



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS INOVADORES PARA
INCORPORAÇÃO DE EXTRATO SECO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*): ESTUDO DA
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E DESPIGMENTANTE *IN*
*VITRO***

RAISA LANA ÁVILA BOMBARDELLI

ARARAQUARA – SP

2012

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS INOVADORES PARA
INCORPORAÇÃO DE EXTRATO SECO DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*): ESTUDO DA
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E DESPIGMENTANTE *IN*
*VITRO***

Raisa Lana Ávila Bombardelli

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas, Universidade
Estadual Paulista – UNESP, para obtenção
do grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marlus Chorilli

ARARAQUARA –SP

2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que estiveram presentes durante o planejamento, elaboração e conclusão dele e que, de diversas formas e intensidades, me ajudaram e apoiaram para que ele fosse realizado da melhor forma possível. Dedico, especialmente, à:

Deus, por me dar a capacidade, oportunidade, força e motivação para a realização deste trabalho e, também, por colocar no meu caminho as dificuldades, as quais foram importantes para meu aprendizado e crescimento pessoal.

Aos meus pais **Liége e Wilson**, aos meus padrinhos **Tauillo e Hosana** e à minha avó materna **Aparecida**. Eles são os principais responsáveis por me ensinar o amor incondicional. A partir deles formei meus valores e princípios; tive acesso a uma educação de qualidade e a possibilidade de conhecer lugares e pessoas incríveis, as quais me agregaram valores inestimáveis; tive suporte e condição para encarar os desafios que surgiam no dia-a-dia e a ambição para me aperfeiçoar constantemente.

Aos meus irmãos **Wagner e Antônio** que fazem parte da minha vida e desde a infância me acompanham pelas minhas etapas marcantes, ora repletas de alegria, ora, de tristeza. Por eles possuo um amor grandioso e único e desejo-os o melhor que a vida possa oferecer.

Ao meu amado namorado **Lucas**, que me alegra desde o primeiro dia que o conheci. Tornou-se o meu melhor amigo, meu melhor companheiro e faz, há muitos anos, meus dias mais coloridos e carinhosos. Ele é capaz de abrir meus olhos para pontos importantes do cenário que não enxergo e de me completar com a razão quando a emoção tende a dominar.

Às minhas sinceras amigas **Kamilla B., Kathleen F., Júlia T., Maria Cláudia B., Sthefanie G., Thaísa M., Marianna M., Marília I., Ana Carolina O., Gabriella G., Mariane C.**, as quais são vitais na minha vida. Elas foram e são fundamentais para meu desenvolvimento

peçoal, são minhas confidentes, parceiras do dia-a-dia e estarão no meu coração com grande admiração e carinho. Às minhas amigas: **Beatriz T., Esther S., Fabiana R., Jamile A. e Thaísa G.**, além das palavras acima, cabem as minhas doces lembranças da “*família de Araraquara*”, fundamentada com muito amor, zelo e respeito e que, em harmonia, se manteve firme e forte por longos anos, mesmo sob a rotina da convivência diária e das épocas difíceis.

“Good friends are like stars: you don’t always see them, but you know they’re always there.”

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Tenho especial agradecimento ao meu orientador **prof. Dr. Marlus Chorilli** pela oportunidade de me inserir a iniciação científica e de possibilitar o trabalho com o chá verde e com as formulações, sabendo do meu interesse. Sou muito grata por toda a atenção que me deu durante todos esses meses, pelo apoio para a realização deste trabalho, pela dedicação durante o processo, pelo acompanhamento dos passos e por responder minhas dúvidas do projeto. Tornou-se um grande amigo.

Ao **prof. Dr. André G. dos Santos** e ao **Dr. José Ricardo Oliveira** por dedicarem tantas horas dos seus dias me auxiliando em pesquisas científicas, me ensinando as metodologias necessárias ao trabalho, seus fundamentos, a base teórica e quais eram as técnicas requeridas em cada fase. Além disso, me corrigiram várias vezes, contribuindo para o meu desenvolvimento. Com eles adquiri um aprendizado que foi de grande valia para a realização e conclusão deste trabalho.

Ao **Eduardo Santos** por me assessorar no laboratório e ter em mãos os equipamentos e reagentes pedidos nos experimentos, como também por me orientar na utilização dos mesmos.

À **Giovana Calixto**, que me acompanhou e me amparou na realização de experimentos conclusivos. A sua presença me deu segurança e rumo para a conclusão do meu trabalho quando achei que não fosse conseguir. Sou muito agradecida por toda a ajuda!

À **Érica** e **Bruna**, que atenderam as minhas dúvidas com muita paciência e dedicação.

Aos **mestrandos** e **doutorandos** do Laboratório de Farmacotécnica, por serem amigáveis e me ajudarem durante os meus experimentos com sugestões e também avaliando o andamento do trabalho.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Revisão da Literatura.....	15
2.1 Diagrama de Fases.....	15
2.2 Cristais Líquido-Cristalinos.....	15
2.3 Microscopia de Luz Polarizada.....	16
2.4 Reologia.....	18
2.5 Perfil de textura.....	19
3. Objetivos.....	20
4. Metodologia.....	20
4.1 Obtenção dos extratos secos.....	21
4.1.1 Escolha dos solventes.....	21
4.1.2 Concentração das amostras.....	23
4.1.3 Construção do Diagrama de Fases Ternário: Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos e Microscopia de Luz Polarizada dos Sistemas Obtidos.....	24
4.1.4 Estudo do Comportamento Reológico.....	25
4.1.5 Análise de Perfil de Textura das Formulações.....	24
4.1.6 Ensaios de Estabilidade Físico-Químicas para as Formulações Obtidas.....	26
4.1.6.1 Avaliação Visual.....	26
4.1.6.2 Teste de Centrífuga.....	26
4.1.6.3 Determinação do pH das Formulações Envolvidas nos Estudos.....	26
4.1.7 Avaliação das Atividades Antioxidantes dos Sistemas Líquido-Cristalinos.....	26
4.1.8 Determinação da Ação Despigmentante Através da Inibição da Enzima Tirosinase.....	27
5. Resultados.....	28
5.1 Diferentes Solventes.....	28
5.2 Diferentes Concentrações.....	33
5.3 Desenvolvimento do Sistema.....	38

5.4 Microscopia de Luz Polarizada.....	40
5.5 Determinação do Comportamento Reológico.....	43
5.6 Perfil de Textura das Formulações.....	46
5.7 Ensaios de Estabilidade Físico-Química para o Sistema Obtido.....	47
5.7.1 Avaliação Visual.....	47
5.7.2 Teste de Centrifuga.....	47
5.7.3 Determinação do pH das Formulações Envolvidas no Estudo.....	48
5.8 Avaliação da Atividade Antioxidante dos Sistemas Líquido-Cristalino.....	48
5.9 Determinação da Ação Despigmentante Através da Inibição da Enzima Tirosinase.....	50
6. Conclusão.....	54
7. Referências Bibliográficas.....	56

RESUMO

A utilização de extratos vegetais tem sido considerada uma forte tendência no desenvolvimento de formulações dermocosméticas, uma vez que podem apresentar diversas ações, como antioxidantes e despigmentantes, atuando tanto contra os processos de envelhecimento como hiperpigmentação da pele. Dentre as plantas que apresentam tais propriedades, o chá verde se destaca devido a sua riqueza em compostos polifenólicos e taninos condensados. O extrato seco de chá verde obtido através da extração com uma solução de acetona 70% apresenta o maior teor de fenólicos e flavonoides, mas pouca diferença quando comparado com o obtido de uma solução de acetona 50%. A alta concentração desses compostos no extrato seco é responsável pela ótima ação antioxidante do chá verde, tornando-o capaz de inibir 50% dos radicais livres do meio com apenas 4,62 µg/mL quando em solução metanólica. Entretanto, a sua atividade despigmentante não se torna evidenciada, com apenas 1,93% de ação com a mesma concentração de chá verde. Este extrato seco, quando incorporado a sistemas nanoestruturados como os sistemas líquido-cristalinos estabilizados com Procetyl AWS® passa a ter uma ação antioxidante potencializada, alcançando uma inibição de radicais livres em até, aproximadamente, 72%, enquanto sua capacidade despigmentante não é demonstrada, apresentando uma inibição de tirosinase de, no máximo, 0,88%. A caracterização estrutural foi realizada por meio de análises de microscopia de luz polarizada, comportamento reológico e perfil de textura das formulações. Para o estudo de estabilidade foram empregadas avaliação visual, centrifugação e pH. A atividade antioxidante foi determinada com base na ação sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e a ação despigmentante *in vitro*, avaliada quanto à inibição da tirosinase, pelo método enzimático, com leitura espectrofotométrica.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados; extrato seco de chá verde; atividade antioxidante *in vitro*; ação despigmentante *in vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Curva Padrão da Quercetina.....	29
Figura 2. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra acetona.....	31
Figura 3. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra acetona:etanol (1:1).....	32
Figura 4. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra etanol 70%.....	32
Figura 5. Curva Padrão de Quercetina.....	34
Figura 6. Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 30% acetona.....	35
Figura 7. Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 50% acetona.....	36
Figura 8. Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 70% acetona.....	36
Figura 9. Curva Padrão de Quercetina.	37
Figura 10. Diagrama de Óleo de Abacate com Procetyl AWS®.....	38
Figura 11: Diagrama Óleo de Abacate com Procetyl AWS®– Formulações Seleccionadas....	40
Figura 12. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 25 sem extrato de chá verde.....	42
Figura 13. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 29 sem extrato de chá verde.....	42
Figura 14. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 32 sem extrato chá verde.....	42
Figura 15. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 25 com extrato de chá verde.....	43
Figura 16. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 29 com extrato de chá verde.....	43
Figura 17. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 32 com extrato chá verde.....	43
Figura 18. Reologia da Formulação 25.....	44

Figura 19. Reologia da Formulação 32.....	44
Figura 20. Reologia das Formulações 25 e 32.....	45
Figura 21: Gráfico de Inibição da enzima Tirosinase.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da extração.....	28
Tabela 2. Absorbâncias das amostras para quantificação de fenólicos.....	28
Tabela 3. Absorbâncias das amostras para quantificação de flavonoides.....	29
Tabela 4. Concentração de flavonoides em 0,02mg de amostra.....	29
Tabela 5. Porcentagem de flavonoides em 0,02m de amostra.....	30
Tabela 6. Absorbância e % de inibição de DPPH, amostra acetona.....	30
Tabela 7. Absorbância e % de inibição de DPPH, amostra acetona:etanol (1:1).....	31
Tabela 8. Absorbância e % de inibição de DPPH, amostra etanol 70%.....	32
Tabela 9. Rendimento de extração.....	33
Tabela 10. Absorbância, concentração e porcentagem de fenólicos.....	34
Tabela 11. Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 30% acetona.....	35
Tabela 12. Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 50% acetona.....	35
Tabela 13. Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 70% acetona.....	36
Tabela 14. Absorbância, concentração e porcentagem de flavonoides.....	38
Tabela 15. Características de textura das formulações.....	46
Tabela 16. pH das formulações estudadas.....	48
Tabela 17. Média das absorbâncias das formulações analisadas em ensaio antioxidante.....	48
Tabela 18. Porcentagem de Inibição de Radical das Formulações Analisadas.....	49

Tabela 19. Porcentagem de Inibição de Radical desconsiderando formulações controles.....50

Tabela 20. Porcentagem de Inibição de Radical das Formulações Binárias desconsiderando as Formulações Controle.....50

Tabela 21. Concentração das soluções metanólicas de chá verde e % de inibição de Tirosinase.....51

Tabela 22. Formulações líquido-cristalina e % de Inibição de Tirosinase.....52

Tabela 23. Porcentagem de Inibição de Tirosinase desconsiderando formulações controles.....52

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação da Porcentagem de Inibição de Radical Livre.....27

Equação 2. Equação da Porcentagem de Inibição de Tirosinase.....27

1. INTRODUÇÃO

O processo de envelhecimento altera a estrutura e a função dos órgãos. No caso da pele, que é um órgão externo, também ocasiona modificação do seu aspecto. É muito importante estudar estas alterações na pele que ocorrem com o envelhecimento porque as mudanças no aspecto exterior revelam disfunções e trazem consequência psíquica sobre o comportamento da pessoa, tanto diante de si mesma como diante das outras (LÉVÈQUE, 1997).

