade do método.

Analisando o perfil das três curvas obtidas o método foi considerado linear. 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 24).



**Figura 24.** Média das três curvas para avaliação da linearidade do método.

A partir da equação da reta obtida por regressão linear para a média das três curvas é possível à quantificação do extrato de *A. nodosum* através desta metodologia, porém outros parâmetros foram avaliados para que a validação fosse concluída.

### 3.2. Exatidão

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

Para a avaliação da exatidão do método analítico foram utilizadas três concentrações conhecidas, denominadas concentrações teóricas, que foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante pela metodologia proposta, por meio da equação da reta da média das curvas experimentais obtida no ensaio da linearidade, as concentrações experimentais foram calculadas. Em seguida, a exatidão do método foi determinada segundo a ANVISA (2003) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Avaliação da exatidão do método analítico para quantificação do extrato de *A. nodosum*.

CT ( $\mu\text{g/ml}$ )	CE 1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CE 2 ( $\mu\text{g/ml}$ )	CE 3 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Exatidão (%)
6,0	5,4	5,9	5,8	96,6666
13,0	13,3	12,8	12,3	98,4615
21,5	21,4	20,8	20,9	98,1395

CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental.

Analisando os resultados concluiu-se que o método é exato, uma vez que as variações entre as concentrações teóricas e experimentais não excederam 5% (ANVISA, 2003b).

### 3.3. Limite de detecção e quantificação

Durante a validação de um método analítico é necessário que seja determinada a menor quantidade de analito presente na amostra que possa ser detectada pelo método desenvolvido (limite de detecção) e também a menor quantidade de analito que pode ser

determinada com precisão e exatidão aceitáveis (limite de quantificação) nas condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003b).

Os valores de limite de detecção e limite de quantificação foram calculados segundo as equações 4 e 5, respectivamente. A Tabela 5 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 5.** Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

	<b>Interceptação com o eixo Y</b>
<b>Curva Analítica 1</b>	- 0,5184
<b>Curva Analítica 2</b>	- 1,5157
<b>Curva Analítica 3</b>	- 0,0286
<b>Desvio padrão</b>	0,7578
<b>Inclinação da curva</b>	2,641
<b>Limite de detecção (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	0,86
<b>Limite de quantificação (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	2,87

Analisando os resultados foi possível concluir que a mínima concentração detectável pelo método proposto é  $0,86 \mu\text{g/mL}$  e a menor quantidade capaz de ser detectada com exatidão e precisão aceitável é  $2,87 \mu\text{g/mL}$ . Estes resultados comprovam que a metodologia proposta é adequada para finalidade de uso, já que a quantidade de analito necessária para atividade antioxidante é de aproximadamente  $20 \mu\text{g/mL}$ , quase dez vezes maior que o limite de quantificação do método.

### 3.4. Precisão

A avaliação da precisão do método é realizada para analisar a proximidade dos resultados em medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão é avaliada em três níveis: repetitividade ou precisão intra-corridas; precisão intermediária ou precisão inter-corridas e, reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial.

### 3.4.1. Repetitividade ou precisão intra-corridas

A avaliação da repetitividade foi realizada utilizando-se três diferentes concentrações da curva analítica obtida para determinação da atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum*. A menor concentração avaliada foi de 10,0 µg/mL, valor aproximadamente cinco vezes maior que o limite de quantificação, para garantir que o analito está sendo quantificado. Segundo a metodologia descrita pela ANVISA (2003b), os valores de desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5% para que o método seja considerado preciso.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para avaliação da repetitividade do método.

**Tabela 6.** Avaliação da repetitividade do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

	CT (µg/ml)	CE 1 (µg/ml)	CE 2 (µg/ml)	CE 3 (µg/ml)	Média	Desvio padrão	DPR (%)
C1	10,0	9,6	9,2	9,3	9,5	0,31	3,26
C2		9,6	9,8	9,2			
C1	14,7	13,8	14,0	14,6	14,5	0,55	3,79
C2		15,3	15,1	14,3			
C1	21,5	20,6	20,8	20,5	20,9	0,57	2,73
C2		22,0	20,7	20,6			

\*CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; C1: Valor obtido na leitura do período 1; C2: Valor obtido na leitura do período 2; DPR: Desvio Padrão Relativo.

Observando os resultados foi possível verificar que para todas as concentrações avaliadas nenhuma apresentou DPR maior que 5%, portanto, o método apresenta repetitividade.

### 3.4.2. Precisão intermediária ou precisão inter-corridas

A avaliação da precisão intermediária foi realizada da mesma maneira que a avaliação da repetitividade. Segundo a metodologia descrita pela ANVISA (2003), os valores de desvio padrão relativo (DPR) não podem ultrapassar 5% para que o método seja considerado preciso.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para avaliação da precisão intermediária do método.

**Tabela 7.** Avaliação da precisão intermediária do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

	CT	CE 1	CE 2	CE 3	Média	Desvio	DPR
	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)	(µg/ml)		padrão	(%)
<b>C 1</b>	10,0	9,7	9,8	9,2	10,04	0,50	4,98
<b>C2</b>		10,5	10,6	10,5			
<b>C1</b>	14,7	15,3	15,1	14,3	15,0	0,51	3,40
<b>C2</b>		14,5	15,7	15,4			
<b>C1</b>	21,5	22,0	20,7	20,6	21,6	0,750	3,47
<b>C2</b>		22,1	22,5	22,2			

\*CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; C1: Valor obtido na leitura do dia 1; C2: Valor obtido na leitura do dia 2; DPR: Desvio Padrão Relativo.

Os resultados obtidos não apresentaram DPR maior que 5%, portanto, o método apresenta precisão intermediária.

### 3.4.3. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade também foi avaliada utilizando-se três diferentes concentrações e o DPR não pode ultrapassar 5% para que o método seja considerado reprodutível (ANVISA, 2003b).

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos para avaliação da reprodutibilidade do método.

Mais uma vez os valores de DPR não ultrapassaram 5% e, portanto, o método foi considerado reprodutível.

Em todos os ensaios para verificar a precisão do método o DPR apresentou-se menor ou igual a 5%, desta forma o método proposto para a avaliação da atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum* é considerado preciso.

**Tabela 8.** Avaliação da reprodutibilidade do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

<b>CT</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 1</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 2</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 3</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b> <b>padrão</b>	<b>DPR (%)</b>
6,2	6,9	6,3	6,6	6,5	0,31	4,77
13,4	14,2	13,8	13,6	13,7	0,34	2,48
22,3	21,7	21,8	22,2	22,0	0,29	1,32

\*CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.

### 3.5. Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade são avaliadas durante o processo de validação de metodologia, uma vez que é necessário ter a certeza de que o método é capaz de avaliar a atividade do analito mesmo na presença de outros componentes, como impurezas, produtos de degradação ou componentes da matriz na qual o analito está inserido (ANVISA, 2003b).

Por este motivo, soluções do analito de três diferentes concentrações foram contaminadas com concentração adequada de creme base (concentração que não causa turvação da amostra) e os valores experimentais obtidos foram comparados com o valor teórico das concentrações do extrato (concentração conhecida no momento do preparo).

A Tabela 9 apresenta os resultados da avaliação da especificidade e seletividade do método proposto para avaliação da atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum*.

**Tabela 9.** Avaliação da especificidade e seletividade do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

<b>CT</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 1</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 2</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>CE 3</b> <b>(µg/ml)</b>	<b>Média</b>	<b>Desvio</b> <b>padrão</b>	<b>DPR (%)</b>
6,2	5,8	6,2	6,2	6,1	0,20	3,28
13,4	12,2	12,1	13,0	12,7	0,63	4,96
22,3	20,7	20,9	20,3	21,0	0,87	4,14

\*CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.



Os resultados apresentaram valor de DPR menor que 5%, portanto o método é específico e seletivo para o extrato de *A. nodosum*.

### 3.6. Robustez

A robustez do método é avaliada pela capacidade de manter sua confiabilidade ao ser exposto a pequenas variações, por exemplo, mudança de fornecedor de solvente, variações mínimas no valor de pH das soluções, entre outros. Neste caso, foi realizada a mudança de fornecedor do solvente utilizado, o etanol, em relação ao utilizado para obtenção da curva analítica e realização de todos os outros ensaios para validação do método. A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos.

**Tabela 10.** Avaliação da robustez do método analítico para determinação de extrato de *A. nodosum*.

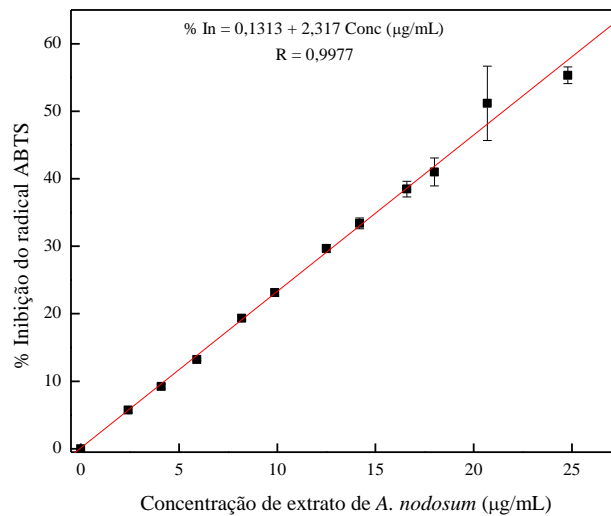
CT (µg/ml)	CE 1 (µg/ml)	CE 2 (µg/ml)	CE 3 (µg/ml)	Média	Desvio padrão	DPR (%)
6,2	6,6	6,9	6,9	6,6	0,33	5,00
13,4	14,5	13,3	14,6	14,0	0,69	4,93
22,3	24,8	24,6	22,4	24,0	1,1	4,58

\*CT: Concentração Teórica; CE: Concentração Experimental; DPR: Desvio Padrão Relativo.

Os valores de DPR não ultrapassaram 5%, portanto o método foi considerado robusto.

### 3.7. Curva analítica com solvente diferente

Para a avaliação da estabilidade química do fitocosmético e avaliação da retenção cutânea houve a necessidade de uma curva analítica do método de inibição do radical ABTS utilizando como sistema solvente uma mistura de etanol e água destilada na proporção de 8:2, v/v (Figura 25).



**Figura 25.** Curva analítica para quantificação de extrato de *A. nodosum* utilizando como solvente mistura etanol:água (8:2).

A partir da equação da reta foi possível quantificar o extrato de *A. nodosum* durante a estabilidade química e na avaliação da retenção cutânea.

#### 4. Preparo das formulações

Para o preparo das formulações foram utilizados *Cetearyl Alcohol* (4,0% m/m) e *Ceteareth-20* (2,0% m/m).

O *Cetearyl Alcohol* foi escolhido por apresentar propriedades emolientes, emulsificantes e doadora de consistência em produtos cosméticos, além de proporcionar estabilidade às formulações e suavidade à pele (Mapric, 2012a).

O *Ceteareth-20* foi escolhido, pois, além de apresentar característica emulsionante é compatível com alcoóis graxos e pode ser utilizado como agente de consistência. Seu valor de EHL (equilíbrio hidrófilo-lipófilo) garante a obtenção de emulsões O/A favorecendo a formação de emulsões com estabilidade até em meio alcalino (Mapric, 2012b).

O tensoativo escolhido foi mantido para as quatro formulações preparadas, assim como os demais componentes, exceto os agentes de consistência que foram modificados a fim de se obter formulações estáveis. Os agentes de consistência utilizados foram *Glyceryl Stearate*, *Ammonium Acryloyldimethyltaurate VP Copolymer* e *Sodium polyacrylate (and)*

*Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6* sendo o primeiro lipofílico e o segundo e o terceiro espessantes hidrofilicos.

O *Glyceryl Stearate* é um emulsificante secundário não iônico, ou doador de consistência à formulação, pois colabora para a estabilidade do sistema (Embrafarma, 2012).

O *Ammonium Acryloyldimethyltaurate VP Copolymer* é um polímero pré-neutralizado que permite a formação de géis com características de consistência excelente, além de ser estável em ampla faixa de pH (4,0 a 9,0). Possui a desvantagem de ser incompatível com eletrólitos (PharmaSpecial, 2012).

O *Sodium polyacrylate (and) Hydrogenated Polydecene (and) Trideceth-6* é um homopolímero aniônico pré-neutralizado que foi especialmente desenvolvido para processos de fabricação de emulsão a frio, mas também pode ser utilizado em preparações pela técnica convencional de aquecimento. Este produto apresenta desempenho superior a outros espessantes e estabilizantes comuns e respondem imediatamente como emulsionante conferindo à formulação viscosidade durante o processo de fabricação. O produto pode ser utilizado em ampla faixa de pH (5,5 a 11,0) e promove sensorial sedoso e suave às formulações cosméticas (Deg, 2012).

Para a incorporação do extrato aquoso de *A. nodosum* nas formulações base foram obedecidos alguns critérios para definição da concentração a ser utilizada. Foram considerados os valores de  $IC_{50}$  obtidos para a atividade antioxidante e inibidora de tirosinase, além da consideração de que a formulação não libera 100% de ativo.