São utilizados hoje inúmeros princípios ativos nas formulações com o objetivo de obter rejuvenescimento da face, colo e dorso das mãos. O tratamento se baseia no uso de substâncias regeneradoras, que devolvam os nutrientes essenciais e reparam danos causados à pele, e agentes antirradicais livres, que combatem o estresse oxidativo (PYTEL et al., 2005).

O processo de oxidação está relacionado à formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados. A ação dos radicais livres sobre a pele pode resultar em alterações pigmentares, conhecidas como discromias, termo utilizado para designar alterações na cor da pele (BENECH, 2002).

A utilização de plantas medicinais no mercado farmacêutico tem recebido apoio da Organização Mundial da Saúde, uma vez que cerca de 80% da população mundial faz uso de extrato vegetal para prevenção e/ou cura de sintomatologias desagradáveis. Com a população utilizando tais substâncias, o interesse da indústria começa a se voltar para esse segmento e novos produtos dermocosméticos à base de extratos são pesquisados e lançados no mercado (CARLINI, 2002).

Dentre esses extratos, o chá verde – *Camellia sinensis* - vem ganhando destaque, pois contém substâncias como os polifenóis (ácido gálico e catequinas), derivados de teogalina, galocatequinas, epicatequinas, epigalocatequinas, galato de epicatequinas e galato de epigalocatequinas (EGCG), que apresentam reconhecida ação antioxidante (GUPTA et al., 2010).

Os efeitos antioxidantes e despigmentantes do chá verde possivelmente podem ser potencializados pela sua incorporação em sistemas líquido-cristalinos. (SLCs) Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. Em 1922, G. Friedel usou o termo “estado mesomórfico” para definir este quarto estado da matéria; com isso, os cristais líquidos passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas. Quando utilizados em cosméticos podem apresentar uma série de vantagens, pelo fato de poderem promover uma liberação controlada de substâncias ativas, protegerem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação e promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (FERRARI, 1998).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diagrama de Fases

A construção de diagrama de fases pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais os sistemas micro e nanoestruturados existem e em quais proporções os componentes presentes limitam as regiões de transição de fases entre emulsão, microemulsões A/O e O/A, fases líquido-cristalinas e separação de fases (OLIVEIRA et al., 2004a; FORMARIZ et al., 2005).

2.2 Cristais Líquido-Cristalinos

Os cristais líquidos também são designados como estado intermediário ou mesomórfico da matéria, por possuírem propriedades simétricas e mecânicas intermediárias entre os sólidos cristalinos e os líquidos isotrópicos (TYLE, 1989).

Dentre a vasta gama de microestruturas liotrópicas possíveis de serem formadas com a dispersão de moléculas anfífilas em água, óleo ou na presença dos dois componentes, existem três formas bem conhecida: as fases lamelares (L_α), hexagonais (H_I = hexagonal normal e H_{II} = hexagonal reversa) e cúbicas (Q) (MUZZALUPO et al., 2009).

O arranjo estrutural das fases lamelares (L_α), hexagonais (H) e cúbicas (Q) é obtido por solvatação de moléculas anfífilas que resultam em diferentes geometrias cônicas ou cilíndricas (OLIVEIRA et al., 2009).

Na fase lamelar, as moléculas anfífilas estão dispostas em infinitas camadas bidimensionais dispostas paralelamente com alternância entre camadas polares e apolares, sendo que as cabeças polares das moléculas estão direcionadas para o meio aquoso e as cadeias hidrocarbônicas se dispõem na direção oposta, de modo a evitar a água (MUZZALUPO et al., 2009). A orientação da bicamada não é afetada pelo efeito

gravitacional, o que mantém constante a distância vertical entre as camadas. Apesar de possuir uma elevada concentração de tensoativo, esta fase líquido-cristalina se caracteriza por sua relativa fluidez, com isso, as bicamadas podem deslizar facilmente uma sobre as outras (PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005).

À medida que se aumenta a concentração do tensoativo, a largura da camada da fase lamelar também aumenta e possibilita a inclusão lateral entre as moléculas. Isto leva a uma mudança de fase e, dependendo da polaridade do agente de solvatação e do próprio tensoativo, a transição resulta na formação da fase hexagonal normal (H_I) ou hexagonal reversa (H_{II}). A fase hexagonal é nomeada após as micelas serem empacotadas hexagonalmente em estruturas cilíndricas de comprimento indefinido, por meio do qual seus grupos funcionais polares podem estar do lado de fora ou de dentro da estrutura (MUZZALUPO *et al.*, 2009).

A forma cúbica normal ou cúbica inversa formam micelas inversas esféricas e/ou elipsoidais (MUZZALUPO *et al.*, 2009). As fases cúbicas possuem uma viscosidade muito elevada e não apresentam birrefringência (PASQUALI; BREGNI; SERRAO, 2005), por este motivo, não são reconhecidas opticamente pelo microscópio de luz polarizada, porque são isotrópicas, mas podem ser distinguidos de soluções micelares isotrópicas por sua alta viscosidade e rigidez (BURDUCEA, 2004).

Dentre os métodos utilizados para a caracterização de cristais líquidos, destaca-se a microscopia de luz polarizada e a reologia (PATEL & PATEL, 2010).

2.3 Microscopia de luz polarizada

A microscopia de luz polarizada é uma ferramenta vital para a distinção de materiais isotrópicos e anisotrópicos, diante disso, os cristais líquidos são facilmente detectados através

dessa técnica devido à sua propriedade de birrefringência (FRIBERG; HILTON; GOLDSMITH, 1987).

Materiais isotrópicos (exemplo, mesofase cúbica) possuem velocidade constante, emergindo da superfície do mesmo sem alteração do plano da luz polarizada, pois esses materiais são incapazes de desviar o plano de luz incidente. Já os materiais anisotrópicos (exemplo, mesofases lamelares e hexagonais) desviam o plano de luz incidente e, com isso, as ondas de luz o atravessam a diferentes velocidades e há propriedades ópticas que mudam dependendo da direção de propagação da luz através da substância e da orientação do plano vibracional (NETZ & ORTEGA, 2002; OLIVEIRA et al., 2009).

A transição do estado sólido cristalino ao estado líquido isotrópico não é um estado único, mas uma sucessão de transições passando por diversas mesofases termodinamicamente estáveis, assim, os cristais líquidos liotrópicos podem formar uma série de estruturas específicas. A observação da textura óptica dos materiais anisotrópicos por microscopia de luz polarizada é considerada um dos mais importantes métodos para a identificação e classificação preliminar deste grande número de diferentes fases líquido-cristalinas (BURDUCEA, 2004).

As regiões mesofásicas desviam o plano de luz polarizada, e com isso são obtidas imagens características do tipo de fase formada. Por exemplo, a fase lamelar pode ser identificada através da visualização das “cruzes de malta”, a fase hexagonal através da presença de estrias ou estruturas parecidas com fibras e as estruturas isotrópicas, como microemulsões e fases cúbicas, são visualizadas como campo escuro por não desviarem a propagação da luz polarizada (SOTIRO, 2007; CARVALHO, 2009).

2.4 Reologia

Reologia designa o estudo de deformação e fluxo da matéria sobre a ação de forças, com o objetivo de descrever as relações entre as tensões e deformações, através das leis constitutivas ou do comportamento de fluxo.

Dessa forma, a determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo ou excipiente, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de qualidade dos constituintes, das formulações teste e dos produtos finais (BARRY, 1983).

Além da qualidade físico-química, a reologia avalia características sensoriais do produto relacionadas ao comportamento de fluxo que é determinado pela consistência e fácil espalhabilidade sem escoamento excessivo do produto (MASSON, 2005).

Isaac Newton foi o primeiro a descrever o comportamento de fluxo de um líquido ideal ao relacionar o gradiente de deformação (taxa de cisalhamento) como diretamente proporcional à força (tensão de cisalhamento) aplicada, sendo a proporcionalidade dada por uma constante intrinsecamente dependente da natureza do fluido.

Desse modo, os fluidos podem ser classificados como newtonianos e não newtonianos. Os newtonianos são aqueles em que a viscosidade não é afetada por mudanças da taxa de cisalhamento. Para um fluido newtoniano ideal, a tensão de cisalhamento é uma função linear da taxa de cisalhamento e a constante de proporcionalidade para esta relação η é chamada de viscosidade Newtoniana. No fluido Newtoniano somente ocorrem efeitos de atrito mecânico e o nível energético dessas interações está próximo do nível energético para ruptura e formação de pontes de hidrogênio em um líquido (SCHRAMM, 2006).

Todos os outros fluidos que não apresentam esse comportamento são chamados de não newtonianos. Os fluidos não newtonianos não apresentam uma dependência da tensão de cisalhamento com o tempo para uma taxa de deformação constante e são subclassificados em tixotrópicos e reopéticos (NAÉ, 1993).

São tixotrópicos os fluidos que apresentam diminuição da tensão de cisalhamento ou da viscosidade, com o tempo de aplicação de certa tensão de cisalhamento. Para verificar graficamente a existência de tixotropia, determina-se a velocidade de cisalhamento em ciclos nos quais se aumenta e diminui a tensão de cisalhamento. Se as curvas obtidas em cada direção forem diferentes, se obtém uma área de histerese, que caracteriza bem o fluxo tixotrópico (PAL; YAN; MASLIYAH, 1992). Enquanto que os reopéticos apresentam aumento da tensão cisalhante ou da viscosidade aumentada com o tempo, mantendo-se a mesma taxa de deformação. Ambos os fenômenos são reversíveis, sendo a reopexia um fenômeno raro de acontecer (PAL; YAN; MASLIYAH, 1992).

Esses parâmetros mecânicos analisam o comportamento de tensão-deformação das formulações, portanto, sendo possível prever os efeitos das tensões encontrados em condições fisiológicas nas formulações (Jones, 1997; SENYIGIT, 2010), tornando-se uma ferramenta essencial no estudo de sistemas de liberação de fármacos para a escolha da formulação mais adequada.

2.5 Perfil de Textura

Este teste consiste em dois ciclos de amostra de compressão, resultando em uma curva de tempo versus força a partir do qual é possível extrair propriedades mecânicas, tais como a dureza, compressibilidade, adesividade e coesão. Sendo a dureza a força máxima para deformar a formulação, a compressibilidade é o trabalho requisitado para deformar a formulação no primeiro ciclo de compressão, a adesividade é o trabalho necessário para

superar as forças atrativas entre a sonda e a formulação e, finalmente, a coesão é a razão entre o trabalho solicitado na segunda compressão e o trabalho solicitado na primeira compressão (BRUSCHI et al. 2006).

3. OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi incorporar o extrato seco de chá verde em um sistema líquido-cristalino estabilizado com Procetyl AWS® e óleo de abacate e avaliar a estabilidade físico-química e a atividade antioxidante e despigmentante *in vitro* das formulações obtidas.

4. METODOLOGIA

A. MATERIAL DE ESTUDO

O material de estudo usado durante toda a pesquisa foram extratos secos obtidos pela extração da droga vegetal de chá verde oriundo da NUTRIFARMA, lote CHVIP01/0611, doado pela Farmácia Bandeirantes.

B. EQUIPAMENTOS E REAGENTES

Os materiais utilizados para as análises foram: o sonicador Ultrasonic Cleaner (UNIQUE® USC-2800), água deionizada (GEHAKA® DG-300), balança analítica (MARTE® – AY220), espectrofotômetro (HITACHI® U-2001), álcool metílico (PA QUEMIS®), álcool etílico absoluto (QUEMIS®), DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – (ALDRICH®), acetona (QUEMIS), Balança Analyticals Standard (OHAUS® Modelo AS200, nº 9879), Procetyl AWS (CRODA®, Lote 0000531985), Reômetro (Carri Med CSL 100, modelo CLS 100), Centrífuga (Sorvall®TC6), pHmetro (Digimed®DM-23), pipeta volumétrica automática.

4.1 Obtenção dos extratos secos

Em três tubos de ensaios adicionou 20,0 mL de solventes: acetona, álcool etílico 70% e acetona:álcool (1:1) e, em cada tubo, juntou-se 2,0 g do pó chá verde adquirido comercialmente da empresa Nutrifarma. Em seguida, foram levados ao sonicador por 20 minutos e, na sequência, levados a centrífuga Sorvall®TC6, onde permaneceram por 5 minutos. A fase líquida foi removida por filtração e recolhida em um béquer e, aos resíduos da droga vegetal, foram adicionados mais 10,0 mL de seus respectivos solventes. Após mais 20 minutos no sonicador, a fase líquida foi adicionada à anterior e a parte sólida foi descartada.