Desta maneira foi determinada a concentração de 1,2% de extrato para incorporação nas formulações base (este valor corresponde a 12000  $\mu\text{g}$  de extrato/g de formulação). Considerando que no ensaio de avaliação do perfil de liberação *in vitro* foram utilizados aproximadamente 0,3 g de creme em uma área de aplicação de 1,77  $\text{cm}^2$ , a concentração máxima que poderia ser liberada da formulação seria 2033  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , este valor corresponde a concentração em  $\mu\text{g}$  de extrato/mL de solução ou  $\mu\text{g}$  de extrato/g de formulação. Portanto, se fosse liberado 100% do ativo da formulação este valor seria 39 vezes maior que a concentração necessária para atingir o  $IC_{50}$  da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH, 106 vezes maior que a concentração necessária para atingir o  $IC_{50}$  da atividade antioxidante pelo método de inibição do radical ABTS, e é maior que o  $IC_{50}$  para atividade inibitória de tirosinase e está dentro da faixa segura de toxicidade para as células HepG2 e HaCat.

A formulação F1, que contém *Ammonium Acryloyldimethyltaurate VP Copolymer*, apresentou aumento de viscosidade 24 horas após o preparo, porém com a adição do extrato de *A. nodosum* a viscosidade diminuiu deixando a formulação mais fluida. Já a formulação F2, que contém *Glyceryl Stearate*, não adquiriu viscosidade após 24 horas do preparo e, depois de 48 horas apresentou separação de fases.

As formulações F3 e F4 por possuírem em sua composição *Sodium polyacrylate*, *hydrogenated polydecene*, *tridecyl-6*, que é um espessante hidrofílico com características de oferecer viscosidade imediatamente, adquiriram viscosidade durante o preparo. Após a adição do extrato de *A. nodosum* a viscosidade destas formulações diminuiu, porém, ainda com valores suficientes para serem utilizadas em produtos cosméticos de aplicação facial.

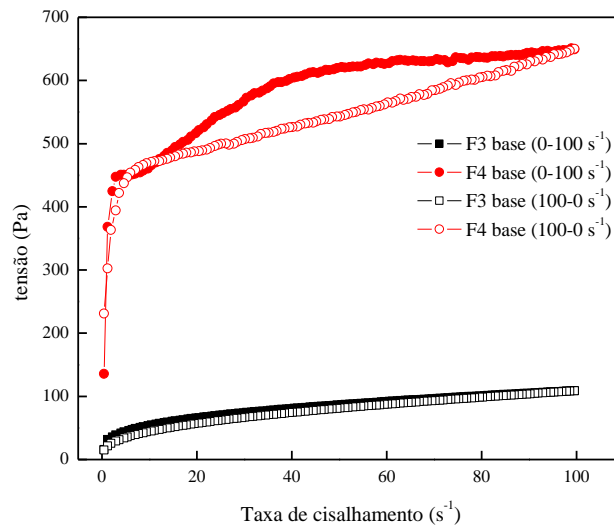
Sendo assim, as formulações F3 e F4 foram avaliadas quanto às características reológicas e perfil de liberação a fim de verificar qual delas apresentava melhor perfil para nossa proposta.

## **5. Caracterização reológica das formulações base e fitocosmética**

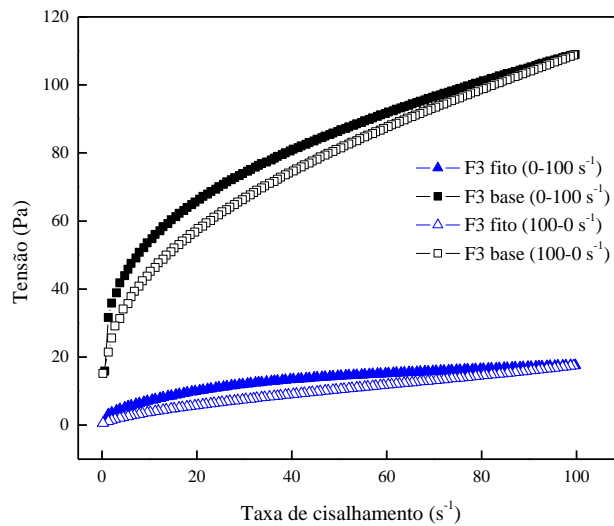
O interesse pela caracterização reológica de produtos farmacêuticos e cosméticos tem aumentado nos últimos anos, isto porque a reologia serve para verificar não somente a qualidade de uma preparação cosmética tópica, mas também permite sugerir comportamento que garantam sua eficácia (Almeida & Bahia, 2003; Gregolin et al., 2010). Com estas análises podem ser estudadas propriedades importantes necessárias durante a fabricação, estocagem e aplicação de produtos tópicos (Almeida & Bahia, 2003).

Na determinação do comportamento reológico de emulsões são avaliadas características físico-químicas da formulação sendo possível detectar sinais precoces de instabilidade, fato importante para o desenvolvimento de produtos (Gallegos & Franco, 1999; Masson et al., 2005). Além disso, as propriedades reológicas podem estar relacionadas com a espalhabilidade e liberação do ativo (Chiari et al., 2012c).

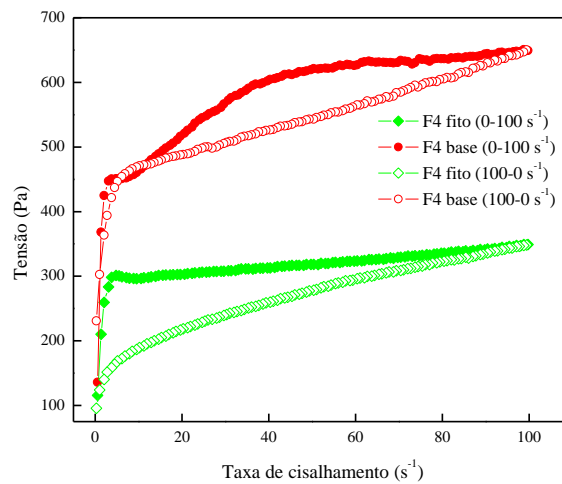
Nas figuras 26, 27, 28 e 29 estão apresentadas curvas de fluxo das formulações F3 base e fito e F4 base e fito.



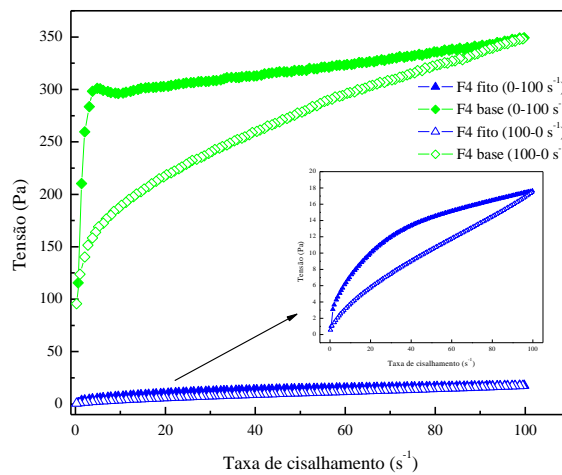
**Figura 26.** Curvas de fluxo das formulações F3 base e F4 base.



**Figura 27.** Curvas de fluxo F3 base e F3 fito.



**Figura 28.** Curvas de fluxo F4 base e F4 fito.



**Figura 29.** Curvas de fluxo F3 fito e F4 fito.

Analisando as figuras 26, 27, 28 e 29 pode ser observado que não existe uma relação linear entre a taxa de cisalhamento e a tensão, característica de fluidos não-Newtonianos (Milan et al, 2007). Também foi verificado que os sistemas avaliados são descritos pelo modelo de Herschel-Bulkley, pois necessitam de uma tensão inicial para começarem a fluir (Alexandrou et al, 2001; Dogan et al., 2008), exceto F3 fito que não apresentou limite de escoamento.

Além disso, foi observada uma área, denominada área de histerese, entre as curvas ascendentes e descendentes, caracterizando que as formulações não recuperam sua estrutura inicial com a redução da taxa de cisalhamento. O valor médio da área de histerese de cada formulação está descrito na Tabela 11.

**Tabela 11.** Média e desvio padrão da área de histerese das formulações.

<b>Formulação</b>	<b>Média ± DP</b>
<b>F3 base</b>	517,92 ± 20,53 <sup>a</sup>
<b>F3 fito</b>	312,32 ± 17,52 <sup>b</sup>
<b>F4 base</b>	4229,08 ± 934,55 <sup>c</sup>
<b>F4 fito</b>	4860,93 ± 49,44 <sup>c</sup>

DP: Desvio Padrão; a, b, c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

As formulações F3 base e fito apresentaram valores de área de histerese relativamente menores que os valores obtidos para F4 base e fito. Este fato sugere que as formulações F4 apresentam melhor espalhabilidade, pois necessitam de tempo maior para retornar à estrutura inicial facilitando o espalhamento (Isaac et al., 2012), isto também pode refletir na escolha da embalagem ideal para o acondicionamento da formulação, uma vez que formulações que fluem ao sofrer aplicação de tensão podem, por exemplo, ser acondicionada em embalagens do tipo bisnaga.

Outra observação possível de feita é em relação à viscosidade das formulações base. A viscosidade significativamente diferente obtida entre elas pode ser devido à maior concentração do espessante hidrofílico em F4, uma vez que esta é a única diferença entre as formulações.

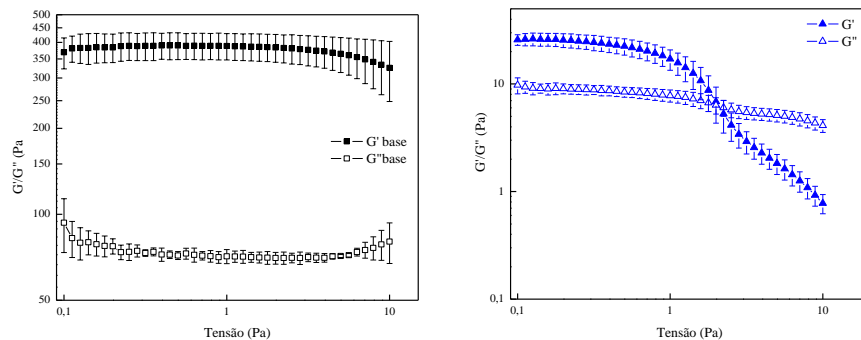
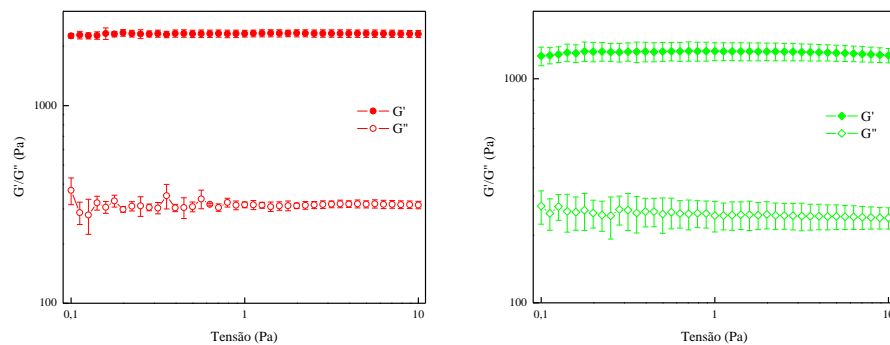
Além disso, a adição de extrato de *A. nodosum* às formulações base é traduzida na diminuição da viscosidade. A Tabela 12 apresenta os valores de viscosidade mínima aparente (valor de viscosidade na taxa máxima de cisalhamento).

**Tabela 12.** Viscosidade mínima aparente (Pa.s).

Formulação	Média ± DP
F3 base	1,093 ± 0,004 <sup>a</sup>
F3 fito	0,177 ± 0,007 <sup>b</sup>
F4 base	6,509 ± 0,164 <sup>c</sup>
F4 fito	3,504 ± 0,013 <sup>d</sup>

DP: Desvio Padrão; a, b, c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Também foi realizado o ensaio de varredura de tensão para que fosse determinada a região de viscoelasticidade linear. Neste ensaio a frequência foi mantida constante (1,0 Hz) e a tensão foi variada de 0 – 10 Pa a fim de determinar intervalos de tensão que as amostras não sofrem danos em sua estrutura, mas que possam fluir. As Figuras 30 e 31 apresentam os gráficos obtidos para varredura de tensão das formulações F3 e F4, respectivamente.

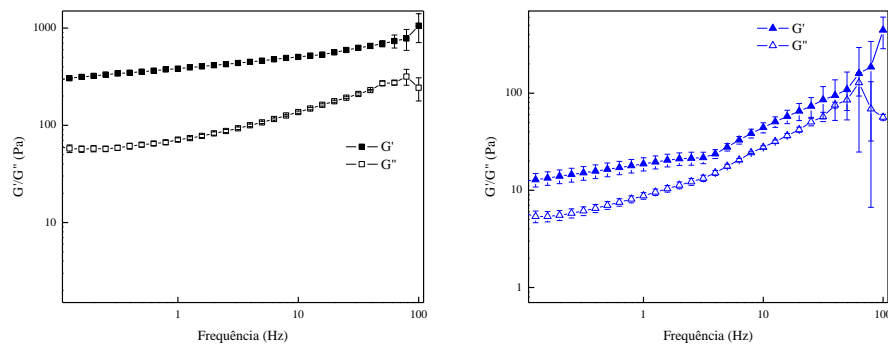
**Figura 30.** Varredura de tensão F3 base e F3 fito, respectivamente.**Figura 31.** Varredura de tensão F4 base e F4 fito, respectivamente.



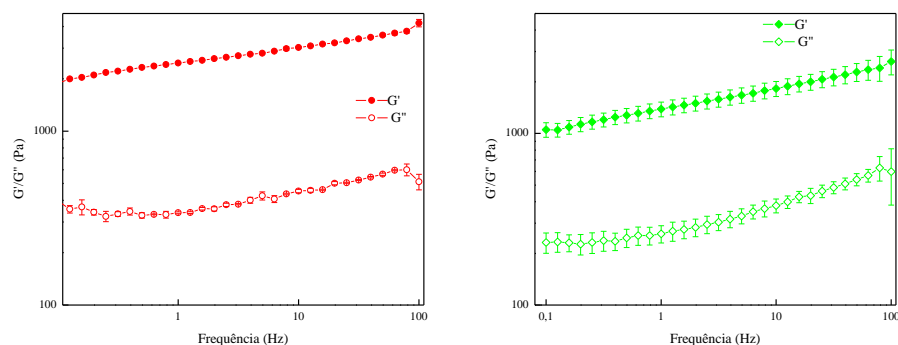
Analisando a Figura 30 foi verificado que a formulação F3 base apresenta viscoelasticidade linear na faixa de 0,5 a 4,0 Pa enquanto para F3 fito, tensões acima de 1,0 Pa já são suficientes para promover alterações estruturais da formulação (Chiari, 2011).

Ao observar a Figura 31 verificou-se que tensões entre 1,0 e 10,0 Pa compreendem a região de viscoelasticidade linear não sofrendo alterações em sua estrutura para esta faixa de tensão. Sendo assim, os ensaios oscilatórios (varredura de frequência e fluência e relaxação) foram realizados a 1,0 Pa de tensão para as formulações pudessem ser comparadas.

As Figuras 32 e 33 apresentam os gráficos obtidos no ensaio de varredura de frequência, ensaio este utilizado na caracterização de produtos viscoelásticos.



**Figura 32.** Varredura de frequência F3 base e F3 fito, respectivamente.



**Figura 33.** Varredura de frequência F4 base e F4 fito, respectivamente.

A Figura 32 mostra os resultados da varredura de frequência para formulação F3 base e fito. Com este resultado foi verificado que o módulo elástico ( $G'$ ) é superior ao módulo

viscoso ( $G''$ ) o que confere a formulação característica mais elástica que viscosa. Entretanto, a diferença entre os valores de  $G'$  e  $G''$  é menor para a formulação contendo extrato de *A. nodosum* o que caracteriza menor estabilidade do sistema quando comparado à formulação base. Além disso, para a formulação F3 fito existe uma menor tendência à viscoelasticidade, pois  $G'$  e  $G''$  são valores muito baixos e próximos entre si (Tabela 13).

Analisando a Figura 33 as mesmas características de  $G'$  e  $G''$  foram observadas. Para a formulação base a distância entre estes valores são maiores que para a formulação contendo extrato de *A. nodosum* e os valores de  $G'$  e  $G''$  são menores que para a formulação base, este fato reflete a formulação com extrato uma característica menos elástica do que a base. Estes resultados podem ser melhor visualizados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Valor inicial médio de  $G'$  e  $G''$  (Pa) e desvio padrão para a formulação base e fito.

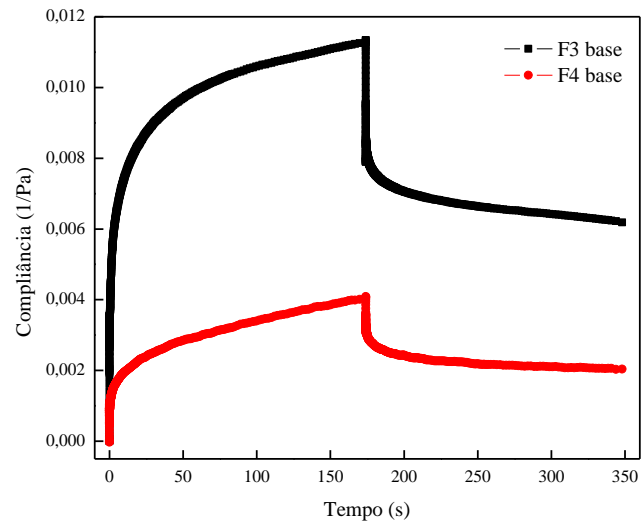
Formulação	$G' \pm DP$	$G'' \pm DP$
<b>F3 base</b>	$291,87 \pm 3,30^a$	$60,71 \pm 5,61^b$
<b>F3 fito</b>	$12,36 \pm 1,89^c$	$5,80 \pm 0,84^d$
<b>F4 base</b>	$1885,67 \pm 37,75^e$	$397,67 \pm 38,68^f$
<b>F4 fito</b>	$1052,90 \pm 102,60^g$	$231,65 \pm 31,46^h$

$G'$ : valor médio do módulo de armazenamento;  $G''$ : valor médio do módulo viscoso; a, b, c, d, e, f, g, h: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

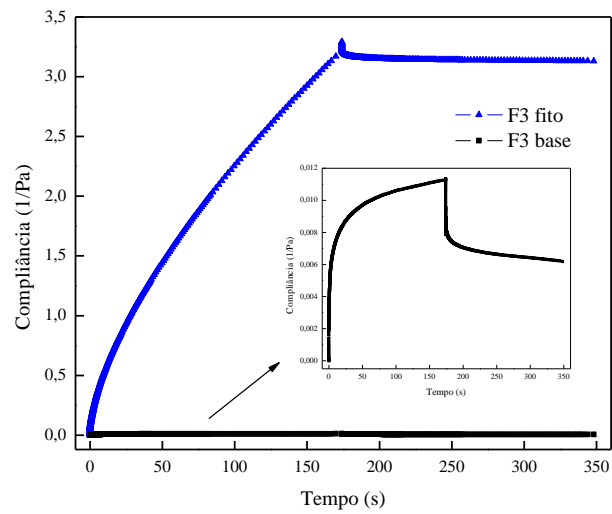
Em seguida a avaliação da varredura de frequência, foi realizado o ensaio de fluência e relaxação a fim de diferenciar as respostas elásticas das viscosas das formulações.

Para comparação entre as formulações F3 e F4 este ensaio foi realizado a tensão de 1,0 Pa, porém para F4 a tensão de 1,0 Pa está próxima ao início da região de viscoelasticidade linear, então o ensaio de fluência e relaxação também foi realizado a 3,0 Pa para melhor caracterização das formulações.

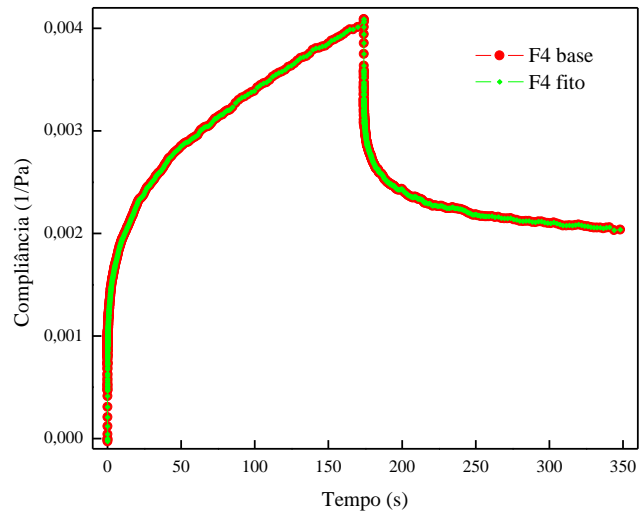
Analisando as Figuras 34, 35, 36 e 37 foi possível a confirmação do ensaio de varredura de tensão, sendo observado que F3 base, F4 base e fito (1 e 3Pa) apresentaram comportamento viscoelásticos e a F3 fito mostrou baixa elasticidade; por isso, não foi capaz de recuperar a estrutura após cessar a tensão aplicada, caracterizando baixa viscoelasticidade. Características viscoelásticas são interessantes em emulsões, pois apresentam comportamento semelhante a sólidos e líquidos ao mesmo tempo (Barry e Warburton, 1968).



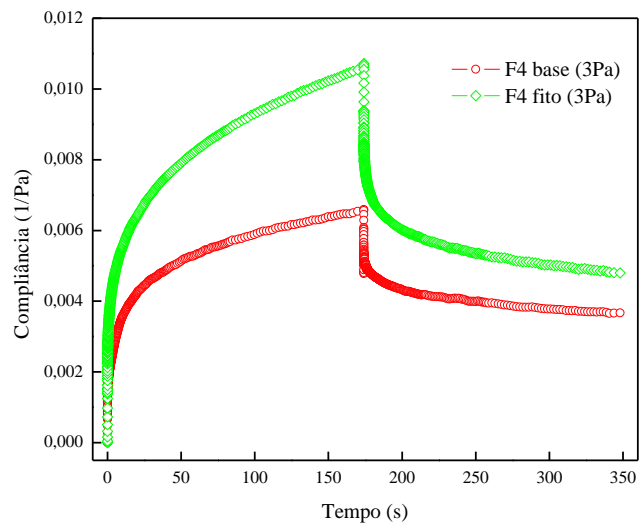
**Figura 34.** Fluência e Relaxação F3 e F4 base (1 Pa).



**Figura 35.** Fluência e Relaxação F3 base e fito (1 Pa).



**Figura 36.** Fluência e Relaxação F4 base e F4 fito (1 Pa).



**Figura 37.** Fluência e Relaxação F4 base e F4 fito (3 Pa).

Exceto F3 fito que apresentou recuperação de aproximadamente 2,7%, as outras formulações apresentaram recuperação de aproximadamente 50,0% de sua estrutura após cessar a aplicação da tensão (Tabela 14).

**Tabela 14** Porcentagem de recuperação das amostras.

<b>Formulação</b>	<b>% Recuperação ± DP</b>
<b>F3 base</b>	49,59 ± 5,63 <sup>a</sup>
<b>F3 fito</b>	2,76 ± 0,36 <sup>b</sup>
<b>F4 base 1Pa</b>	49,56 ± 3,28 <sup>a</sup>
<b>F4 fito 1Pa</b>	49,96 ± 3,85 <sup>a,c</sup>
<b>F4 base 3Pa</b>	44,17 ± 2,40 <sup>a</sup>
<b>F4 fito 3Pa</b>	54,85 ± 3,48 <sup>c</sup>

% Recuperação: média da porcentagem de recuperação; DP: desvio padrão; a,b,c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Além da recuperação, também foi avaliada a compliança (J) que caracteriza quanto o material é capaz de ser deformado. Quanto maior o valor de J maior é a facilidade de deformação e menor é a viscosidade do sistema.

Para as formulações avaliadas verificou-se que F3 fito apresentou maior valor de J e, portanto, menor viscosidade, sendo seguida por F3 base e F4 fito e F4 base, quando comparamos apenas entre a aplicação de igual tensão (1,0 Pa). Quando relacionamos F4 com aplicação de 3,0 Pa de tensão verificou-se que a presença do extrato de *A. nodosum* aumenta o valor de J da formulação base caracterizando diminuição da viscosidade desta formulação, comprovando os resultados obtidos com tensão de 1,0 Pa (Tabela 15).

**Tabela 15.** Valor máximo de compliança (1/Pa) das formulações.

<b>Formulação</b>	<b>J máximo ± DP</b>
<b>F3 base</b>	0,01129 ± 0,00124 <sup>a</sup>
<b>F3 fito</b>	3,21973 ± 0,06045 <sup>b</sup>
<b>F4 base 1Pa</b>	0,00403 ± 0,00015 <sup>c</sup>
<b>F4 fito 1Pa</b>	0,00407 ± 0,00010 <sup>c</sup>
<b>F4 base 3Pa</b>	0,00658 ± 0,00020 <sup>d</sup>
<b>F4 fito 3Pa</b>	0,01061 ± 0,00040 <sup>a</sup>

Jmáximo: média dos valores máximos de compliança; DP: desvio padrão; a,b,c,d: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Todos os resultados observados durante a caracterização reológica das formulações estão em concordância, este fato mostra que os parâmetros utilizados para a realização dos ensaios de caracterização estão corretos.