As soluções extrativas foram levadas à capela e, após 5 dias, foram postas no dissecador para completa eliminação de água e/ou possíveis resíduos orgânicos. Desta forma foram obtidos três extratos secos com possíveis perfis químicos diferenciados.

Após a escolha do melhor solvente, o processo de obtenção dos extratos secos foi refeito utilizando diferentes concentrações deste solvente – 30%, 50%, 70% - a fim de se determinar qual a concentração mais adequada para a extração de compostos fenólicos e flavonóides.

4.1.1 Escolha do solvente

Para determinar o solvente mais específico e adequado para a obtenção de um extrato seco de chá verde contendo maior quantidade de compostos fenólicos e flavonoides e que também possuísse uma atividade antioxidante mais pronunciada, verificou-se a quantidade de fenólicos totais obtidas na extração.

Para a quantificação de fenólicos totais foi utilizado o reagente proposto por Otto Folin e Vintila Ciocalteu, o qual apresenta menor interferência frente à dextrinas,

melanoidinas e proteínas (SINGLETON *et al.*, 1999). O método proposto adiciona 0,1 mL de amostra (solução metanólica de 1mg/mL) a 6,0 mL de água e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu em um balão volumétrico de 10,0 mL. Após o tempo de 1 a 8 minutos e adiciona-se 1,5 mL de carbonato de sódio a 20%, completando o resto do volume com água. Após 2 horas a leitura é realizada em espectrofotômetro a 23°C em 760nm.

Para a realização do branco, 0,1 mL de metanol foi utilizado ao invés do volume de amostra.

A quantificação de flavonóide foi realizada por procedimento de hidrólise ácida (PHA), preparando como amostras uma solução metanólica de 2,0 mg/mL de cada extrato seco e transferindo 1,0 mL delas para um balão volumétrico de 10,0 mL, onde foram adicionados 1,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% e completado o volume com solução metanólica de ácido acético 2,5%. Após 30 minutos a leitura foi feita em espectrofotômetro a 23 °C e em 420nm.

Para a realização do branco, foi utilizado 1,0 mL de metanol ao invés do volume de amostra e, para a curva padrão, foram utilizadas alíquotas vindas de diluições seriadas de quercetina: 60,0; 30,0; 15,0; 7,5; 3,65 (µg/mL). Considerando que durante o procedimento ocorre diluição, a concentração da quercetina na reação foi corrigida pelo fator de diluição 10, e passou a ser: 6,0; 3,0; 1,5; 0,75 e 0,365 (ug/mL).

A atividade antioxidante foi avaliada a partir da capacidade do extrato seco de chá verde solubilizado em metanol em inibir a ação radicalar do DPPH•, conforme o método descrito por BRAND WILLIANS *et al.* (1995) e modificado por SÁNCHEZ-MORENO *et al.* (1998).

Para a avaliação dos extratos obtidos por acetona, solução álcool-acetona (1:1) e álcool etílico (70%), foram solubilizados 25,0 mg de cada extrato seco em metanol, de grau HPLC, em um balão volumétrico de 10,0 mL. Dessas soluções de 2,5 mg/mL, foram transferidas alíquotas para diferentes tubos de ensaio para que fossem então diluídas a diferentes concentrações (mg/mL): 2,5; 1,25; 0,625; 0,312; 0,156. Entretanto, devido à diluição durante o experimento, as concentrações finais de amostra presente no tubo de ensaio foram corrigidas pelo fato de diluição 40, passando a ser ($\mu\text{g/mL}$): 62,50; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90.

Por fim, 3,9 mL de solução de DPPH (25g/mL) foram adicionados a 0,1 mL de cada diferente concentração e aguardado 30 minutos no escuro para a leitura de absorbância à 23 °C em 517nm. O branco foi obtido adicionando 3,9 mL da solução de DPPH a 0,1 mL de metanol, seguindo os procedimentos acima.

4.1.2 Concentração do solvente

Para a quantificação de fenólicos, foram produzidas soluções metanólicas de 0,30 mg/mL a partir dos extratos secos recém obtidos. A curva padrão de quercetina foi feita com as seguintes concentrações (mg/mL): 0,100; 0,075; 0,050; 0,025; 0,012 e 0,006. Considerando o fator de diluição 100, a concentração em cada reação foi de ($\mu\text{g/mL}$): 1,0; 0,75; 0,50; 0,25; 0,06. O procedimento seguiu o descrito anteriormente, conforme exige a proporção de cada reagente.

Para a quantificação de flavonoide foi preparada uma solução metanólica de 0,48 mg/mL (480 $\mu\text{g/mL}$) e outra com 0,24 mg/mL (240 $\mu\text{g/mL}$), considerando o fator de diluição 10, a concentração de amostra nos tubos de ensaio durante a reação era: 48,0 $\mu\text{g/mL}$ e 24,0 $\mu\text{g/mL}$. A curva padrão de quercetina foi realizada nas seguintes concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 100; 50; 25; 12,5; 6,12 e 3,06. Com a correção do fator de diluição 10, as concentrações de

quercetina passaram a ser: 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,6; 0,3 ($\mu\text{g/mL}$). O restante do teste foi executado exatamente como descrito anteriormente, seguindo a proporção ditada.

No ensaio de atividade antioxidante, foi produzida uma solução de 1,0 mg/mL de cada extrato e diluída de forma a produzir concentrações (mg/mL) de: 0,300; 0,250; 0,125; 0,062. Novamente, devido ao fator de diluição 40, as concentrações passaram a ser ($\mu\text{g/mL}$): 7,5; 6,2; 3,12; 1,5. As análises foram realizadas em duplicatas durante três dias consecutivos.

4.1.3 Construção do Diagrama de Fases Ternário: Desenvolvimento dos Sistemas Líquido-Cristalinos e Microscopia de Luz Polarizada dos Sistemas Obtidos

A princípio, foram obtidos todos os pontos do diagrama de fases pesando em pequenos frascos de vidro Procetyl AWS® e óleo de abacate nas proporções de 1:9 até 9:1 e titulando com água, com o auxílio de uma pipeta, até completar uma quantidade final de 2,0g. Todos os frascos foram levados individualmente à aquecimento em banho-maria à 45,0 °C e agitados vigorosamente com um bastão de vidro por cinco minutos. Após um dia de descanso à temperatura ambiente e com os frascos devidamente lacrados, os mesmos foram observados contra fundo escuro e classificados macroscopicamente em sistema com separação de fases, sistema opaco de baixa viscosidade, sistema opaco de alta viscosidade, sistema translúcido de alta viscosidade, sistema transparente de baixa viscosidade e sistema transparente líquido.

As formulações que não apresentaram opacidade e nem separação de fases foram levadas à microscopia de luz polarizada para a determinação de suas características isotrópicas ou anisotrópicas. A partir destes resultados, foram escolhidos três pontos com características de fase lamelar, hexagonal e cúbica para serem refeitos com a adição de extrato seco de chá verde.

As três formulações selecionadas foram analisadas em microscopia de luz polarizada antes e após a incorporação do extrato de chá verde. Para isso, uma pequena quantidade das formulações foi colocada sobre lâminas de vidro, cobertas com lamínula e analisadas com auxílio do microscópio de luz polarizada. Foi avaliada a homogeneidade das dispersões e, com auxílio da polarização, observada a presença de área de isotropia ou anisotropia.

4.1.4 Estudo do comportamento reológico

Com a finalidade de avaliar o comportamento de fluxo das formulações foi realizado o ensaio contínuo, utilizando reômetro (Rheostress RS1 rheometer, Haake, Karlsruhe, Germany), sob as seguintes condições: sensor placa-placa (diâmetro 40 mm e gap 200 µm) para sistemas mais viscosos e sensor placa-cone (diâmetro 40mm e gap 52 µm) para sistemas menos viscosos, à temperatura de 32°C.

4.1.5 Análise de perfil de textura das formulações

Os parâmetros mecânicos das formulações foram analisados utilizando um analisador de textura TA-XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, Inglaterra) através do teste Análise de Perfil de Textura (TPA) como anteriormente descrito por Bruschi et al. (2006).

Para realização do teste, 15g de formulações foram inicialmente colocados em 3 tubos de centrifuga cônicos de 50 ml (Falcon, BD®, Franklin Lakes, EUA) e centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos (Eppendorf 5810R, Nova Iorque, EUA) para eliminar as bolhas de ar e tornar a sua superfície lisa. No modo TPA, a sonda analítica (10 mm de diâmetro) desce a uma velocidade constante de 1 mm / s, entra na amostra até uma profundidade pré-definida (10 milímetros) e retorna para a superfície a uma velocidade de 0,5 mm / s. Após este primeiro ciclo, o aparelho repousa durante 5 segundos e a segunda compressão

subsequentemente começa (JONES et al., 1997). Três amostras de cada formulação foram analisadas à temperatura de 32°C

4.1.6 Ensaios de estabilidade físico-química para as formulações obtidas

4.1.6.1 Avaliação Visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações de cor, separação de fases, homogeneidade, na temperatura ambiente e por um mês.

4.1.6.2 Teste de Centrifuga

A avaliação da estabilidade foi realizada frente à centrifuga, empregando-se 5,0 gramas de cada amostra em estudo por trinta minutos a 3000 rpm.

4.1.6.3 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

A determinação foi realizada em pHmetro, utilizando-se amostras diluídas em água Milli-Q, em uma relação de 5%.

4.1.7 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas líquido-cristalinos

Foi avaliada a atividade antioxidante dos sistemas líquido-cristalinos comparando a capacidade deles de capturar radicais livres com as soluções metanólicas obtidas com o mesmo extrato seco. Foram formulados sistemas com extrato seco (E), sem extrato seco - os controles (C) – e, também, sistemas binários contendo água, tensoativo e o extrato seco.

Em um béquer foi adicionado 1,85 mg de extrato seco de chá verde e formulado nele 10,0 g de cada formulação, respeitando a porcentagem de água, óleo e tensoativo de cada uma, obtendo assim formulações com concentração de 0,185 mg/g. Em outro béquer, 1,0 g de formulação foi diluído em 10,0 mL de metanol e, em seguida, uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo de ensaio, onde foram adicionados 3,9 mL de DPPH (25g/mL) e

obtida uma concentração de 0,4620 µg/mL por tubo. Esperou-se trinta minutos e fez-se a leitura no espectrofotômetro em comprimento de onda de 517nm. Avaliou-se a atividade captadora de radical livre conforme a equação de % de inibição do DPPH:

Equação 1. Equação da Porcentagem de Inibição de Radical Livre.

$$\% \text{ Inibição do radical DPPH} = \left(\frac{\text{Abs.máxima} - \text{Abs.amostra}}{\text{Abs.máxima}} \right) \times 100$$

4.1.8 Determinação da ação despigmentante através da inibição da enzima tirosinase

Segundo o método, em uma microplaca de 96 poços são adicionados 70,0 µL de solução tampão pH 6,8, 70,0 µL de solução aquosa de tirosina (0,3mg/mL), 60 µL de solução metanólica de chá verde em concentrações diferenciadas e 10,0 µL de solução aquosa de tirosinase (480 U/mL). Para controle negativo, ao invés de 60 µL de solução de extrato, foi acrescentado 60 µL de metanol. Feito isso, a absorbância foi medida em 492 nm em um leitor espectrofotômetro de microplacas no início da reação (tempo zero) e incubada a 30 ± 1 °C durante 60 minutos. Após o tempo, a leitura foi realizada novamente e subtraídos os valores do tempo zero; os valores do controle positivo serviram para comparação. A atividade inibitória foi calculada segundo a equação 2.

Equação 2. Equação da Porcentagem de Inibição de Tirosinase.

$$Ai = \left[\frac{C - S}{C} \right] \times 100$$

Onde, Ai = Atividade Inibitória;

C = Absorbância do controle negativo a 492 nm;

S = Absorbância da amostra a 492 nm.