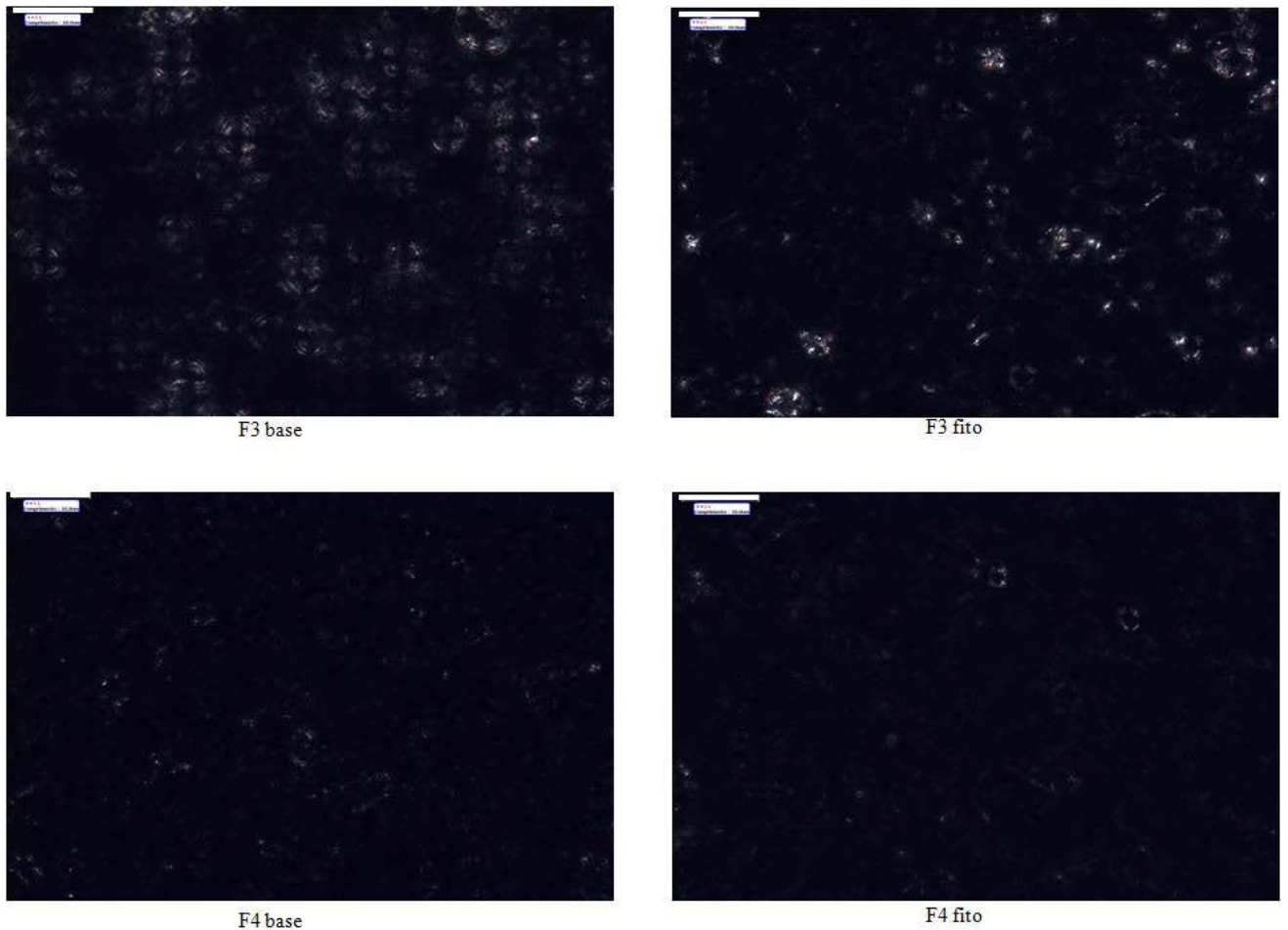
Com os resultados obtidos foi possível verificar que a formulação F3 fito apresenta menor viscosidade, fato esperado já que contém 3 vezes menos espessante que F4 fito, e baixa elasticidade o que provoca baixa porcentagem de recuperação, enquanto as demais formulações apresentaram características viscoelásticas com porcentagem de recuperação de aproximadamente 50% e não diferentes estatisticamente entre si.

Estes resultados sugerem que, dentre as formulações, F4 base e fito são mais indicadas para o uso como produto cosmético facial, uma vez que este tipo de produto deve apresentar viscoelasticidade moderada ou alta para que não escorra após a aplicação.

## **6. Avaliação da formação de estruturas líquido-cristalinas nas formulações base e fitocosmética**

As formulações F3 e F4 base e fito foram avaliadas quanto à presença de estruturas líquido-cristalinas. Primeiramente, a avaliação foi realizada utilizando a técnica de microscopia de luz polarizada, que fornece informações preliminares sobre o tipo de estrutura presente na formulação. Na Figura 38 estão apresentadas as fotomicrografias das quatro formulações avaliadas (F3 base e fito e F4 base e fito).

Avaliando as fotomicrografias é possível verificar a presença de estruturas denominadas “cruz de malta” indicativo de estruturas líquido-cristalinas do tipo lamelar.



**Figura 38. Fotomicrografias de F3 base e fito e F4 base e fito (200X).**

Para a confirmação das estruturas observadas pela microscopia de luz polarizada foi realizada a técnica de espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS), técnica mais aprimorada e mais adequada para identificação e caracterização de estruturas líquido-cristalinas. Esta técnica determina a estrutura da fase líquido-cristalina de acordo com a posição relativa dos picos no vetor de espalhamento ( $q$ ) obedecendo ao cálculo da correlação entre os objetos espalhadores (Alexandridis et al, 1998; Wang e Zhou, 2009) (Equação 9):

$$d = \frac{2\pi}{q} \text{ (Equação 9),}$$

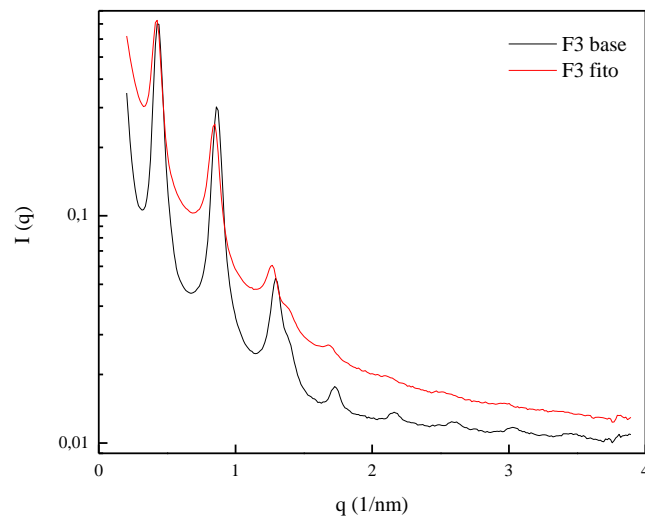
onde:

$d$  = distância entre os objetos espalhadores;

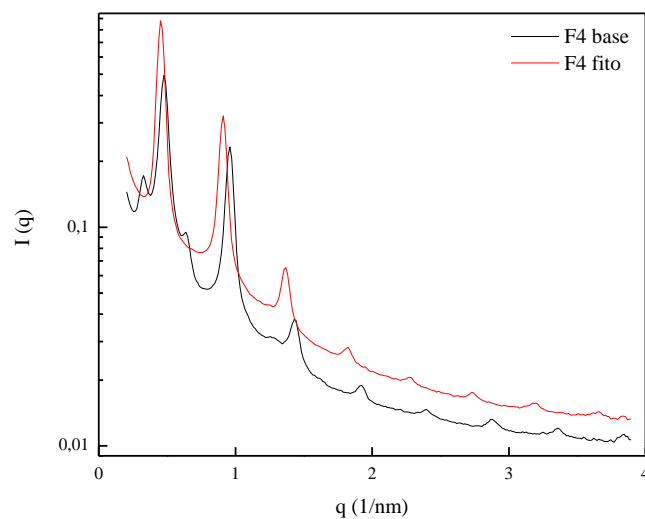
$q$  = valor máximo no pico de refração.

Os resultados obtidos pelo espalhamento são apresentados na forma de gráficos que correlacionam a intensidade de espalhamento dos raios-X ( $I(q)$ ) com o vetor espalhamento ( $q$ ).

As Figuras 39 e 40 representam os gráficos de SAXS obtidos para F3 base e fito e F4 base e fito, respectivamente. Analisando as Figuras 39 e 40 é possível verificar que F3 base e F4 base e fito apresentam 7 picos enquanto que F3 fito apresenta 4.



**Figura 39.** Gráfico de SAXS para a formulação F3 base e fito.



**Figura 40.** Gráfico de SAXS para a formulação F4 base e fito.



A Tabela 16 apresenta o valor máximo de cada pico de refração observado e a distância entre os objetos espalhadores para as quatro formulações avaliadas.

**Tabela 16.** Valores dos picos de refração e distância entre os objetos espalhadores.

<b>Formulações</b>				
	<b>F3 base</b>	<b>F3 fito</b>	<b>F4 base</b>	<b>F4 fito</b>
<b>q<sub>1</sub></b>	0,423	0,427	0,472	0,452
<b>d<sub>1</sub></b>	14,85	14,714	13,31	13,900
<b>q<sub>2</sub></b>	0,862	0,848	0,970	0,910
<b>d<sub>2</sub></b>	7,61	7,409	6,477	6,904
<b>q<sub>3</sub></b>	1,298	1,269	1,432	1,368
<b>d<sub>3</sub></b>	4,84	4,951	4,415	4,592
<b>q<sub>4</sub></b>	1,723	1,690	1,930	1,826
<b>d<sub>4</sub></b>	3,646	3,717	3,255	3,440
<b>q<sub>5</sub></b>	2,160	--	2,392	2,284
<b>d<sub>5</sub></b>	2,908	--	2,626	2,750
<b>q<sub>6</sub></b>	2,585	--	2,877	2,742
<b>d<sub>6</sub></b>	2,430	--	2,183	2,291
<b>q<sub>7</sub></b>	3,009	--	3,350	3,187
<b>d<sub>7</sub></b>	2,088	--	1,875	1,971
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>2</sub></b>	1,95	1,98	2,05	2,01
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>3</sub></b>	3,06	2,97	3,01	3,03
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>4</sub></b>	4,07	3,96	4,08	4,04
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>5</sub></b>	5,10	--	5,06	5,05
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>6</sub></b>	6,11	--	6,09	6,06
<b>d<sub>1</sub>/d<sub>7</sub></b>	7,11	--	7,09	7,05
<b>Estruturas Líquido-cristalinas lamelares</b>				

Analisando a relação entre  $d_1/d_n$ , com n variando de 2 a 7, foi possível verificar que os resultados obedecem a uma relação de 2:3:4:5:6:7 entre os picos (Alexandridis et al, 1998; Binnemans, 2005) sendo, portanto, caracterizadas estruturas líquido-cristalinas do tipo lamelar.

Uma das vantagens da presença de estruturas líquido-cristalinas do tipo lamelar em sistemas emulsionados do tipo O/A é que as fases oleosa e aquosa estão em equilíbrio contribuindo para uma menor tensão interfacial entre as gotículas de fase oleosa e a fase aquosa, resultando em maior estabilidade para o sistema (Engels et al., 1995). Além disso, a formação de estruturas lamelares ao redor das micelas faz com que diminua a atração entre as gotículas dispersas evitando assim uma possível coalescência (Chiari, 2011).

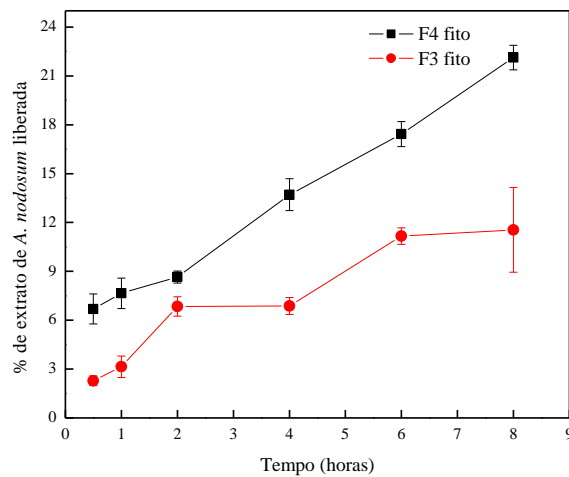
Outro benefício causado pela presença destas estruturas é o aumento da hidratação cutânea, fato desejado quando falamos em cosmético antienvelhecimento, pois uma pele bem hidratada apresenta um melhor aspecto (Chiari, 2011). Friedman *et al.* (1995) constataram que estruturas lamelares promovem maior retenção de água nas estruturas cutâneas contribuindo para o aumento da hidratação gerando benefícios para pele ser mais saudável.

## **7. Avaliação do potencial de liberação do extrato de *A. nodosum***

Foram avaliadas duas formulações (F3 e F4) contendo a mesma concentração de extrato de *A. nodosum* (1,2%; m/m) para verificar qual apresentaria maior liberação do extrato a fim de verificar se a efetividade do ativo estaria sendo mantida com qualquer uma das duas formulações. As *sink conditions* foram garantidas, pois caso fosse liberado 100% do extrato de *A. nodosum*, a concentração máxima na solução receptora seria 0,468 mg/mL e o extrato é solúvel em água em concentrações acima de 5 mg/mL, mais de 10 vezes maior que a máxima concentração que poderia ser encontrada.

Para a quantificação do extrato de *A. nodosum* liberado da formulação foi avaliada a atividade antioxidante da solução receptora pelo método de inibição do radical ABTS, previamente validado. A Figura 41 apresenta o perfil de liberação das formulações F3 e F4.

A curva analítica utilizada para quantificação do extrato foi a da concentração de extrato de *A. nodosum* versus a atividade antioxidante quando o sistema solvente utilizado para o extrato foi água deionizada, pois foi a solução receptora utilizada neste ensaio. Normalmente, a solução receptora utilizada é tampão fosfato pH 7,2, mas este solvente turva o meio reacional quando adicionado a solução etanólica do radical ABTS não permitindo a leitura espectrofotométrica.

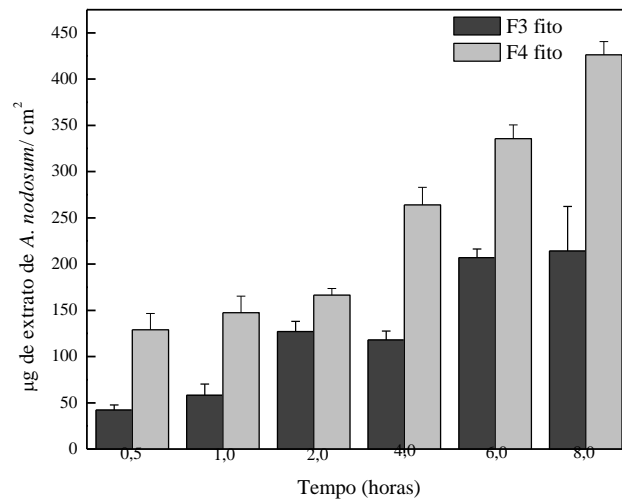


**Figura 41.** Perfil de liberação das formulações F3 fito e F4 fito nos tempos de 30 minutos, 1, 2, 4, 6 e 8 horas.

Analisando a Figura 41 foi possível verificar que os perfis de liberação das formulações apresentaram-se diferentes. Nos primeiros 30 minutos de análise, F3 fito liberou aproximadamente 4,0% a menos de extrato de *A. nodosum* que F4 fito e, apenas após 2 horas de análise, F3 fito atingiu a porcentagem de liberação de F4 fito dos primeiros 30 minutos. Além disso, ao final das 8 horas de análise a quantidade liberada a partir de F4 fito é superior cerca de 10,5% àquela liberada por F3 fito.