A concentração da atividade inibitória 50% (Ai50%) do chá verde pode ser calculada a partir da equação da reta, obtida da relação porcentagem de atividade inibitória pela concentração.

5 RESULTADOS

5.1 Diferentes solventes

A extração procedida com os diferentes solventes rendeu uma massa e um rendimento de extrato seco conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento da extração.

Solventes	Massa (g)	Rendimento
Acetona	0,140	7,00%
Acetona + Etanol (1:1)	0,252	12,60%
Etanol (70%)	0,639	31,95%

Desses extratos secos foram produzidas as amostras para a realização dos ensaios de quantificação de fenólicos, quantificação de flavonoides e atividade antioxidante.

- **Quantificação de fenólicos:**

As absorbâncias encontradas na quantificação de fenólicos foram as presentes na Tabela 2.

Tabela 2. Absorbâncias das amostras para quantificação de fenólicos.

Amostras	Abs. ($\lambda = 760 \text{ nm}$)
Acetona	0,620
Acetona : Etanol (1:1)	0,591
Etanol (70%)	0,398

- **Quantificação de flavonoides:**

A curva padrão da Quercetina, obtida pelas concentrações de (ug/mL): 0,600; 0,300; 0,150; 0,075 e 0,036, está representada na Figura 1. Em seguida, a Tabela 3 contém as absorbâncias das soluções metanólicas dos extratos analisados:

Figura 1. Curva Padrão da Quercetina.

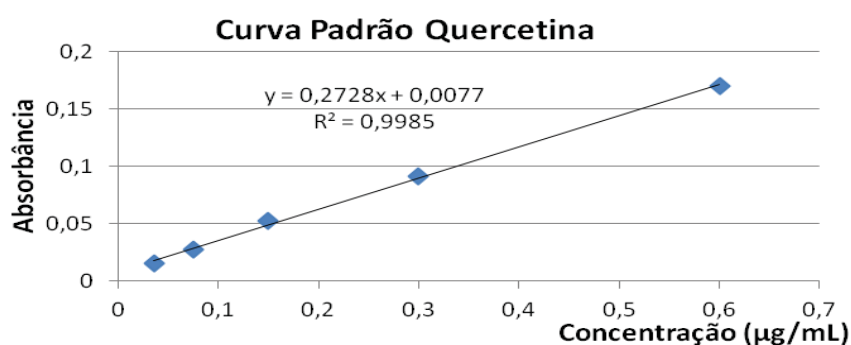


Tabela 3. Absorbâncias das amostras para quantificação de flavonoides.

Extrato Seco	Abs. ($\lambda = 420 \text{ nm}$)
Acetona	0,079
Acetona + Etanol (1:1)	0,055
Etanol (70%)	0,032

Durante o teste foi utilizado 1,0 mL de cada solução a 2,0 mg/mL e diluído novamente em 10,0 mL. Segundo a equação da reta $y = 0,2728x + 0,0077$, pôde-se calcular a concentração de flavonoides presente em cada 0,2 mg de amostra analisada, conforme descrito na Tabela 4:

Tabela 4. Concentração de flavonoides em 0,2 mg de amostra.

Extrato Seco	Concentração (µg/mL)
Acetona	0,261
Acetona + Etanol (1:1)	0,173
Etanol (70%)	0,089

A partir da concentração, foi possível calcular a porcentagem de flavonoide presente, como descrito na Tabela 5:

Tabela 5. Porcentagem de flavonoides em 0,2 mg de amostra.

Extrato Seco	Porcentagem
Acetona	1,30%
Acetona + Etanol (1:1)	0,86%
Etanol (70%)	0,44%

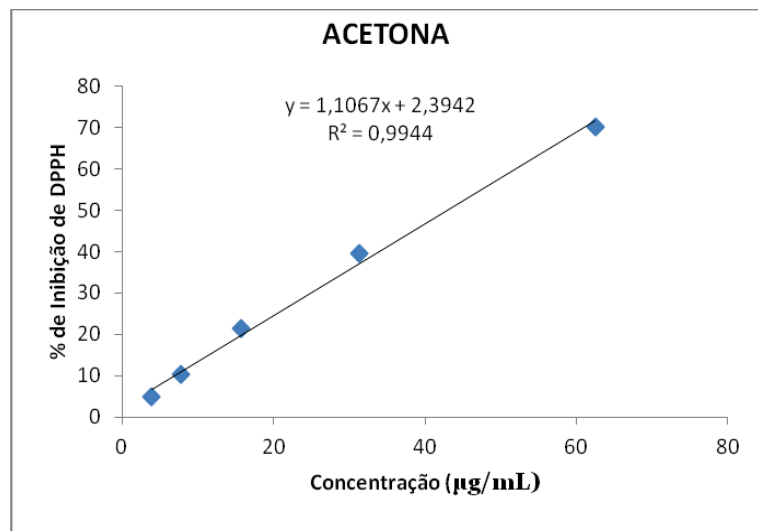
- **Atividade Antioxidante por DPPH:**

Após a leitura das absorvâncias de cada amostra, foi calculada a porcentagem de inibição de DPPH de cada concentração e desenhado seus respectivos gráficos. Nas Tabelas 6, 7 e 8 são descritos os resultados por amostra e nas Figuras 2, 3 e 4 se encontram os gráficos obtidos.

Para a porcentagem de inibição de radicais foi utilizado o cálculo da Equação 1 e a absorvância de DPPH (0,933) como a absorção máxima.

Tabela 6. Absorvância e % de inibição de DPPH, amostra acetona.

ACETONA		
Concentração (µg/mL)	Abs. (λ=517nm)	% Inibição
62,50	0,279	70,10
31,25	0,564	39,53
15,62	0,734	21,31
7,81	0,837	10,23
3,90	0,895	4,80

Figura 2. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra acetona.

Para a obtenção do IC_{50} , foi realizado o seguinte cálculo, seguindo a equação da reta:

$$IC_{50} \rightarrow y = 1,1067x + 2,3942 \rightarrow 50\% = 1,1067x + 2,3942 \rightarrow x = (50 - 2,3942)/1,1067$$

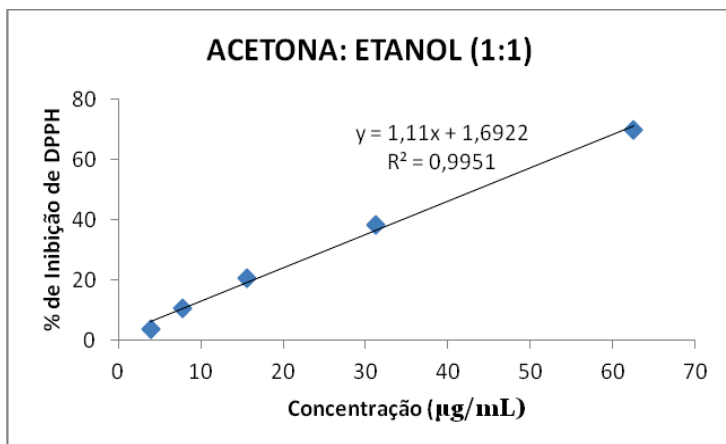
Resultando em x ou $IC_{50} = 43,0 \mu\text{g/mL}$.

Os próximos IC_{50} foram obtidos com o mesmo raciocínio.

Os valores da absorbância e da porcentagem de inibição de DPPH encontrados para a solução acetona:etanol (1:1) são segundo a Tabela 7. A partir desses dados, foi desenhado o gráfico da Figura 3.

Tabela 7. Absorbância e % de inibição de DPPH, amostra acetona:etanol (1:1).

ACETONA : ETANOL (1:1)		
Concentração (µg/mL)	Abs ($\lambda = 517 \text{ nm}$)	% Inibição
62,50	0,281	69,88
31,25	0,577	38,15
15,62	0,739	20,79
7,80	0,835	10,50
3,90	0,900	3,53

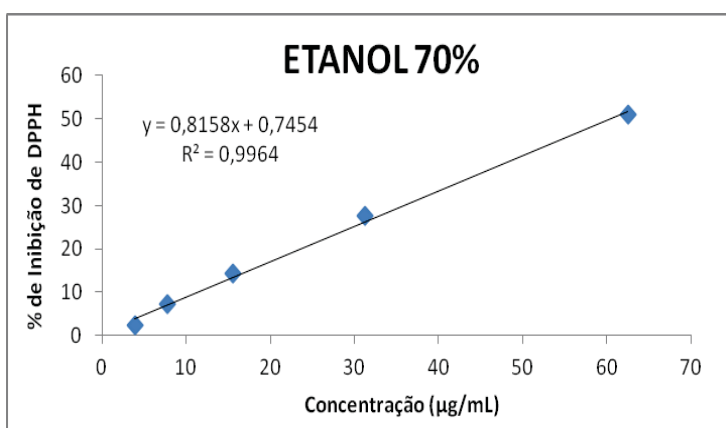
Figura 3. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra acetona:etanol (1:1).

$$IC_{50} = 43,5 \mu\text{g/mL}$$

Da amostra de etanol 70% foram obtidos os valores detalhados na Tabela 8. A partir deles foi desenhado o gráfico da porcentagem de inibição de DPPH pela concentração, conforme a Figura 4.

Tabela 8. Absorbância e % de inibição de DPPH, amostra etanol 70%.

ETANOL (70%)		
Concentração (µg/mL)	Abs. ($\lambda = 517 \text{ nm}$)	% Inibição
62,50	0,458	50,91
31,25	0,675	27,65
15,62	0,799	14,30
7,80	0,866	7,18
3,90	0,910	2,46

Figura 4. Gráfico % Inibição de DPPH pela Concentração, amostra etanol 70%.

$$IC_{50} = 60,37 \mu\text{g/mL}$$

Devido ao fato da acetona ter apresentado uma melhor ação em todos os testes, ela foi escolhida como o solvente mais adequado para a extração de compostos antioxidantes. Entretanto, era necessário se conhecer a concentração com maior capacidade de extração.

A segunda parte do trabalho se baseou em repetir todos os testes e procedimentos utilizando, desta vez, extratos seco de chá verde obtido a partir de uma solução aquosa de acetona 30%, acetona 50% e acetona 70%.

5.2 Diferentes concentrações

A extração procedida com diferente teor de acetona rendeu uma massa de extrato seco conforme a Tabela 9:

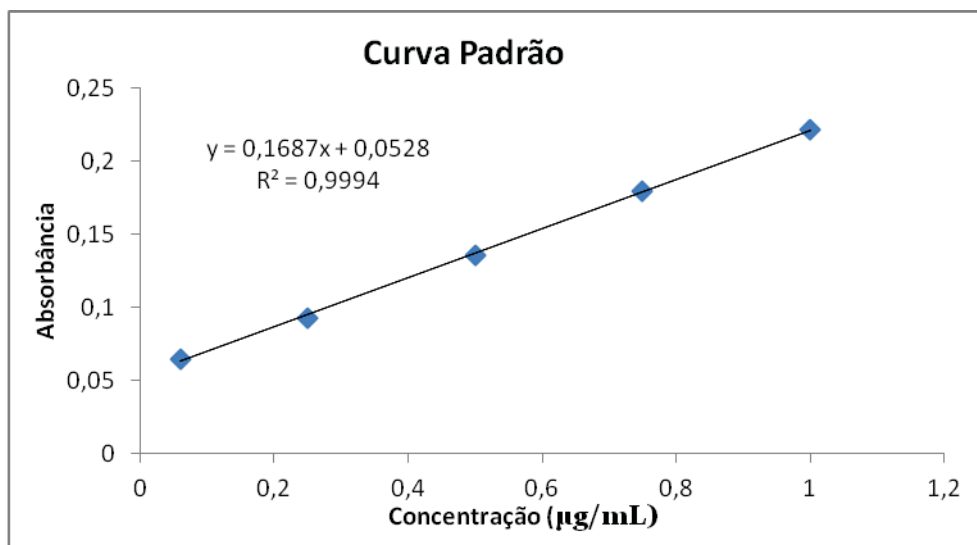
Tabela 9. Rendimento de extração.

Solventes	Massa (g)	Rendimento
Acetona 30%	0,576	28,80%
Acetona 50%	0,597	29,85%
Acetona 70%	0,645	32,25%

- **Quantificação de fenólicos:**

Foi necessário utilizar nos testes um volume de 0,1 mL das soluções preparadas e diluí-lo em 10,0 mL com outros reagentes da reação. Por causa disso se considerou o fator de diluição 100 e a curva padrão passou a apresentar as concentrações ($\mu\text{g/mL}$): 1,0; 0,75; 0,5; 0,25; 0,125 e 0,06.