A Figura 42 apresenta a quantidade (em massa) por unidade de área ( $\text{cm}^2$ ) liberada a cada tempo de análise.

Observando a Figura 42 foi verificado que a quantidade máxima liberada por F3 fito ( $214,17 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) foi atingida por F4 fito no período entre 2 e 4 horas de análise. Além disso, ao final das 8 horas de avaliação foi possível perceber que F4 fito libera o dobro de extrato de *A. nodosum* que F3 fito. Portanto, a formulação escolhida para continuar os ensaios foi F4 fito já que libera uma maior quantidade de extrato de *A. nodosum* que F3 fito podendo proporcionar uma maior permeação e/ou retenção do ativo na pele.



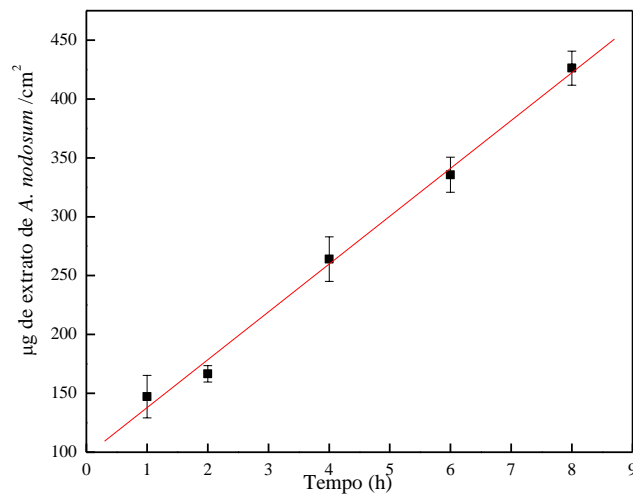
**Figura 42.** Quantidade de extrato de *A. nodosum* liberada por unidade de área (cm<sup>2</sup>).

O perfil cinético de liberação foi avaliado para as duas formulações aplicando três modelos matemáticos que permitiram a identificação do tipo de sistema que cada formulação representa. Foram avaliadas cinéticas de zero e primeira ordem e modelo de Higuchi. A cinética de zero ordem correlaciona a quantidade de extrato de *A. nodosum* liberada por unidade de área e o tempo de análise, a cinética de primeira ordem relaciona o logaritmo da quantidade de extrato de *A. nodosum* liberada por unidade de área e tempo e o modelo de Higuchi correlaciona a quantidade de extrato de *A. nodosum* liberada por unidade de área com raiz quadrada do tempo. Para determinação de qual modelo matemático melhor representa o perfil cinético de liberação verificou-se qual mais se aproxima da linearidade (Costa & Lobo, 2001). A Tabela 17 apresenta os valores do coeficiente de correlação linear para os três modelos matemáticos aplicados.

**Tabela 17.** Valores do coeficiente de correlação linear do perfil cinético de liberação dos fitocosméticos.

	<b>F3 fito</b>	<b>F4 fito</b>
<b>Zero Ordem</b>	0,9509	<b>0,9973</b>
<b>Modelo de Higuchi</b>	<b>0,9669</b>	0,9776
<b>Primeira Ordem</b>	0,8802	0,9928

Observando os dados descritos na Tabela 17 é possível verificar que F3 fito é melhor representada pelo modelo de Higuchi enquanto F4 fito pela cinética de zero ordem (Figura 43). O modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos por difusão (Monteiro et al., 2007) e a cinética de zero ordem descreve a liberação de formas farmacêuticas de liberação controlada liberando a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo, sendo ideal para sistemas de liberação prolongada (Jeon et al, 2006).



**Figura 43.** Perfil cinético de liberação da formulação F4 fito.

Comparando o perfil de liberação e os dados obtidos na caracterização reológica foi possível observar que a formulação F4 apresentou maior área de histerese e apresentou maior liberação de ativo, sugerindo que a área de histerese está relacionada não só com espalhabilidade como também com a liberação do ativo (Chiari et al., 2012c).

## 8. Avaliação da estabilidade físico química das formulações base e fitocosmética

As formulações F4 base e fito foram escolhidas para a realização do estudo de estabilidade, uma vez que pela caracterização reológica foi observada maior área de histerese e valores de  $G'$  superiores que as formulações F3 base e fito, indicando que podem apresentar melhor espalhabilidade e serem mais estáveis. Além disso, a formulação F4 fito liberou

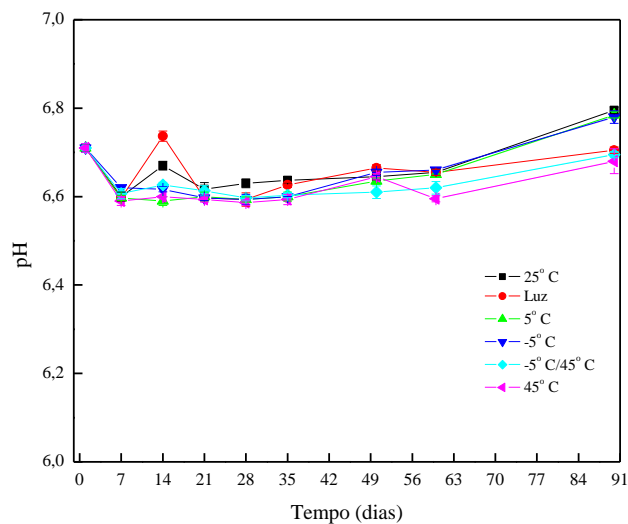
praticamente o dobro de extrato de *A. nodosum* que a formulação F3 fito após 8 horas de análise. Tanto F4 base quanto F4 fito foram avaliadas por um período de 90 dias.

Após a manipulação e período de maturação (24 horas após o preparo) as formulações foram submetidas ao teste de centrifugação, sendo aprovadas por não apresentar separação de fases. Este fato é um indicativo de estabilidade física das formulações (Isaac et al., 2008).

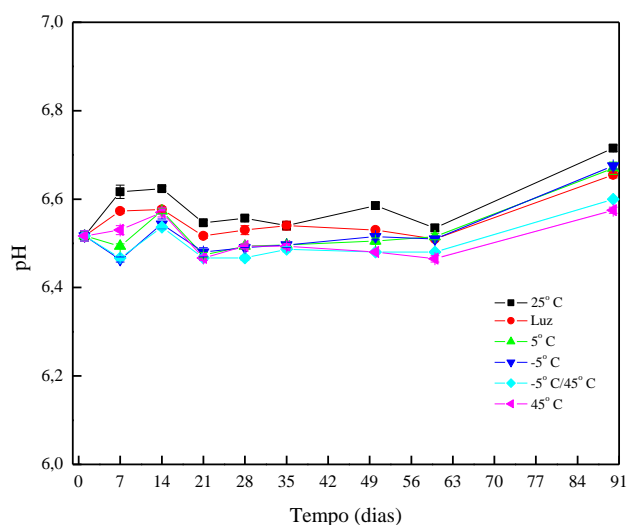
As características organolépticas (aspecto, cor e odor) mantiveram-se estáveis durante os 90 dias de análise, exceto para a formulação F4 fito. Esta formulação quando armazenada a 45 °C apresentou perda de viscosidade, observada pelo aspecto, após 50 dias de análise e, quando armazenada a -5/45 °C, apresentou perda de viscosidade, observada pelo seu aspecto, após 60 dias de análise (Isaac et al., 2008).

A mudança de aspecto da formulação F4 fito, em algumas condições de armazenagem, e a inalteração da formulação F4 base poderiam ter sido previstas ao observar o comportamento reológico das formulações, uma vez que o valor de  $G'$  é maior para a formulação F4 base do que para F4 fito, fato que sugere uma maior estabilidade do sistema.

Os valores de pH para as formulações durante os 90 dias de análise estão apresentados nas Figuras 44 e 45 para F4 base e fito, respectivamente.



**Figura 44.** Valores de pH para formulação base em diferentes condições de armazenagem durante o período de 90 dias.



**Figura 45.** Valores de pH para o fitocosmético em diferentes condições de armazenagem durante o período de 90 dias.

As Tabelas 18 e 19 apresentam os valores médios do pH e desvio padrão de cada condição de armazenagem durante o período de 90 dias.

**Tabela 18.** Valores médios de pH e desvio padrão para formulação base exposta a armazenamento durante os 90 dias.

Dia	25 ± 2°C	Luz	5 ± 2°C	-5 ± 2°C	-5/45 ± 2°C	45 ± 2°C
1	6,71 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,71 ± 0,01	6,71 ± 0,01
7	6,60 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,62 ± 0,00	6,61 ± 0,01	6,59 ± 0,01
14	6,67 ± 0,01	6,73 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,61 ± 0,01	6,62 ± 0,01	6,60 ± 0,0
21	6,61 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,6 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,61 ± 0,01	6,59 ± 0,01
28	6,63 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,59 ± 0,01	6,58 ± 0,01
35	6,64 ± 0,01	6,63 ± 0,01	6,60 ± 0,01	6,60 ± 0,0	6,61 ± 0,01	6,59 ± 0,01
50	6,65 ± 0,01	6,66 ± 0,01	6,63 ± 0,01	6,65 ± 0,01	6,61 ± 0,01	6,64 ± 0,01
60	6,66 ± 0,01	6,66 ± 0,01	6,65 ± 0,00	6,66 ± 0,00	6,62 ± 0,01	6,60 ± 0,01
90	6,79 ± 0,01	6,70 ± 0,01	6,78 ± 0,01	6,78 ± 0,01	6,69 ± 0,01	6,68 ± 0,03

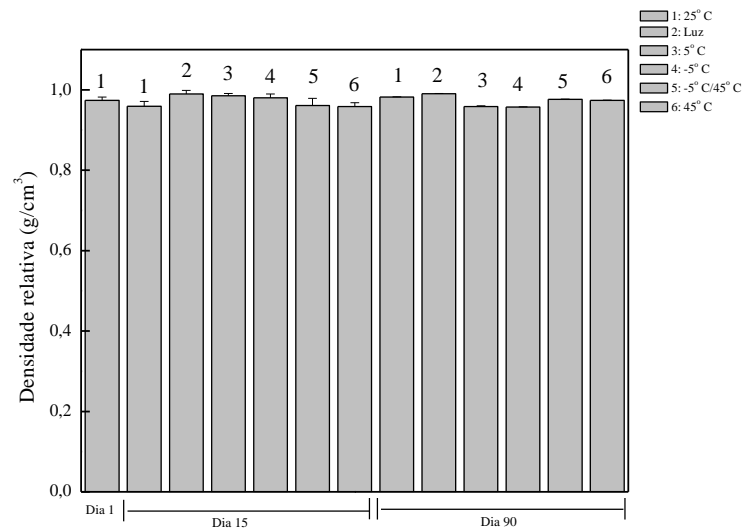
**Tabela 19.** Valores médios de pH e desvio padrão para o fitocosmético exposto a armazenamento durante os 90 dias.

<b>Dia</b>	<b>25 ± 2°C</b>	<b>Luz</b>	<b>5 ± 2°C</b>	<b>-5 ± 2°C</b>	<b>-5/45 ± 2°C</b>	<b>45 ± 2°C</b>
<b>1</b>	6,51 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,51 ± 0,02	6,51 ± 0,02
<b>7</b>	6,61 ± 0,02	6,57 ± 0,01	6,49 ± 0,01	6,46 ± 0,01	6,47 ± 0,01	6,53 ± 0,01
<b>14</b>	6,62 ± 0,01	6,57 ± 0,01	6,57 ± 0,01	6,54 ± 0,01	6,53 ± 0,01	6,57 ± 0,01
<b>21</b>	6,54 ± 0,01	6,51 ± 0,01	6,47 ± 0,01	6,48 ± 0,01	6,48 ± 0,01	6,46 ± 0,01
<b>28</b>	6,56 ± 0,01	6,53 ± 0,01	6,49 ± 0,01	6,49 ± 0,00	6,47 ± 0,01	6,49 ± 0,01
<b>35</b>	6,54 ± 0,01	6,54 ± 0,01	6,49 ± 0,01	6,49 ± 0,01	6,48 ± 0,01	6,49 ± 0,01
<b>50</b>	6,58 ± 0,01	6,53 ± 0,00	6,50 ± 0,01	6,52 ± 0,01	6,48 ± 0,00	6,48 ± 0,00
<b>60</b>	6,54 ± 0,01	6,51 ± 0,00	6,51 ± 0,01	6,51 ± 0,00	6,48 ± 0,00	6,47 ± 0,01
<b>90</b>	6,71 ± 0,01	6,65 ± 0,01	6,67 ± 0,01	6,67 ± 0,01	6,6 ± 0,00	6,57 ± 0,01

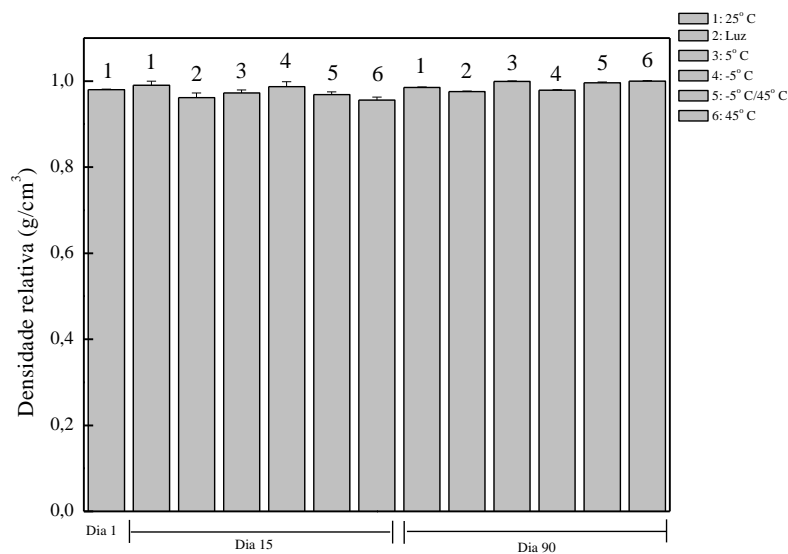
Observando as Tabelas 17 e 18 foi verificado que os valores de pH após 90 dias de análise apresentaram-se estatisticamente diferentes, exceto para F4 base armazenada com exposição à radiação luminosa, -5° C/45° C e 45° C. Porém não foram observadas variações superiores a 10%, portanto as formulações F4 base e F4 fito foram consideradas estáveis neste parâmetro (Isaac et al., 2008).