Na Figura 5 segue a curva padrão da Quercetina utilizando a metodologia escolhida para o teste de fenólicos.

Figura 5. Curva Padrão de Quercetina.

Após a obtenção das absorbâncias de cada amostra e os dados da curva padrão, foi possível determinar o teor de fenólicos presente em 3,0 µg/mL (considerando o fator de diluição) e o percentual dele. Valores conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Absorbância, concentração e porcentagem de fenólicos.

Amostras	Abs ($\lambda = 760 \text{ nm}$)	[] fenólicos (µg/mL)	% de fenólicos
Acetona 30%	0,141	0,523	17,43
Acetona 50%	0,183	0,772	25,73
Acetona 70%	0,169	0,689	22,96

- **Atividade antioxidante:**

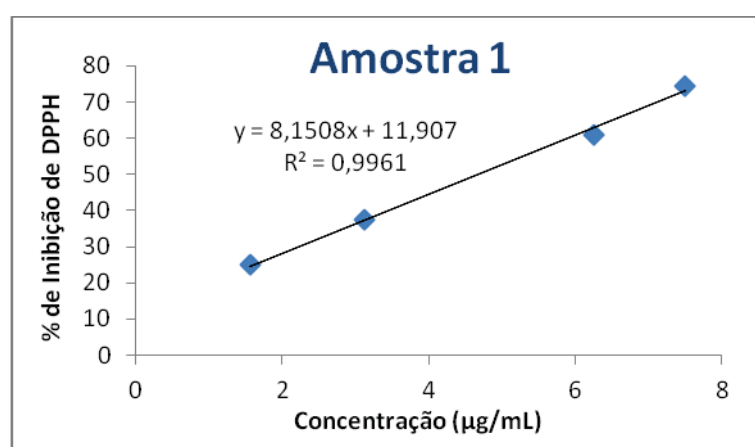
Foi tirada a média dos dados da absorbância obtidos da 1ª leitura e da sua duplicata todos os dias e, então, desenhado o gráfico de cada valor obtido. A média da absorbância máxima foi de 0,726.

Para a amostra de 30% de acetona, os valores de absorbância e porcentagem de inibição de DPPH foram conforme a Tabela 11:

Tabela 11. Média das Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 30% acetona.

Concentração (µg/mL)	Média Abs (λ 517 nm)	% Inibição
7,50	0,184	74,5%
6,25	0,281	61,0%
3,12	0,451	37,4%
1,56	0,540	25,0%

O gráfico é representado na Figura 6:

**Figura 6.** Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 30% acetona.

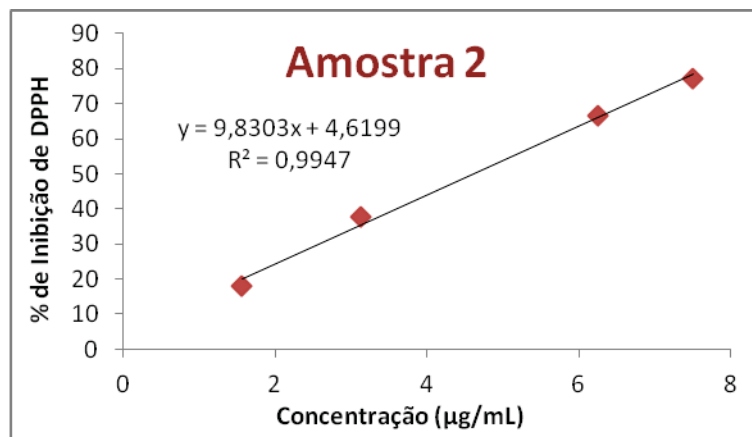
O IC₅₀ calculado foi de **4,674 µg/mL**

Para a amostra obtida de 50% acetona, os dados são os da Tabela 12. O gráfico referente se encontra na Figura 7.

Tabela 12. Média das Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 50% acetona.

Concentração (µg/mL)	Média Abs (λ = 517 nm)	% Inibição
7,50	0,163	77,4%
6,25	0,242	66,5%
3,12	0,448	37,8%
1,56	0,591	18,0%

Figura 7. Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 50% acetona.



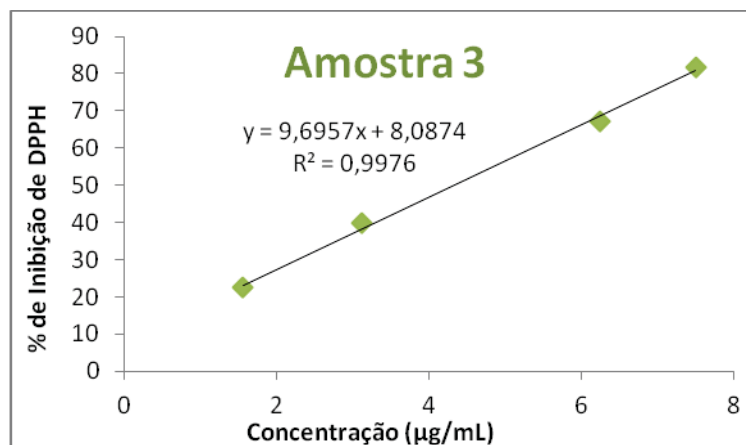
O IC₅₀ calculado foi de **4,616 µg/mL**

Para a amostra obtida de 70% acetona, os dados são os descritos na Tabela 13, o gráfico foi desenhado como na Figura 8:

Tabela 13. Média das Absorbância e % Inibição de DPPH, amostra 70% acetona.

Concentração (µg/mL)	Média Abs (λ = 517 nm)	% Inibição
7,50	0,133	81,6%
6,25	0,236	67,2%
3,12	0,434	39,7%
1,56	0,558	22,5%

Figura 8. Gráfico % Inibição de DPPH pela concentração, amostra 70% acetona.



O IC₅₀ calculado foi de **4,322 µg/mL**

Devido ao fato do IC_{50} representar qual concentração é capaz de inibir 50% dos radicais livres, o menor valor de concentração encontrado se torna o desejado.

Neste caso, na primeira leitura a amostra 2 (acetona 50%) apresentou o menor valor, porém, na duplicata, a amostra 3 (acetona 70%) foi a qual se destacou.

Tirando a média de todos os IC_{50} , obtivemos as concentrações de:

Amostra 1: **4,674 $\mu\text{g/mL}$**

Amostra 2: **4,617 $\mu\text{g/mL}$**

Amostra 3: **4,322 $\mu\text{g/mL}$**

É possível observar que a amostra com maior teor de acetona apresentou uma concentração menor para inibir os mesmos 50% de radicais livres do meio.

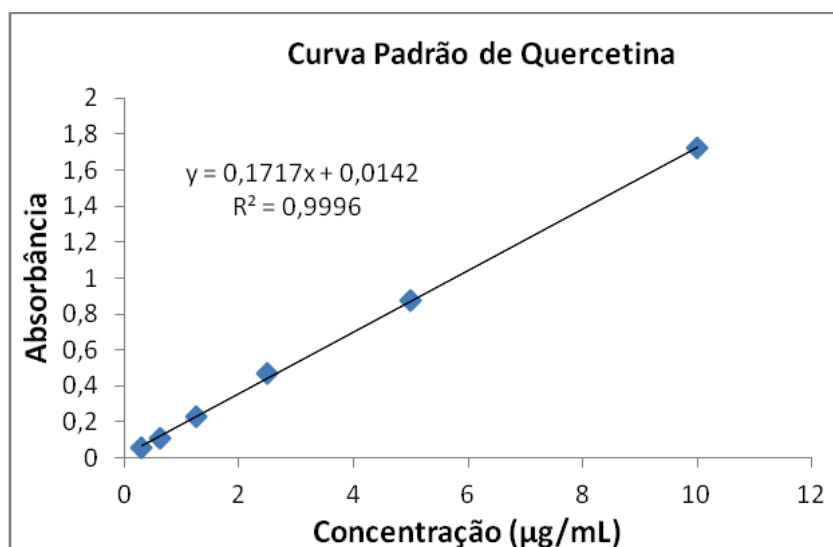
Entretanto, devido à baixa diferença dos valores de IC_{50} e a possibilidade de se obter uma extração efetiva utilizando uma menor quantidade de acetona, foi escolhido como o melhor solvente aquele com teor de acetona intermediário: 50% de acetona.

Em razão dessa decisão, apenas o extrato seco obtido com acetona 50% foi analisado pelo teste de flavonoides.

- **Quantificação de flavonoides:**

Devido à diluição ocorrida durante o teste, a curva padrão apresentou correção pelo fator de diluição e passou a apresentar a concentração de ($\mu\text{g/mL}$): 10; 5; 2,5; 1,25; 0,61 e 0,30. A Figura 9 mostra a curva padrão de Quercetina para o teste de flavonoides.

Figura 9. Curva Padrão de Quercetina.



Com os dados da curva padrão e as absorbâncias encontradas, foi possível determinar a concentração de flavonoide e o seu percentual por mL de amostra, conforme a Tabela 14:

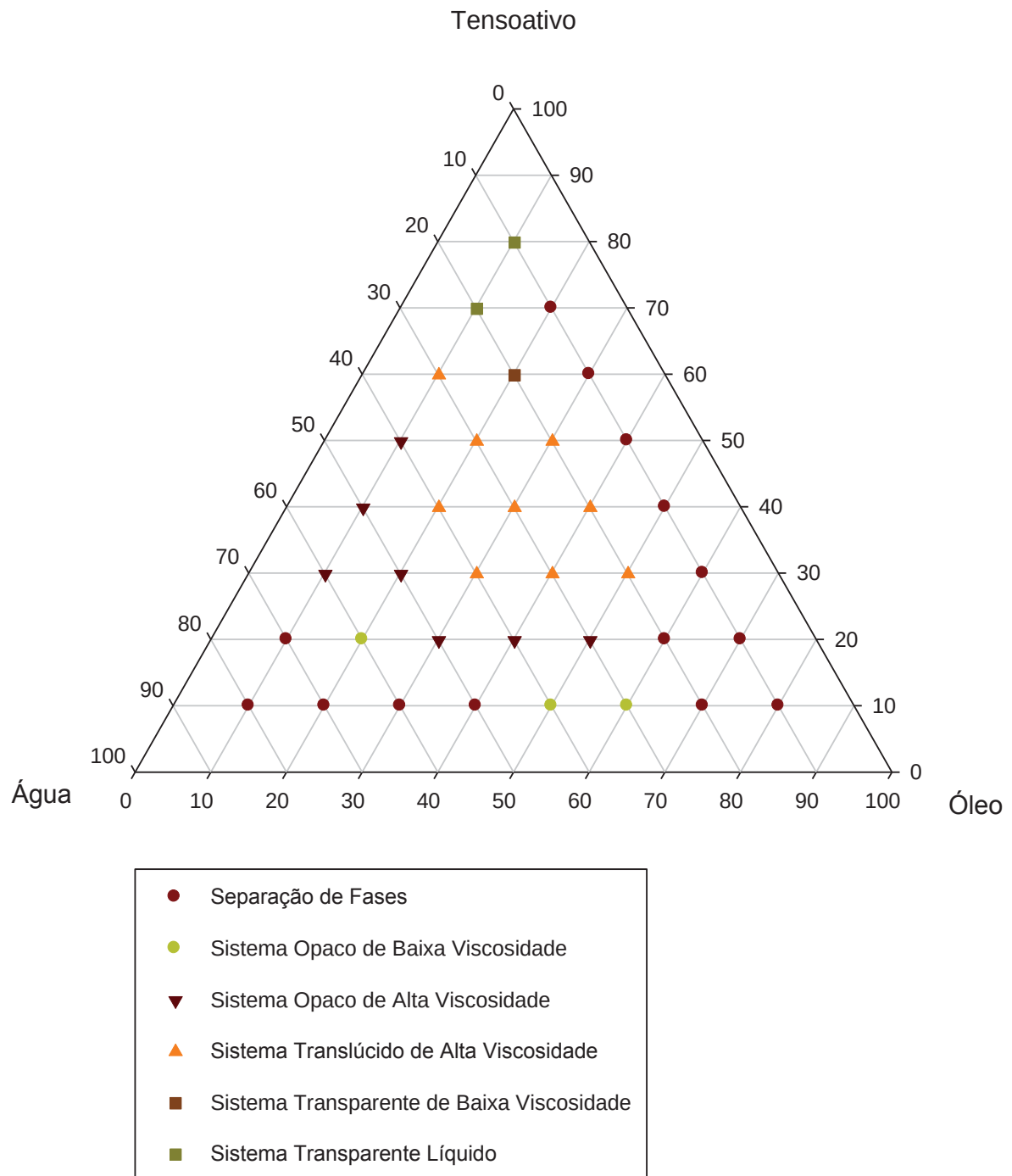
Tabela 14. Absorbância, concentração e porcentagem de flavonoides.