As Figuras 46 e 47 apresentam os gráficos de densidade relativa para a formulação base e para o fitocosmético, respectivamente, em todas as condições de armazenagem no período de 90 dias.





**Figura 46.** Valores de densidade relativa da formulação base exposta a diferentes condições de armazenagem em 90 dias.



**Figura 47.** Valores de densidade relativa do fitocosmético exposto a diferentes condições de armazenagem em 90 dias.

As Tabelas 20 e 21 apresentam os valores médios para densidade relativa e desvio padrão, da formulação base e do fitocosmético, de cada condição de armazenagem durante o período de 90 dias.

**Tabela 20.** Valores médios de densidade relativa e desvio padrão para formulação base durante 90 dias de armazenamento.

<b>Dia</b>	<b>25 ± 2°C</b>	<b>Luz</b>	<b>5 ± 2°C</b>	<b>-5 ± 2°C</b>	<b>-5/45 ± 2°C</b>	<b>45 ± 2°C</b>
<b>1</b>	0,9737 ± 0,0080	0,9737 ± 0,0080	0,9737 ± 0,0080	0,9737 ± 0,0080	0,9737 ± 0,0080	0,9737 ± 0,0080
<b>15</b>	0,9590 ± 0,0119	0,9808 ± 0,0089	0,9850 ± 0,0062	0,9608 ± 0,0182	0,9803 ± 0,0090	0,9586 ± 0,0096
<b>90</b>	0,9818 ± 0,0050	0,9900 ± 0,0011	0,9584 ± 0,0021	0,9569 ± 0,0009	0,9760 ± 0,0008	0,9734 ± 0,0008

**Tabela 21.** Valores médios de densidade relativa e desvio padrão para o fitocosmético exposto a armazenamento durante os 90 dias.

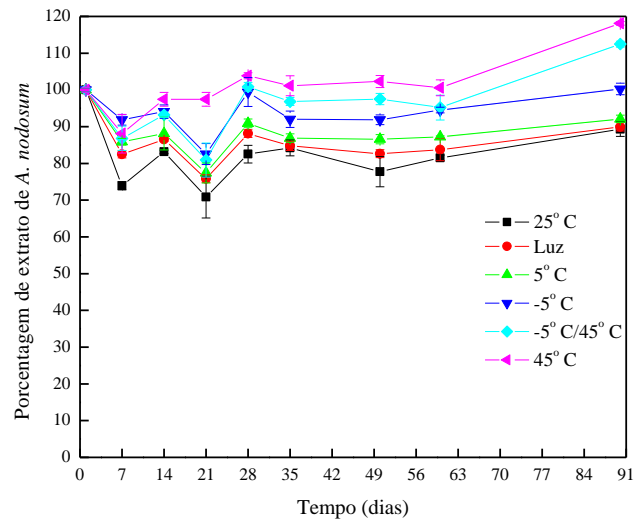
<b>Dia</b>	<b>25 ± 2°C</b>	<b>Luz</b>	<b>5 ± 2°C</b>	<b>-5 ± 2°C</b>	<b>-5/45 ± 2°C</b>	<b>45 ± 2°C</b>
<b>1</b>	0,9803 ± 0,0011	0,9803 ± 0,0011	0,9803 ± 0,0011	0,9803 ± 0,0011	0,9803 ± 0,0011	0,9803 ± 0,0011
<b>15</b>	0,9901 ± 0,0097	0,9617 ± 0,0106	0,9722 ± 0,0073	0,9873 ± 0,0114	0,9558 ± 0,0065	0,9687 ± 0,007
<b>90</b>	0,9851 ± 0,0012	0,9757 ± 0,0014	0,9992 ± 0,0011	0,9790 ± 0,0013	0,9998 ± 0,0012	0,9963 ± 0,0013

Analisando as Figuras 46 e 47 e as Tabelas 20 e 21 foi verificado que apesar de algumas condições de armazenagem apresentar valores de densidade estatisticamente diferentes entre o primeiro e o último dia de análise, não foi observado variação superior a 10% (Isaac et al., 2008).

A quantificação do ativo, estabilidade química, foi realizada pelo método de inibição do radical ABTS que determina a atividade antioxidante do extrato de *A. nodosum* presente no fitocosmético conforme descrito no item 1.3.2 do Material e Métodos e no item 3.7 dos Resultados e Discussão. É importante que esta avaliação seja realizada para garantir a estabilidade do ativo na formulação durante todo o seu prazo de validade, garantindo assim a eficácia do produto.

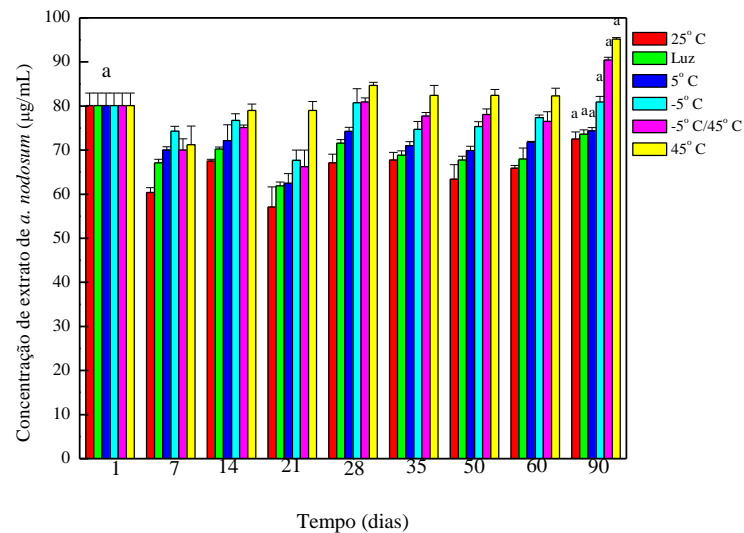
Principalmente quando se trata de ativos antioxidantes, a estabilidade química se faz ainda mais necessária, pois o ativo pode perder as propriedades e não apresentar nenhum tipo de alteração perceptível no produto (Vicentini et al., 2008; Chiari, 2011).

A Figura 48 apresenta os resultados da porcentagem de extrato após a quantificação do extrato de *A. nodosum* no fitocosmético durante o período de estabilidade (90 dias).



**Figura 48.** Porcentagem de extrato de *A. nodosum* no fitocosmético durante 90 dias.

A partir da Figura 48 foi possível verificar que houve variação da concentração de ativo entre as diferentes condições de armazenagem durante o período de análise. Para uma melhor representação desta variação a Figura 49 e Tabela 22 apresentam a concentração de extrato de *A. nodosum* presente no fitocosmético.



**Figura 49.** Concentração do extrato de *A. nodosum* contido no fitocosmético nas diferentes condições de armazenagem durante 90 dias.

**Tabela 22.** Média da concentração do extrato de *A. nodosum* contido no fitocosmético nas diferentes condições de armazenagem durante 90 dias.

Dia	25 ± 2°C	Luz	5 ± 2°C	-5 ± 2°C	-5/45 ± 2°C	45 ± 2°C
1	80,08 ± 2,84	80,08 ± 2,84	80,08 ± 2,84	80,08 ± 2,84	80,08 ± 2,84	80,08 ± 2,84
7	60,40 ± 1,10	67,12 ± 0,79	69,99 ± 0,75	74,28 ± 1,15	70,03 ± 2,52	71,25 ± 4,23
14	67,54 ± 0,37	70,25 ± 0,47	72,14 ± 3,64	76,74 ± 1,50	75,09 ± 0,62	78,98 ± 1,50
21	57,06 ± 4,57	61,91 ± 0,86	62,48 ± 2,18	67,68 ± 2,35	66,23 ± 3,80	78,98 ± 2,06
28	67,13 ± 1,97	71,57 ± 0,82	74,24 ± 0,96	80,75 ± 3,21	80,93 ± 0,93	84,70 ± 0,70
35	67,74 ± 1,73	68,83 ± 1,00	70,97 ± 0,94	74,73 ± 1,80	77,71 ± 0,83	82,45 ± 2,22
50	63,38 ± 3,34	67,76 ± 0,85	69,87 ± 0,99	75,36 ± 1,09	78,08 ± 1,25	82,40 ± 1,33
60	65,91 ± 0,63	68,00 ± 2,47	71,78 ± 0,20	77,36 ± 0,61	76,49 ± 2,24	82,30 ± 1,77
90	72,52 ± 1,58	73,61 ± 0,95	74,35 ± 0,80	80,92 ± 1,28	90,42 ± 0,66	95,17 ± 0,36

Apesar do valor absoluto das concentrações obtidos durante o ensaio de estabilidade química serem diferentes, a análise estatística realizada pelo ANOVA seguido pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) mostrou que não há diferença estatisticamente significativa entre o primeiro e o último dia de avaliação.

Entretanto, para as amostras armazenadas a 45°C e -5/45°C houve um aumento no valor absoluto da concentração de extrato que pode ter sido provocado pela perda de água das formulações e, desta maneira, um aumento na concentração do ativo na formulação.

Para as formulações armazenadas à temperatura ambiente e expostas a radiação ultravioleta foi verificado que a estabilidade do ativo é menor do que para as armazenadas a 5°C e -5°C, uma vez que a variação na concentração de extrato foi menor para temperaturas mais baixas.

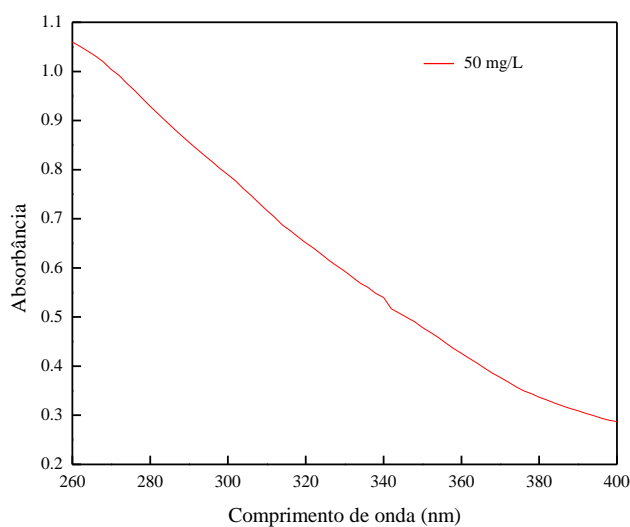
Portanto, para a comercialização do produto proposto é necessária uma restrição de armazenagem que deverá ser feita a baixas temperaturas e em embalagem opaca.

### **9. Avaliação “*in vitro*” do Fator de Proteção Solar das formulações base e fitocosmética**

Antes de realizar a avaliação do fator de proteção solar (FPS) das formulações foi obtido o perfil de absorção do extrato de *A. nodosum* na região da radiação ultravioleta (UVA: 320-400 nm e UVB: 290-320 nm), pois absorver na região entre 290 e 400 nm indica a possibilidade de proporcionar proteção solar quando adicionado a formulações cosméticas.

Violante et al (2009) avaliou extratos secos de plantas do cerrado do Mato Grosso e observou que para os extratos estudados, concentrações de 50 ou 100 mg/L apresentaram absorção na região do ultravioleta. Entretanto, Chiari *et al.* (2012b) não observou perfil de absorção para o extrato hidroalcoólico de goiaba nas mesmas concentrações estudadas por Violante et al (2009). Por este motivo, avaliou concentrações de 1,25 a 10 mg/mL concentrações nas quais observou absorção.

Seguindo o descrito na literatura foi realizado o perfil de absorção do extrato de *A. nodosum* na concentração de 50 mg/L (Figura 50) sendo observada absorção maior na região do UVB que do UVA, sugerindo que o extrato de *A. nodosum* pode apresentar capacidade fotoprotetora, assim como o extrato etanólico de goiaba também poderia (Chiari et al, 2012b).

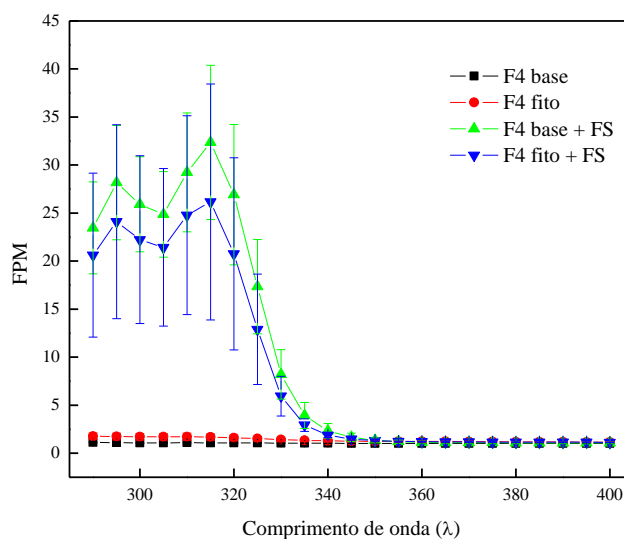


**Figura 50.** Perfil de absorção do extrato de *A. nodosum* (50 mg/L) na região do UVB e UVA (260-400 nm).

Foram preparadas quatro formulações: F4 base, F4 fito, F4 base com adição de filtro solar químico (F4 base + FS) e F4 fito com adição do filtro solar químico (F4 fito + FS).

A adição de filtro solar químico à F4 base e a F4 fito foi realizada para comprovar se o método utilizado na avaliação é eficaz e também para verificar se a adição do extrato de *A. nodosum* seria capaz de potencializar o efeito fotoprotetor do filtro solar químico.

A partir dos dados de FPM (Figura 51) o software calcula o valor de FPS para cada formulação.



**Figura 51.** Fator de proteção máximo (FPM) para cada formulação avaliada em relação ao comprimento de onda.

A Tabela 23 apresenta os valores de FPS obtido para as quatro formulações avaliadas.

**Tabela 23.** Valores de FPS obtidos pela metodologia de espectrofotometria de reflectância no Optometrics SPF 290.

Formulações	FPS* $\pm$ DP**
F4 base	1,07 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>
F4 fito	1,63 $\pm$ 0,28 <sup>b</sup>
F4 base + FS	10,28 $\pm$ 1,41 <sup>c</sup>
F4 fito + FS	9,21 $\pm$ 2,07 <sup>c</sup>

\*FPS= fator de proteção solar médio; \*\*DP = desvio padrão; a,b,c: letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes.

Analisando a Figura 50 e a Tabela 23 é possível verificar que a adição do extrato de *A. nodosum* na concentração de 1,2% a formulação base promove um aumento pequeno no valor de FPS da formulação (verificado pelo valor baixo de desvio entre as medições), não sendo capaz de conferir efeito fotoprotetor a esta formulação. Além disso, o extrato de *A. nodosum* não apresenta efeito sinérgico (valores de FPS não diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ )) com o *Ethylhexyl Methoxycinnamate* (3,5% p/p) não sendo capaz de potencializar o FPS promovido pelo filtro químico.

O filtro químico *Ethylhexyl Methoxycinnamate* foi utilizado por ser uma matéria-prima amplamente empregada em fotoprotetores pela indústria cosmética e por ser uma substância disponível no laboratório de cosmetologia onde o projeto foi realizado.

Apesar de não apresentar efeito fotoprotetor o extrato de *A. nodosum* apresenta benefícios à pele, já que apresenta potencial antioxidante sendo, provavelmente, capaz de evitar danos oxidativos causados pela formação de radicais livres após exposição à radiação solar.

## CONCLUSÃO

Este trabalho possibilitou o desenvolvimento de um sistema emulsionado (formulação F4) estável para a incorporação de um ativo cosmético natural - extrato de *A. nodosum*.

Com os resultados obtidos no doseamento de compostos fenólicos e no ensaio de atividade antioxidante foi possível verificar que o extrato de *A. nodosum* pode ser utilizado em produtos cosméticos antienvhecimento, pois quando comparado a outros extratos vegetais apresenta atividade antioxidante significativa e não apresenta as desvantagens do ácido ascórbico, considerado uma substância antioxidante referência.

Além do potencial antioxidante, os resultados obtidos para atividade inibidora de tirosinase sugerem que o extrato de *A. nodosum* pode proporcionar um possível clareamento a pele quando utilizado em elevadas concentrações ( $IC_{50} = 1830 \mu\text{g/mL}$ )

O extrato de *A. nodosum*, na concentração de 1,2% na formulação, não apresenta efeito fotoprotetor e não é capaz de atuar sinergicamente potencializando a atividade fotoprotetora do *Ethylhexyl Methoxycinnamate* a 3,5%, porém devido a presença de substâncias antioxidantes pode ser sugerida sua proteção à pele de danos fotooxidativos.

Pelo ensaio de citotoxicidade foi observado que o extrato de *A. nodosum* não é tóxico para concentrações de até 3000  $\mu\text{g/mL}$  para linhagem celular HepG2 e, para concentrações de até 5000  $\mu\text{g/mL}$  para linhagem celular HaCat.

Avaliando todos os resultados é possível concluir que os métodos *in vitro* utilizados para avaliação da eficácia e segurança do sistema emulsionado desenvolvido apresentaram-se eficazes na avaliação; porém, para que o produto seja colocado no mercado, ensaios de permeação cutânea *in vitro*, mutagenicidade, carcinogenicidade, teratogenicidade e avaliação clínica são fundamentais.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: ANVISA, 2003a, 47p.

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.

ALEXANDROU, A.N.; MCGILVREAY, T.M.; BURGOS, G. Steady Herschel-Bulkley fluid flow in three-dimensional expansions. **J. Non-Newtonian Fluid Mech.**, v.100, p.77-96, 2001.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletries (Ed. Port.)**, v.15, p.96-100, 2003.

ALMEIDA, M.G.J.; CHIARI, B.G.; CORRÊA, M.A.; CHUNG, M.C.; ISAAC, V.L.B. Determinação da atividade antioxidante do extrato de *Ascophyllum nodosum* para incorporação em base cosmética. **Anais do 26º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2012.

ANDERSON, R.R.; PARRISH, J.A. The optics of human skin. **The J. Invest. Dermatol.**, v.77, p.13-19, 1981.

ANVISA. **Resolução-RDC nº 79**, de 28 de agosto de 2000. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79\\_2000.pdf](http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/html/79_2000.pdf). Acesso em dezembro de 2012.

ANVISA. **Resolução-RE nº 899**, de 29 de maio de 2003b. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm). Acesso em outubro de 2012.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Sci. Technol.**, v.11, p.419-421, 2000.

AUDIBERT, L.; FAUCHON, M.; BLANC, N.; HAUCHARD, D.; AR GALL, E. Phenolic Compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: *Distribution and radical-scavenging activities*. **Phytochem. Anal.**, v.21, p.399-405, 2010.

AWIKA, J.M.; ROONEY, L.W.; WU, X.; PRIOR, R.L.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Screening methods to measure antioxidant activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum products. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.6657-6662, 2003.

BANIAS, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. **J. American Oil Chemists' Society**, v.69, p.520-524, 1992.

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

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q.T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J. Ethnopharmacology**, v.82, p.155-158, 2002.

BENY, M. G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.12, p.44-50, 2000.

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.

BHUSHAN, M.; CUMBERBATCH, M.; DEARMAN, R.J.; ANDREW, S.M.; KIMBER, I.; GRIFFITHS, C.E.M. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced of human Langerhans cells: the influence of ageing. **Br. J. Dermatol.**, v.146, n.1, p.32-40, 2002.

- BINNEMANS, K. Ionic liquid crystals. **Chem. Rev.**, v. 105, p. 4148-4204, 2005.
- BONINA, F.; SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; RAPISARDA, P.; DEDEREN, J.C. In vitro antioxidant activity and in vivo photoprotective effect of a red orange extract. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.20, p.331-342, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss.Technol.**, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL, **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional, v.1, p.12-19, 26,27, 2004.
- BRÉGÈGÈRE, F.; SOROKA, Y.; BISMUTH, J.; FRIGUETE, B.; MILNER, Y. Cellular senescence in human keratinocytes: unchanged proteolytic capacity and increased protein load. **Exp. Gerontol.**, v.38, n.6, p.619-629, 2003.
- BRENNER, M.; HEARING, V.J. The protective role of melanin against UV damage in human skin. **Photochem. Photobiol.**, v.84, p.539-549, 2008.
- BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and Instrumental Approaches to Treat Hyperpigmentation. **Pigment Cell Res.**, v.16, p.101-110, 2003.
- BRUGGISSER, 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.
- Campo & Flores. ALGA 95, Bioatlantis. Disponível em <[www.campoeflores.com.br/prod\\_agric\\_lancamentos\\_alga95.html](http://www.campoeflores.com.br/prod_agric_lancamentos_alga95.html)> Acessado em agosto de 2012.

CAMPOS, P.M. Avaliação da atividade inibitória de melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi. Dissertação de mestrado. Setor de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR, 2010.

CHIARI, B.G.; ALMEIDA, M.G.J.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V. Cosmetic's Quality Control. In: ISIN AKYAR. Latest Research in Quality Control. Intech, 2012c.

CHIARI, B.G.; CORRÊA, M.A.; CHIAVACCI, L.A.; ISAAC, V.L.B. Determinação do fator de proteção solar (FPS) de fitocosmético contendo extrato de goiaba. **Anais do 26º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2012b.

CHIARI, B.G. Desenvolvimento, avaliação da eficácia e segurança de fitocosmético contendo extrato de *Psidium guajava* L. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Unesp. Araraquara/SP, 2011.

CHIARI, B.G.; MARTINI, P.C.; MORAES, J.D.D.; ANDRÉO, R.; CORRÊA, M.A.; CICARELLI, R.M.B.; ISAAC, V.L.B. Use of HepG2 cells to assay the safety of cosmetic active substances. **Int. J. Res. Cosm. Sci.**, v.2, n.2, 8-14, 2012a.

CHO, S-H.; KANG, S-E.; CHO, J-Y.; KIM, A-R.; PARK, S-M.; HONG, Y-K.; AHN, D-H. The Antioxidant Properties of Brown Seaweed (*Sargassum siliquastrum*) Extracts. **J. Med. Food**, v.10, n.3, p.479-485, 2007.

CORRÊA, M.A.; Cosmetologia: Ciência e Técnica. Editora Medfarma, 1ª edição, 492p., 2012.

COSTA, A.; MOISÉS, T.A.; CORDERO, T.; ALVEZ, C.R.T.; MARMIRORI, J. Associação embilica, licorice e belides como alternativa a hidroquinona no tratamento clínico do melasma. **An. Bras. Dermatol.**, v.85, n.5, p.613-620, 2010.

COSTA, P.; LOBO, M.S. Influence of dissolution médium agitation on release profiles of sustained-release tablets. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, v.27, n.8, p.811–817, 2001.

COUTEAU, C.; CULLEL, N.P.; CONNAN, A.E.; COIFFARD, L.J. Stripping method to quantify absorption of two sunscreen in human. **Int. J. Pharm.**, v.222, n.1, p.153-157, 2001.

CUMMINGS, M., NORDLUND, J.J. Chemical leukoderma: fact or fancy. **Am. J. Contact Dermatol.**, v.6, p.122–127, 1995.

CURTO, E.V.; KWONG, C.; HERMERSDORFER, H.; GLATT, H.; SANTIS, C.; VIRADOR, V.; HEARING-JR, V.J.; DOOLEY, T. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: In vitro comparison of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. **Biochem. Pharm.**, v.57, p.663-672, 1998.

DEG. Rapithix A-60. Informe técnico cosmecêutico, 2012.

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, n.2, p.51-9, 2008.

DOGAN, M.; YLMAZ, Z.; ALKAN, M. Characterization and rheological properties of kaolinite-silicon oil pastes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.47, p.8218-8227, 2008.

DRAELOS, Z.D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. **Dermatologic Therapy**, v.20, p.308–313, 2007.

DUDONE, S.; VITRAC, X.; COUTIÈRE, P.; WOILLET, M.; MÉRILLON, J-M. Comparative Study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.1768-1774, 2009.

DURASAMY, A.; NARAYANASWAMY, N.; SEBASTIAN, A.; BALAKRISHNAN, K.P. Sun protection and anti-inflammatory activities of some medicinal plants. **Int. J. Res. Cosm. Sci.**, v.1, n.1, p.13-16, 2011.

DUVAL, C.; SMIT, N.P.; KOLB, A.M.; REGNIER, M.; PAVEL, S.; SCHMIDT, R. Keratinocytes control the pheo/eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. **Pigment Cells Res.**, v.15, p.440-446, 2002.

EBERHARDT, M.V.; LEE, C.Y.; LIU, R.H. Antioxidant activity of fresh apples. **Nature**, v.405, p.903-904, 2000.

EMBRAFARMA. Monoestearato de glicerila. Literatura do fornecedor, 2012.

ENGELKE, M.; JENSEN, J.M.; EKANAYAKE-MUDIYANSELAGE, S.; PROKSCH, E. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. **Br. J. Derm.**, v.137, p.219-225, 1997.

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.

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.

FULLER, B.B.; SPAULDING, D.T.; SMITH, D.R. Regulation of catalytic activity of preexisting tyrosinase in Black and Caucasian human melanocyte cell culture. **Experim. Cell Res.**, v.262, p.197-208, 2001.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M.E.; TROTTA, M.; GRANDE, A.E.; TALARICO, C. Photostability of naturally occurring whitening agents in cosmetic microemulsions. **J. Cosmet. Sci.**, v.55, p.139-148, 2004.

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

GOLDSMITH, L.A. My organ is bigger than your organ. **Arch. Dermatol.**, v.126, p.31-302, 1990.