Concentração (µg/mL)	Abs ($\lambda=420$ nm)	[] flavonoide (µg/mL)	% de flavonoide
48	0,505	2,9	6,04
24	0,249	1,4	5,83

5.3 Desenvolvimento do sistema

As formulações obtidas apresentaram as aparências conforme o Diagrama de Fases disposto abaixo:

Figura 10. Diagrama de Óleo de Abacate com Procetyl AWS®



Os sistemas que apresentaram Separação de Fases (pontos 1; 2; 3; 4; 7; 8; 9; 14; 15; 21; 26; 30; 33 e 35) e os Opacos de Baixa e Alta Viscosidade (pontos 5; 6; 10; 11; 12; 13; 16; 17; 22 e 27) foram descartados imediatamente. Todos os sistemas Translúcidos de Alta Viscosidade (pontos 18; 19; 20; 23; 24; 25; 28; 29 e 31), os Transparentes de Baixa

Viscosidade (pontos 32) e os Transparentes Líquidos (pontos 34 e 36), foram selecionados para fazer a microscopia de luz polarizada.

O tensoativo utilizado (Procetyl AWS®) é não iônico. Há relatos que esses tensoativos podem ser mais eficientes no aumento de extensão das regiões de microemulsões em estudos de comportamento de fases (LAWRENCE & REES, 2000). Segundo Formariz & colaboradores (2005), a presença de uma longa cadeia hidrocarbônica mostra-se interessante para a formação de fases líquido-cristalinas, impedindo a possibilidade do solvente (geralmente a água) solubilizar a molécula anfifílica e originar soluções de moléculas dispersas e desordenadas. Wang & Zhou (2009) confirmam que o uso de tensoativos com cadeia hidrocarbônica longa é responsável pela formação de um rico comportamento de fases líquido-cristalinas nos sistemas a que pertencem.

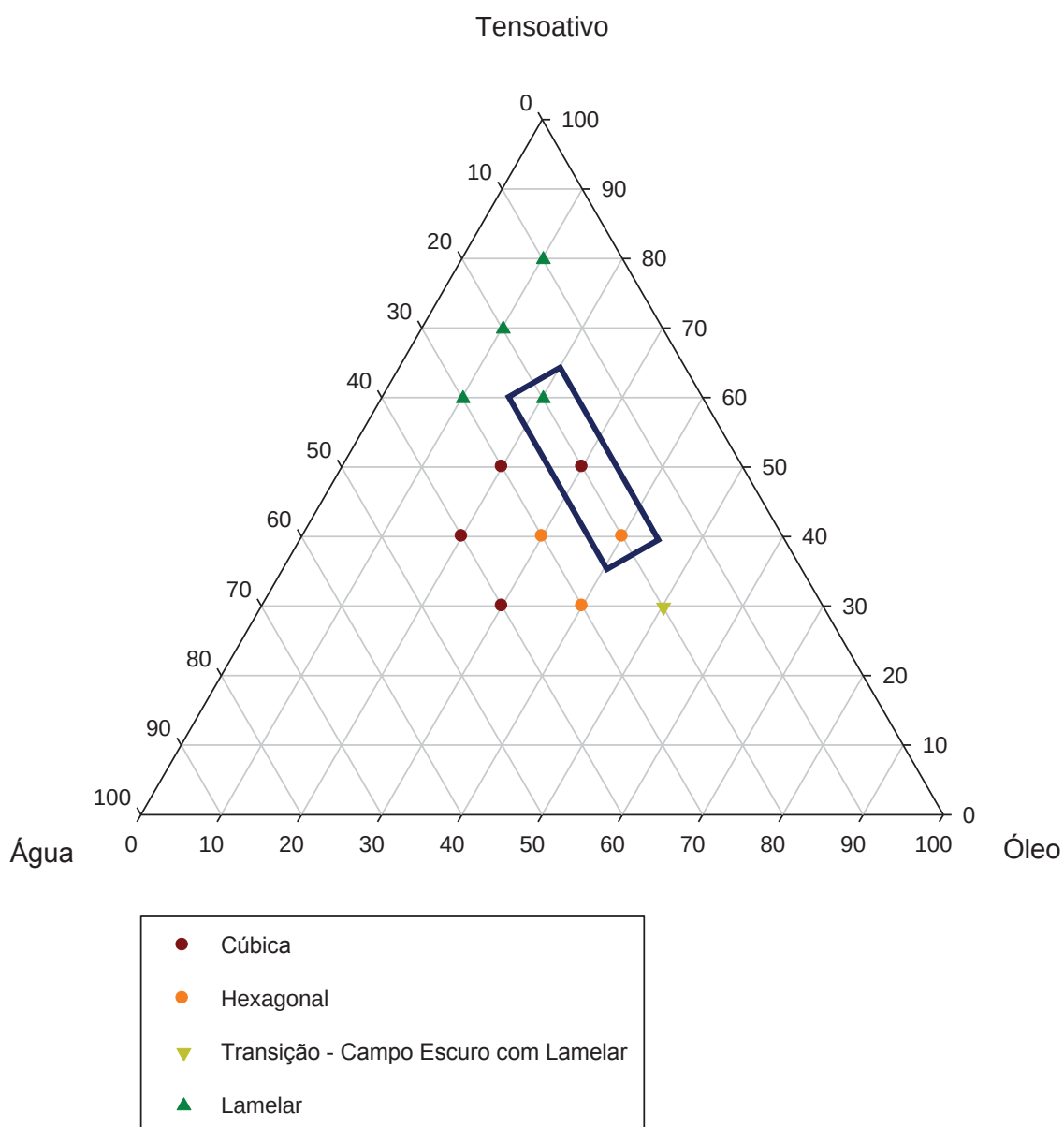
5.4 Microscopia de Luz Polarizada

As formulações que apresentaram visualmente características propícias para a incorporação de chá verde foram avaliadas em microscópio de luz polarizada. Neste momento foi observado se as amostras eram cúbica, hexagonal, lamelar ou de transição entre cúbica e lamelar.

Abaixo segue o Diagrama de Fases com as formulações selecionadas para a microscopia de luz polarizada.

Figura 11: Diagrama Óleo de Abacate com Procetyl AWS®– Formulações Selecionadas

Diagrama Óleo de Abacate com Procetyl - Formulações Seleccionadas



Dentre os doze pontos citados, três foram escolhidos para a incorporação do extrato seco de chá verde. O acréscimo considerou o valor obtido pelos experimentos realizados anteriormente, quando se obteve a concentração de 4,620 $\mu\text{g/mL}$ de chá verde por tubo de ensaio e capaz de inibir 50% dos radicais livres de DPPH[•]. Dessa forma, as formulações foram preparadas com concentração de extrato seco de 1,850 mg/g. Estes três pontos foram

selecionados por manterem a mesma proporção de água e por apresentarem diferentes características na microscopia de luz polarizada. São eles:

Formulação 25 [hexagonal – 40% tensoativo (T), 40% óleo (O) e 20% água (A)];

Figura 12. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 25 sem extrato de chá verde.



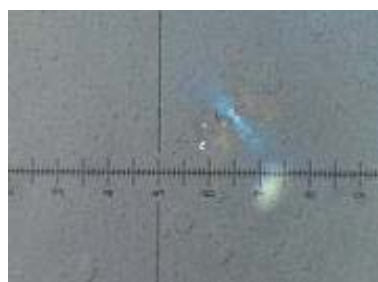
Formulação 29 [cúbico – 50% T, 30% O e 20% A];

Figura 13. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 29 sem extrato de chá verde.



Formulação 32 [lamelar – 60% T, 20% O e 20% A].

Figura 14. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 32 sem extrato chá verde.



Após a incorporação, as formulações apresentaram as seguintes características:

Formulação 25 [cúbico];

Figura 15. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 25 com extrato de chá verde.



Formulação 29 [cúbico];

Figura 16. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 29 com extrato de chá verde.



Formulação 32 [cúbico].

Figura 17. Microscopia de Luz Polarizada, formulação 32 com extrato chá verde.



5.5 Determinação do comportamento reológico

A formulação 29 sem extrato apresentou características de fluxo inadequadas, não permitindo a análise.

O comportamento de fluxo das amostras analisadas está disposto nas figuras 18 e 19. Todas as amostras exibiram comportamento não newtoniano com caráter pseudoplástico, ou seja, houve a diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento. A tensão de cisalhamento causou o desarranjo molecular do sistema, pois reduziu a resistência ao fluxo após a aplicação de força.

Dessa forma, essas formulações são adequadas para produtos indicados para uso tópico, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea (BOODTS, 2003; GAO et al., 2003)

Figura 18. Reologia da Formulação 25

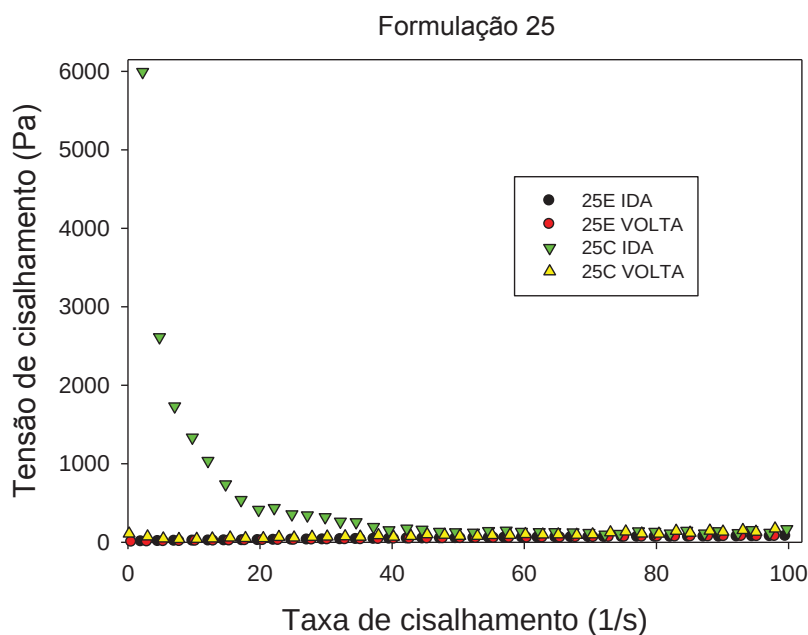


Figura 19. Reologia da Formulação 32.

Formulação 32

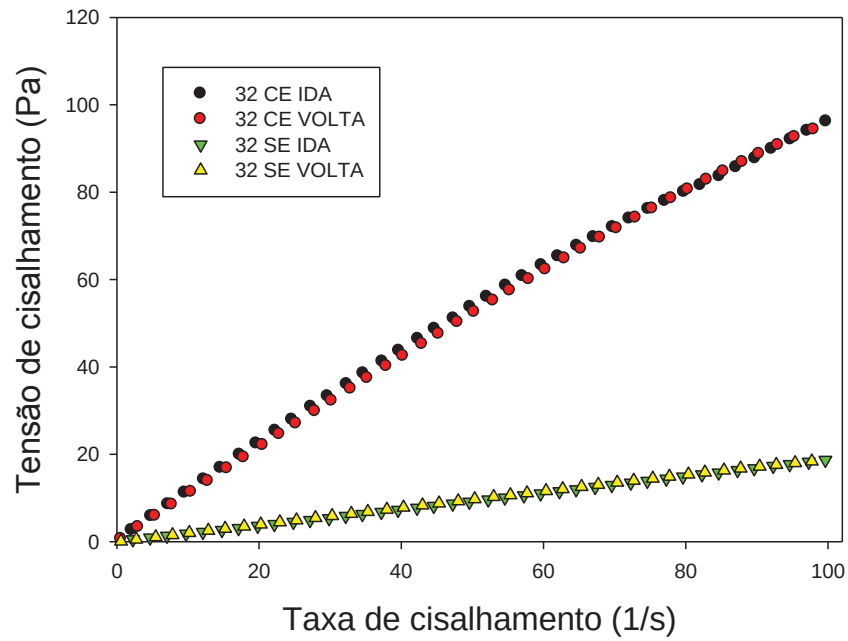
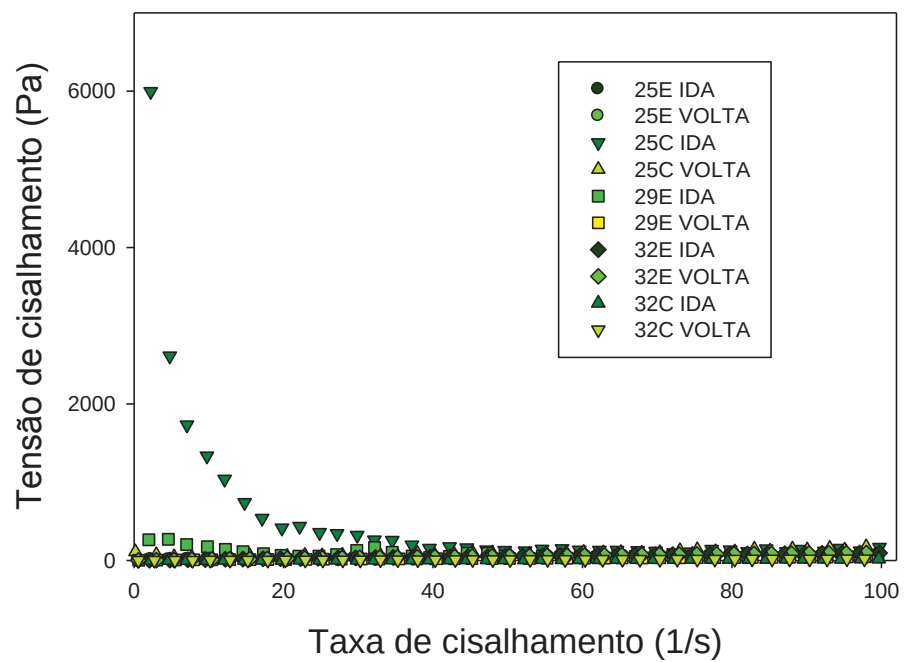


Figura 20. Reologia das Formulações 25 e 32.

Todas as Formulações



5.6 Perfil de textura das formulações

A tabela abaixo apresenta as propriedades mecânicas obtidas pela análise de textura das formulações com extrato (E) e controle (C). Na tabela consta a dureza, compressibilidade, adesividade, coesividade.

Tabela 15. Características de textura das formulações.

Formulações	Dureza (N)*	Compressibilidade (N.mm)*	Adesividade (N.mm)*	Coesividade
25C	141,92 ± 4,92	2257,68 ± 0,92	1907,09 ± 34,33	1,00 ± 0,02
25E	66,524 ± 2,13	824,75 ± 49,33	798,38 ± 10,42	1,06 ± 0,04
29C	272,05 ± 21,62	4349,69 ± 400,20	3333,73 ± 205,5	0,87 ± 0,16
29E	526,35 ± 2,10	7155,31 ± 214,2	4557,7 ± 155,99	0,66 ± 0,033

*Cada valor representa a média de três replicatas

Como pode ser observado na tabela e comprovado pela análise estatística pelo método de Tukey, o extrato quando adicionado à formulação 25 pôde diminuir significativamente a dureza, compressibilidade e a adesividade, porém, a coesividade da formulação se manteve. Entretanto, na formulação 29, todos os resultados demonstraram o comportamento inverso, pois ao adicionar o extrato, a dureza, compressibilidade, adesividade aumentaram, revelando valores muito superiores ao encontrados na literatura para formulações tópicas, portanto, não sendo viável para a via de administração proposta para a formulação.

Os resultados das formulações 25, com e sem extrato, estão relacionados com a reologia, que demonstrou que a incorporação do extrato na formulação 25 facilitou a fluidez da amostra, diminuindo sua dureza e compressibilidade, ou seja, favorecendo a administração tópica dessa formulação, já que esses dois parâmetros estão relacionados com a facilidade de remoção do produto da embalagem e a espalhabilidade do produto na pele, respectivamente.

Já a adesividade tem relação com a bioadesão, ou seja, com a interação da formulação com o substrato biológico (JONES, 1997, SENYIGIT 2010, KASHIAP, 2007). Apesar desse parâmetro da formulação 25 ter diminuído também com a incorporação do extrato, o valor resultante está consistente com os encontrados na literatura (JONES, BRUSCHI, SENIGIT).

Finalmente, o parâmetro coesividade está relacionado com a reestruturação da formulação após a aplicação de sucessivas forças de cisalhamento, ou seja, nos informa se a formulação tem a capacidade de se reestruturar totalmente após várias aplicações do produto. Nesse caso, todas as formulações demonstraram valores de coesão suficiente compatíveis para administração tópica (SENYGIT, 2010).

Tal método demonstrou que todos os valores, exceto os da coesão, são significativamente diferentes. Naquele, o 29E é significativamente mais coeso que as amostras 25E e 25C, enquanto que os outros valores não são diferentes.

As formulações 32E e 32C não foram possíveis de serem analisadas devido a sua alta viscosidade.

5.7 Ensaios de estabilidade físicos químicos para o sistema obtido

5.7.1 Avaliação Visual

As amostras não apresentaram alterações na sua cor, homogeneidade e, também, não separaram fases pelo período de um mês de observação.

5.7.2 Teste de Centrifuga

As amostras 25E, 25C, 29E, 29C e a amostra 32C apresentaram estabilidade frente à centrifugação. Entretanto, a amostra 32E apresentou separação de fases após os trinta minutos na centrifuga.

5.7.3 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

As amostras apresentaram os seguintes pH:

Tabela 16. pH das formulações estudadas.

Formulações controles	pH	Formulações com extrato	pH
25	6,56	25	4,01
29	6,67	29	4,14
32	6,15	32	4,20

Foi observado que o extrato torna o meio mais ácido.

5.8 Avaliação da atividade antioxidante dos sistemas líquido-cristalinos

As amostras selecionadas foram avaliadas pela ação antioxidante, com extrato (E) e sem extrato (C) incorporado. Para efeito de comparação, foi realizado o teste com formulações binárias (B) contendo água e tensoativo apenas, substituindo a porcentagem de óleo por água. Desta forma, a formulação 25 continha 60% de água e 40% tensoativo, enquanto que a formulação 29, 50% de água e 50% de tensoativo e a 32, 40% de água e 60% de tensoativo. O motivo foi verificar a influência do óleo na ação antioxidante do chá verde. Os resultados obtidos seguem tabela abaixo.

Tabela 17. Média das absorbâncias das formulações analisadas em ensaio antioxidante.

Concentração no tubo de ensaio ($\mu\text{g/mL}$)	Formulações	Abs ($\lambda=517\text{nm}$)
0,462	25C	0,628
	25E	0,582
	25B	0,542
	29C	0,634
	29E	0,593
	29B	0,587
	32C	0,636
	32E	0,602
	32B	0,588
	Branco	0,640

Como precisou diluir 1,0 g de formulação em 10,0 mL de metanol para se obter 0,1 mL necessário para a reação, a concentração final do tubo de ensaio passou a ser 0,462 µg/mL ao invés da desejada, 4,620 µg/mL. Devido a isso, a porcentagem de inibição precisou ser corrigida multiplicando o valor final pelo fator de diluição 10.

Portanto, os valores obtidos de porcentagem de inibição do radical de DPPH foram os obtidos na tabela:

Tabela 18. Porcentagem de Inibição de Radical das Formulações Analisadas.

Formulações	Inibição de Radical DPPH[•] (%)
25C	18,75
25E	90,62
25B	153,31
29C	9,37
29E	73,43
29B	82,81
32C	6,25
32E	59,37
32B	79,25

Este resultado evidencia a ação antioxidante do extrato de chá verde, mesmo quando acrescentado ao sistema. A diferença entre os pontos 25, 29 e 32 é a sua variação entre a porcentagem de óleo: tensoativo: água, sendo que na formulação 25 há 40% de óleo, 20% de água e 40% de tensoativo, enquanto que na 29 há 30% de óleo, 20% de água e 50% de tensoativo e na 32, 20% de óleo, 20% de água e 60% de tensoativo. Ou seja, ocorre diminuição da concentração de óleo e aumento da concentração de tensoativo nas formulações mais próximas ao pico do diagrama. Segundo os dados obtidos, esta condição prejudicou a inibição do radical livre. O sistema binário sem óleo de abacate apresentou o resultado mais favorável possível, demonstrando que o chá verde age diretamente nos radicais do óleo de abacate, preservando-o e diminuindo sua ação frente aos demais radicais livres no

meio. Para contornar esse problema é sugerido adicionar um agente antioxidante, além do chá verde, a fim de evitar a auto-oxidação do óleo de abacate. As formulações com e sem extrato (controle) apresentaram uma diferença relevante. Quando subtraído o valor de porcentagem controle da porcentagem das formulações contendo extrato, obtêm esses resultados:

Tabela 19. Porcentagem de Inibição de Radical desconsiderando formulações controles.

Formulações	Inibição de Radical DPPH [•] (%)
25 E	71,87
29 E	64,06
32 E	53,12

Tabela 20. Porcentagem de Inibição de Radical das Formulações Binárias desconsiderando as formulações controle.

Formulações	Inibição de Radical DPPH [•] (%)
25 B	134,56
29 B	73,44
32 B	73,00

5.9 Determinação da Ação Despigmentante Através da Inibição da Enzima Tirosinase

O ensaio despigmentante foi realizado baseado na capacidade do extrato de chá verde de inibir a ação da enzima tirosinase após o tempo de uma hora. Para isso, utilizou-se como amostra soluções metanólicas do extrato de chá verde em concentrações graduadas e, também, as formulações líquido-cristalinas com (E) e sem a incorporação do extrato (C).

As soluções metanólicas de chá verde foram graduadas em (mg/mL): 8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25; 0,125. Porém, para a realização do teste, 60 µL dessas soluções foram diluídos à 210 µL, portanto, a concentração analisada passou a ser de (µg/µL): 2,286; 1,143; 0,572; 0,289; 0,143; 0,072; 0,036.

Após a adição de todos os reagentes do teste, deve-se ler de imediato a absorbância das soluções nos poços. Estes valores foram utilizados como o branco da reação. Passado o

período de uma hora da placa em incubação a 35°C, foi refeita a leitura no espectrofotômetro e a absorbância obtida foi então subtraída pelo branco. Esta diferença que é usada como a absorbância da amostra.

Para obter a porcentagem de inibição, é preciso utilizar a fórmula da Equação 2, referente à Inibição de Tirosinase. O controle negativo, obtido adicionando 60 µL de metanol à reação, teve também seu valor subtraído da absorbância inicial e resultou em 0,683.

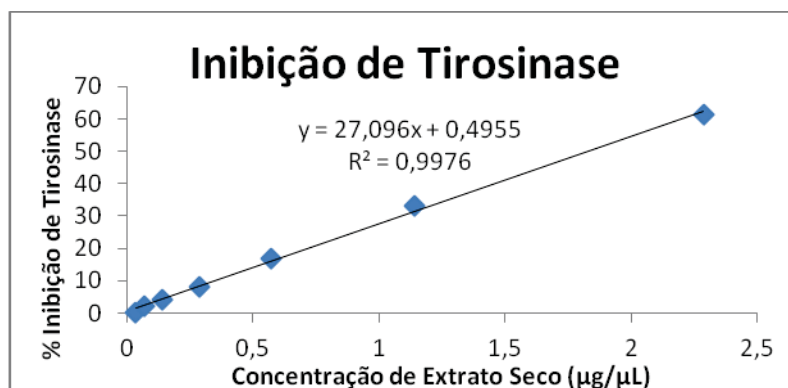
Os resultados foram os seguintes:

Tabela 21. Concentração nos tubos de ensaio das soluções metanólicas de chá verde e % de inibição de Tirosinase.