GREGOLIN, M.T.; CHIARI, B.G.; RIBEIRO, H.M.; ISAAC, V.L.B. Rheological Characterization of Hydrophilic Gels. **J. Disp. Sci. Tech.**, v.31, n.6, p.96-100, 2010.

GREWE, M. Chronological ageing and photoageing of dendritic cells. **Clinical and Experimental Dermatology**, v.26, p.608-612, 2001.

GRIMES, P.E. Melasma. Etiologic and therapeutic considerations. **Arch. Dermatol.**, v.131, p.1453–1457, 1995.

GUIRY, M.D. in Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2012. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 18 October 2012.

HALDER R.M., RICHARDS G.M. Management of dyschromias in ethnic skin. **Dermatol. Ther.**, v.17, p.151–157, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v.186, p.1-85, 1990.

HANSON, K.M.; LI, B.; SIMON, J.D. A spectroscopic study of the epidermal ultraviolet chromophore trans-urocanic acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v.119, p.2715-2721, 1997.

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

HRAS, A.R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with  $\alpha$ -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, v.71, p.229-233, 2000.

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

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; ALMEIDA, M.G.J.; CORRÊA, M.A. Effect of various thickening agents on the rheological properties of O/W emulsions containing non-ionic emulsifier. **J. Disp. Sci Tech.**, v.online, 2012.

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.

JIMÉNEZ-ESCRIG, A.; JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, I.; PULIDO, R.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. **J. Sci. Food Agric.**, v.81, p.530-534, 2001.

JIMÉNEZ, J.T.; O'CONNELL, S.; LYONS, H.; BRADLEY, B.; HALL, M. Antioxidant, antimicrobial, and tyrosinase inhibition activities of acetone extract of *Ascophyllum nodosum*. **Chemical Papers**, v.64, n.4, p.434-442, 2010.

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.

KAIDBEY, K.H.; KLIGMAN, A.M. The acute effects of long-wave ultraviolet irradiation on human skin. **J. Invest. Derm.**, v.72, p.253-256, 1978.

KALE, S.; GHOGHE, P.; ANSARI, A.; WAJE, A.; SONAWANE, A. Formulation and *in-vitro* determination of sun protection factor of *Nigella sativa* Linn. seed oil sunscreen cream. **Int. J. Pharm. Tech. Res.**, v.2, n.4, p.2194-2197, 2010.



KANG, H.S.; CHUNG, H.Y.; KIM, J.Y.; SON, B.W.; JUNG, H.A.; CHOI, J.S. Inhibitory Phlorotannins from the Edible Brown Alga *Ecklonia stolonifera* on Total Reactive Oxygen Species (ROS) Generation. **Arch. Pharm. Res.**, v.27, n.2, p.194-198, 2004.

KANG, S.S.; KIM, H.J.; JIN, C.; LEE, Y.S. Synthesis of tyrosinase inhibitory (4-oxo-4H-pyran-2-yl)acrylic acid ester derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p.188–191, 2008.

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

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.

KIM, E. WON NAM, G.; KIM, S.; LEE, H.; MOON, S.; CHANG, I. Influence of polyol and oil concentration in cosmetics products on skin moisturization and skin surface roughness. **Skin Res. Tech.**, p.1-8, 2007.

KLESZCZEWSKA, E. L-ascorbic acid — clinical use, toxicity, properties, methods of determination and application in chemical analysis. **Pharmazie**, v.55, p.640–644, 2000.

KOBAYASHI, Y.; KAYAHARA, H.; TADASA, K.; NAKAMURA, T.; TANAKA, K. Synthesis of amino acid derivatives of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.59, n.9, p.1745-1746, 1995.

LEMANSKA, K.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B.; ZIELINSKI, R.; SOFFER, A. E. M. F.; RIETJIENS, I. M. C. M. The influence of pH on the antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. **Free Radical Biol. Med.**, v.31, p.869-881, 2001.

LI, H.B.; WONG, C.C.; CHENG, K.W.; CHEN, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT**, v.41, p.385-390, 2008.

LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.78, p.517S-520S, 2003.

MADHOGARIA, S.; AHMED, I. Leucoderma after use of a skin-lightening cream containing kojic dipalmitate, liquorice root extract and Mitracarpus scaber extract. **Clin. Exp. Derm.** v.35, p.e103–e105, 2009.

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

MAEDA, K.; FUKUDA, M. In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **J. Soc. Cosm. Chem**, v.42, p.361-368, 1991.

MAEDA, K.; NAITOU, UMISHIO, K.; FUKUHARA, T.; MOTOYAMA, A. A novel melanin inhibitor: hydroperoxy traxastane-type triterpene from flowers of *Arnica montana*. **Biol. Pharm. Bull.**, v.30, n.5, p.873-879, 2007.

MAPRIC. Alcool Cetoestearílico 30/70. Literatura do fornecedor, 2012.

MAPRIC. Alcool Cetoestearílico etoxilado 20 OE. Literatura do fornecedor, 2012.

MARGALIDA, A.; NEGRO, J.J.; GALVAN, I. Melanin-based color variation in the Bearded vulture suggests a thermoregulatory function. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, p.87-91, 2008.

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.

MASSON, D.S.; MORAIS, G.G.; MORAIS, J.M.; ANDRADE, F.F.; DOS SANTOS, O.D.H.; OLIVEIRA, WP.; ROCHA FILHO, P.A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **J. Disp. Sci Tech.**, v.26, n.4, p.463-468, 2005.

MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H.N. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. **Toxicol. Applied Pharm.**, v.195, p.298-308, 2004.

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

MIGLIATO, K.F.; MOREIRA, R.R.D.; MELLO, J.C.P.; SACRAMENTO, L.V.S.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N. Controle de qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.17, n.1, p.94-101, 2007.

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.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin 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 liberação cólon-específica. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.26, n.2, p.179-184, 2007.

NARDIN, P.; GUTERRIDES, S.S.; Alfa-hidroxiácidos: aplicações cosméticas e dermatológicas. **Caderno de farmácia**, v.15, n.1, p.7-14, 1999.

NESTEROV, A.; ZHAO, J.; MINTER, D.; HERTEL, C.; MA, W.; ABEYSINGHE, P.; HONG, M.; JIA, Q. 1-(2,4-dihydroxyphenil)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)propane, a

novel tyrosinase inhibitor with strong depigmenting effects. **Chem. Pharm. Bull.**, v.56, n.9, p.1292-1296, 2008.

NICOLETTI, M.A., ORSINE, E.M.A. DUARTE, A.C.N., BUONO, G.A. Hiperchromia s: Aspectos Gerais e Uso de Despigmmentantes Cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, n.3, 2002.

NIELSEN, K.P.; ZHAO, L.; STAMNES, J.J.; STAMNES, K.; MOAN, J. The importance of depth distribution of melanin in skin for DNA protection and other photobiological process. **J Photochem. Photobiol. B: Biology**, v.82, p.194-198, 2006.

NORDLUND, J.J., GRIMES, P.E., ORTONNE, J.P. The safety of hydroquinone. **J. Euro Acad. Derm. Venerol.**, v.20, p.781-787, 2006.

OKONOGLI, S.; DUANGRAT, C.; ANUCHPREEDA, S.; TACHAKITTIRUNGROD, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. **Food Chemistry**, v.103, p.839-846, 2007.

ORIÁ, R.B.; FERREIRA, F.V.A.; SANTANA, E.N.; FERNANDES, M.R.; BRITO, G.A.C. Estudo das alterações relacionadas com a idade na pele humana, utilizando métodos de histomorfometria e autofluorescência. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v.78, n.4, p.425-434, 2003.

ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L. Latest insights into skin hyperpigmentation. **J. Invest. Derm. Symp. Proceedings**, v.13, p.10-14, 2008.

PANDYA, A.G.; GUEVARA, I.L Disorders of hyperpigmentation. **Dermatologic Clinics**, v.18, n.1, p.91-98, 2000.

PARYS, S.; KEHRAUS, S.; PETE, R.; KUPPER, F.C.; GLOMBITZA, K-W.; KONIG, G.M. Seasonal variation polyphenolics in *Ascophyllum nodosum* (*Phaeophyceae*). **Eur. J. Phycol.**, v.44, n.3, p.331-338, 2009.

PARYS, S.; ROSENBAUM, A.; KEHRAUS, S.; REHER, G.; GLOMBITZA, K-W.; KONIG, G.M. Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in Algal extracts. **J. Nat. Prod.**, v.70, p.1865-1870, 2007.

PASSERON, T.; BALLOTTI, R.; ORTONNE, J.P. Melanogenesis. **EMC-Dermatologie Cosmetologie**, v.2, p.204-216, 2005.

PAVIA, H.; ABERG, P. Spatial variation in polyphenolic content of *Ascophyllum nodosum* (Fucales, Phaeophyta). **Hydrobiologia**, v.326/327, p. 199-203, 1996.

PEREIRA, G.G. Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial antioxidante e fotoprotetor das emulsões. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Ribeirão Preto/SP, 2008.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Anti-oxidant capacity of dietary polyphenols determined by ABTS assay: a kinetic expression of the results. **Int. J. Food Sci. Tech.**, v.43, p.185-191, 2008.

PHARMASPECIAL. Aristoflex AVC. Informativo técnico, 2012.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PINNELL, S.R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **J. Am. Acad. Derm.**, v.48, n.1, p.1-19, 2003.

PRIOR, R.L.; CAO, G. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.1173–1181, 1999.

PRIOR, R.; WU, X.; SCHAICH, K.; Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v.53, p.4290–4302, 2005.

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

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.

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.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; HARDY, M.L.; HEBER, D. Total Cranberry Extract versus Its Phytochemical Constituents: Antiproliferative and Synergistic Effects against Human Tumor Cell Lines. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.2512-2517, 2004.

SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis some isolated compounds and its source plant on antibody production. **J. Ethnopharmacology**, v.98, p.301-305, 2005.

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.

SLOMINISKI, A.; TOBIN, D.J.; SHIBAHARA, J.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol. Rev.**, v.84, p.1155-1228, 2004.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v.67, p.477-502, 2000.

SREENIVASAN, S.; IBRAHIM, D.; MOHD KASSIM, M.J.N. Free radical scavenging activity and total phenolic compounds of *gracilaria changii*. **Int. J. Nat. Eng. Sci.**, v.1, n.3, p. 115-117, 2007.

STEINER, D. As influências raciais e a pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.8, n.3, p.28-31, 1996b.

STEINER, D. Discromias – parte I: Generalidades. **Cosmetics & Toiletries**, v.8, n.1, p.31-32, 1996a.

STEINER, D. Pigmentação e pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.8, n.6, p.30-31, 1996c.

STENGEL, D.; DRING, M. Morphology and in situ growth rates of plants of *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyta) from different shore levels and responses of plants to vertical transplantation. **European Journal of Phycology**, v.32, n.2, p.93-202, 1997.

SU, E.G. Formulando com branqueadores da pele. **Cosmetics & Toiletries**, v.11, n.2, p.57-63, 1999.

SUN, J.; CHU, Y-F.; WU, X.; LIU, R.H. Antioxidant and antiproliferative activities of fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.7449–7454, 2002.

THOMSON, M.L. Relative efficiency of pigment and horny layer thickness in protecting the skin of Europeans and Africans against solar ultraviolet radiation. **J. Physiol.**, v.127, p.236-246, 1995

TUTOUR, B.L.; BENSLIMANE, F.; GOULEAU, M.P.; GOUYGOU, J.P.; SAADAN, B.; QUEMENEUR, F. Antioxidant and pro-oxidant activities of the brown algae, *Laminaria digitata*, *Himantalia elongate*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus* and *Ascophyllum nodosum*. **J. Appl. Phycology**, v.10, p.121-129, 1998.

TYRAKOWSKA, B.; SOFFERS, A.E.M.F.; SZYMUSIAK, H.; BOEREN, S.; BOERSMA, M.G.; LEMANSKA, K.; VERVOORT, J.; RIETJEMS, I.M.C.M. TEAC antioxidant activity of 4-hydroxybenzoates. **Free Radical Biol. Med.**, v.27, p.1427-1436, 1999.

VIA FARMA. Dipalmitato kójico. Literatura do fornecedor, 2011.

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, 2008.

VIOLANTE, I.M.P.; SOUZA, I.M.; VENTURINI, C.L.; RAMALHO, A.F.S., SANTOS, R.A.N.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.19, n.2a, p.452-457, 2009.

WANG, M.; LI, J.; RANGARAJAN, M.; SHAO, Y.; LAVOIE, E. J.; HUANG, T.; HO, C. Antioxidative phenolic compounds from sage (*salvia officinalis*). **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p.4869-4873, 1998.

WANG, Z.; ZHOU, W. Lamellar liquid crystals of brij 97 aqueous solutions containing different additives. **J. Solution Chem.**, v.38, p.659-668, 2009.

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

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology. **J. Interferon & Cytokine Res.**, v.30, n.8, p.617-628, 2010.

WULF, H.C.; SANDBY-MOLLER, J.; KOBAYASI, T.; GNIADOCKI, R. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, p.185-191, 2004.



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

YU, L.; HALEY, S.; PERRET, J.; HARRIS, M.; WILSON, J.; QIAN, M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.1619-1624, 2002.

ZHANG, W-W.; DUAN, X-J.; HUANG, H-L.; ZHANG, Y.; WANG, B-G. Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphocladia latiuscula* (Rhodomelaceae). **J. Appl. Phycol.**, v.19, p. 97-108, 2007.

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.

ZHISHEN, 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.