Concentração (µg/µL)	Diferença de Abs (λ=492nm)	Inibição da Tirosinase (%)
0,036	0,682	0,15
0,072	0,667	2,34
0,143	0,654	4,25
0,289	0,627	8,20
0,572	0,567	16,98
1,143	0,456	33,24
2,286	0,264	61,35

O gráfico obtido da inibição da enzima tirosinase pela solução metanólica do extrato de chá verde se apresenta logo abaixo. Com ele foi possível calcular a AI_{50} da enzima.

Figura 21: Gráfico de Inibição da enzima Tirosinase.



Conforme a equação obtida pelo gráfico foi possível obter a Ai_{50} :

$$Ai_{50} \rightarrow y = 27,096x + 0,4955 \rightarrow 50 = 27,096x + 0,4955 \rightarrow x = (50 - 0,4955)/27,096 \rightarrow$$

$$x = 1,827 \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

A Ai_{50} equivale a aproximadamente 1,83 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Este valor é capaz de inibir 50% da enzima tirosinase e desempenhar uma ação despigmentante, como o desejado.

As formulações líquido-cristalinas estudadas, pontos 25, 29 e 32, foram preparadas com (E) e sem a adição de extrato (C), sendo a adição de extrato o suficiente para uma concentração de 0,185mg/g de formulação. Para o teste, 10,0 mg de cada amostra foi diluída em 10,0 mL de metanol e retirando uma alíquota de 60,0 μL como amostra. Desta forma o poço de 210,0 μL apresentava uma concentração de 0,053 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, ou seja, nele havia 11,10 μg de chá verde para inibir 10 μL de tirosinase 480 U/mL. As amostras apresentaram esses desempenhos, após serem corrigidas pelo fator de diluição 3,5:

Tabela 22. Formulações líquido-cristalina e % de Inibição de Tirosinase.

Formulações	Diferença de Abs ($\lambda=492\text{nm}$)	% de Inibição de Tirosinase
25C	0,676	1,02
25E	0,670	1,90
29C	0,677	0,88
29E	0,672	1,61
32C	0,678	0,73
32E	0,674	1,31

Tabela 23. Porcentagem de Inibição de Tirosinase desconsiderando formulações controles.

Formulações	Inibição de Tirosinase (%)
25	0,88
29	0,73
32	0,59

A ação despigmentante de cada formulação seguiu o padrão da ação antioxidante obtida de cada amostra. Ou seja, a formulação 25, que possui a maior ação antioxidante, continuou possuindo a maior capacidade despigmentante, enquanto que a formulação 32 continuou apresentando a menor atividade despigmentante. Embora as formulações não tenham apresentado o resultado despigmentante tão relevante quanto à ação antioxidante, ele foi proporcional ao obtido pela solução metanólica de chá verde.

Utilizando a equação da reta foi possível obter a inibição de tirosinase que supostamente deveria ser inibida por 0,053 µg/µL.

$$y = 27,096x + 0,4955 \rightarrow y = 27,096 \cdot (0,053) + 0,4955 \rightarrow y = \mathbf{1,93\%}$$

O resultado obtido para a amostra 25 foi de 0,88%, enquanto que a amostra 29, de aproximadamente 0,73% e a 32, 0,59%. Estes resultados mostram que o chá verde, quando incorporado ao sistema, apresenta menor ação despigmentante que o esperado da sua capacidade.

6 CONCLUSÃO

Com o chá verde - espécie *Camellia sinensis* – se obtém um extrato vegetal rico em compostos antioxidantes. Existe uma grande variação na sua composição, mas de forma geral apresentam catequinas (epigallocatequinas, epigallocatequina-3-galato, epicatequina galato e galocatequina), flavonoides (quercetina, quercetina, miricetina), cafeína, teofilina, alcaloides (teobromina), ácido polifenólicos e ácido gálico. (F'GUYER et al., 2003)

Após os ensaios realizados, foi possível concluir que a acetona é o solvente com maior capacidade de extração de compostos antioxidantes, como os polifenóis e flavonoides. Estes são capazes de bloquear ou diminuir as reações de oxidação induzidas pelos radicais livres, os quais podem lesionar células, proteínas, lipídeos e ácidos graxos.

Dentre os teores de acetona estudados, o de 70% se mostrou levemente mais eficiente do que aquelas soluções com acetona mais diluída. Contudo, devido ao fato de poder se utilizar menos solvente orgânico para uma extração praticamente tão eficiente quanto a de maior teor, foi preferível adotar como padrão a solução aquosa de acetona 50%, o intermediário. Assim, é conseguido um processo mais econômico e ecologicamente propício.

Dada à completa evaporação da acetona durante a conversão da solução extrativa para o extrato seco, esse extrato seco se torna viável para sua incorporação em formulações tópicas.

Na incorporação do extrato seco de chá verde a um sistema líquido-cristalino foi constatado que a sua característica antioxidante é potencializada, enquanto, a sua ação despigmentante é prejudicada. A baixa atividade despigmentante do chá verde pode ser devido a uma inibição no transporte do melanossoma dos melanócitos para os queratinócitos

e/ou também na inativação da enzima tirosinase (RIBEIRO & OHARA, 2002), entretanto, como foi demonstrado, o chá verde não apresenta esta eficácia tão pronunciada como outros despigmentantes.

Dentre as formulações utilizadas para a incorporação do extrato, a formulação 25 foi aquela que apresentou maior relevância das características antioxidantes e despigmentante do chá verde. Tal fato pode ser devido a maior solubilidade do chá verde em 40% de Procetyl AWS[®], 40% óleo e 20% água, quando comparado às outras formulações, que apresentam menor porcentagem de óleo, embora apresentem maior porcentagem de tensoativo.

A formulação 25 é também a mais indicada para um produto tópico, pois possui um favorável perfil reológico e de textura, uma vez que apresenta comportamento não newtoniano e com caráter pseudoplástico e, também, coesividade. No caso, eles auxiliam na espalhabilidade e na formação de um filme uniforme sobre a superfície cutânea. Além disso, quando incorporado o extrato nesta formulação, houve uma facilidade na fluidez da amostra diminuindo a dureza e a compressibilidade e, mesmo apresentando uma baixa na adesividade após a adição do chá, ela ainda apresentou uma bioadesão condizente com a literatura para esse tipo de produto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARRY, B.W.; *Dermatological formulations*. New York: Marcel Dekker, 1983.

BENECH, G. Novo ativo clareador extraído de cítricos. **Cosmetics & Toiletries**, v.14, p.51-53, 2002.

BOODTS, J.B. **Estabilidade química e física de formulações dermocosméticas contendo retinaldeído**. 2003. 123p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

BURDUCEA, G.; Lyotropic liquid crystals. I.-specific structures. **Romanian Reports in Physics**, v.56, n.1, p.66-86, 2004.

BRUSCHI, M.L.; **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação de própolis intrabolsa periodontal**. Tese de Doutorado, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP, 2006.

CARLINI, E.; A força dos fitoterápicos., **Racine**, n.71, p. 15-17, 2002.

CARVALHO F.C.; **Desenvolvimento e caracterização de sistemas nanoestruturados para potencial administração nasal de zidovudina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleo de andiroba e copaíba.** 1998. 147p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FORMARIZ, T.P.; COCENZA URBAN, M.C.; da SILVA-JÚNIOR, A.A.; DAFLON GREMIÃO, M.P.; de OLIVEIRA, A.G.; Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistema de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Cienc.Farm.**, v. 41, n.3, p.301-313, 2005.

FRIBERG, S.E.; HILTON, M.L.; GOLDSMITH, L.B. Emulsion are not only two liquids. **Cosmet. Toilet.**, v.102, n.2, p.87-96, 1987.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v.19, n.1, p.56-72, 2003.

GAO, T.; TIEN, J.M.; CHOI, Y.H. Sunscreen formulas with multilayer lamellar structure **Cosmet. Toiletries**, v. 118, n.10, p.41-52, 2003.

GUPTA, V.; BANSAL P.; NIAZI J.; KUMAR S. **Phytochemistry and pharmacology of Camellia sinensis.** National Institute of Ayurvedic Pharmaceutical Research, CCRAS, Patiala, India, 2010.

JONES, D.S.; WOOLFSON, A.D.; BROWN, A.F.; Textural, viscoelastic and mucoadhesive properties of pharmaceutical gels composed of cellulose polymers. **International journal of pharmaceutics**, 151, p. 223-233, 1997.

LAWRENCE, M.J.; REES, G.D.; Microemulsion based media as novel drug delivery systems. **Adv. Drug Del. Rev.**, v. 45, n.1, p.89-121, 2000.

LÉVÈQUE, J. L. Caracterização biofísica do fotoenvelhecimento cutâneo. **Cosmét. Lin.**, n.106, p. 55-66, 1997.

MACRINI, D.J.; **Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase.** [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2004.

MASSON D.S.; **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsões O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes.** [Dissertação] Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP; 2005.

MUZZALUPO, R.; TAVANO, L.; TROMBINO, S. CASSANO, R.; PICCI, N. Lyotropic liquid crystals for tropical delivery system. In: SONGJUN LI. **Current focus on colloids and surfaces.** India: Transworld research network, 2009. P.285-302.

NAÉ, H.N.; Introduction to rheology. In: LABA, D. **Rheological properties of cosmetics and toiletries.** New York: Marcel Dekker, 1993. P.9-33. Cosmetic Science and Technology Series, v. 13.

NETZ, P.A.; ORTEGA, G.G. **Fundamentos de físico-química: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas.** Porto Alegre: Artmed, p. 299, 2002.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CHIAVACCI, L.A.; EGITO, E.S.T.; Microemulsions: physico-chemical approaches on the systems for pharmaceutical applications. In: SONGJUN LI. **Current focus on colloids and surfaces.** India: Transworld research network, p.57-84, 2009.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P.; Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v.27, n.1., p.131-138, 2004a.

OLIVEIRA, J.M.; Fundamentos dos radicais livres. **Cosmet. Toilet.** (edição em Português), v.14, n.2, p.40-45, 2002.

PAL. R.; YAN. Y.; MASLIYAH, J.; Rheology of Emulsions. In: SCHRAMM, L.L.; Emulsions- **Fundamentals and Applications in the petroleum industry**. Washington: Advances in Chemistry Series, 1992. p. 131-170.

PASQUALI, R.C.; BREGNI, C.; SERRAO, R.; Estructura de las principales fases líquido-cristalinas liotrópicas. **Acta Farm. Bonaerense**, v.24, n.3, p.453-457, 2005.

PATEL, R.; PATEL, T.N. Liquid crystals and their application in the field of drug delivery. In: FANUN, M. **Colloids in Drug Delivery**. USA: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010. P.311-336.

PYTEL, R.F.; SILVA, L.V.N.; NUNES, A.S.; GESZTESI, J.L.; COSTA, F. Estudo in vivo de atividade antirradicalar por quantificação de peróxidos cutâneos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.80, sup.3, p.S323-328, 2005.

RIBEIRO, C.J.; OHARA, M.T.; Hiperpigmentação localizada da Pele – Manifestação inestética que exige cuidados. **Revista Racine**, São Paulo, v.67, p.62-66, 2002.

RUFINO. M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D.; Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. **Comunicado Técnico on Line**, v. 127, Fortaleza, 2007.

SCHRAMM, G.; Reologia e reometria: Fundamentos teóricos e práticos. Ed. Artiliber, São Paulo, 2006.

SENYIGIT, T.; TEKMEI I.; SONMEZ U. SANTI P.; OZER O.; Deoxycholate hydrogels of betamethasone-17-valerate intended for topical use: In vitro and in vivo evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, 403, p. 123-129, 2011.

SINGLETON V.; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTÓS, R.; Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SOARES, L. A.; MARQUE, G.; MONTEIRO, R.; LEÃO, W.; LYRA M.; PEIXOTO M.; ROLIM-NETO, P.; XAVIER H.; Avaliação de Procedimentos para Quantificação Espectrofotométrica de Flavonoides Totais de Folhas de *Bauhinia forficata* LINK. **Química Nova**, v. XY, n. 00, 2011.

SOTIRO, K.R.; **Estudo da estabilidade química, física e liberação *in vitro* da eritromicina veiculada em sistemas líquido-cristalinos para tratamento da *acne vulgaris***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

TYLE, P.; Liquid crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH publishers, 1989, p. 125-162.

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