

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA
O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

LETÍCIA CARAMORI CEFALI

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Vera Lucia Borges Isaac
CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Hérica Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA
O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

LETÍCIA CARAMORI CEFALI

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e
Medicamentos da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas, UNESP, como parte dos
requisitos para a obtenção do Título de
Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Vera Lucia Borges Isaac
CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Hérída Regina Nunes Salgado

ARARAQUARA - SP

2009

Ficha Catalográfica

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

C389d Cefali, Letícia Caramori
Desenvolvimento e atividade do fitocosmético contendo licopeno para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo / Letícia Caramori Cefali. – Araraquara, 2009.
136 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas
Orientador: Vera Lucia Borges Isaac
Co-orientador: Hérica Regina Nunes Salgado

. 1.Licopeno. 2.Fitocosmético. 3.Envelhecimento cutâneo. I.Isaac, Vera Lucia Borges, orient.. II.Salgado, Hérica Regina Nunes, co-orientador.
III.Título.

CAPES: 40300005

DEDICATÓRIA

Dedico o meu mestrado e todo meu esforço à minha família que é o sentido da minha vida, além de ser a fonte de toda a minha energia de viver e de sonhar, apesar da falta e da saudade que sinto do meu amado pai, que certamente está muito feliz por esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que sou e que foi oferecido a mim, principalmente à minha família e a saúde de todos nós. Agradeço por proporcionar todo o aprendizado que adquiri no mestrado, podendo assim, ser mais capaz de ensinar pessoas que como eu, sonhava em ser farmacêutica.

Agradeço à minha família pelo amor que sentem por mim e todo o apoio que me deram neste período e por toda a minha vida. E se não fosse o amor de vocês, eu não conseguiria suportar todas as dificuldades.

Agradeço ao carinho, a amizade e a ajuda dos amigos que conquistei aqui. À Silvine, à Bruna, à Jemima, à Ana, à Juliana, à Paula, à Fernanda Flores, à Tati, à Lara, à Hannah, à Nathália, à Marina, à Carol, à Hanako, à Fernanda, à Flávia Chiva, à Flávia Ribeiro, à Paula, à Hilris, à Gisele, à Ana Paula, à Joceana, ao Giovanne, ao Guilherme, ao Marcelo, ao Zé, ao Daniel,... E principalmente à Cris e à Flávia pela ajuda na realização de alguns ensaios, além da grande amizade. Sentirei muita falta de todos.

Agradeço aos técnicos de laboratório, Matheus, Osmar, Luciana, Fátima, Angélica, Berê, que me ajudaram muito, principalmente com a doação de reagentes, empréstimos de vidrarias... e amizade.

Às secretárias Claudia, Laura e Sônia da pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, por toda ajuda e atenção.

Agradeço às Prof^a Dr^a Rosemeire Cristina Linhares Rodrigues Pietro e Prof^a Dr^a Thaís Maria Bauab por ter me apoiando na fase mais difícil da minha vida, enquanto era aluna especial.

Agradeço ao Pro^o Dr^o Luis Vitor Silva Sacramento pela atenção e ajuda prestada sempre quando precisei.

Às Prof^a Dr^a Marisa Spirandeli Crespi, Prof^a Dr^a Maria Vitória Lopes Brada Bentley e Prof^a Dr^a Rosângela Gonçalves Peccinini pela atenção e colaboração neste trabalho.

Ao Prof^o Dr^o André Gonzaga dos Santos que contribuiu muito para a realização do trabalho. Muito obrigada.

Agradeço à Prof^a Dr^a Chung Man Chin pela aquisição do padrão analítico de licopeno. Nem tenho como agradecer.

Agradeço à minha orientadora Profª Drª Vera Lucia Borges Isaac pela atenção que me deu quando entrei em contato pela primeira vez, por proporcionar a realização do mestrado e por toda a orientação.

Agradeço à Profª Drª Hérica Regina Nunes Salgado pela co-orientação e acima de tudo, pela atenção e o carinho com que sempre me tratou, sendo pedindo sua ajuda e orientação, ou mesmo encontrando nos corredores da faculdade.

E finalmente, agradeço muito ao Profº Drº Marcos Antonio Corrêa que me ajudou muito com sua orientação, conseguiu adquirir o caríssimo padrão de licopeno, me atendeu com carinho sempre que pedi sua ajuda ou sua opinião, pela confiança que depositou em mim, e pela sua amizade, que é muito valiosa. Devo muito deste mestrado ao senhor.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS.....	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ÍNDICE DE TABELAS.....	15
RESUMO.....	17
ABSTRACT.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
CAPÍTULO 1 - OBTENÇÃO DE EXTRATO DE TOMATE CONTENDO LICOPENO PARA USO COSMÉTICO NO COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	21
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1.1. Envelhecimento cutâneo.....	21
1.2. Uso de substâncias antioxidantes no combate ao envelhecimento cutâneo.....	21
1.3. Licopeno	24
1.4. Validação do método de quantificação de substâncias.....	27
1.5. Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	28
2. OBJETIVO.....	28
3. MATERIAL E METÓDOS.....	29
3.1. Material, acessórios e equipamentos.....	29
3.2. Métodos.....	30
3.2.1. Obtenção das amostras de tomate.....	30
3.2.2. Obtenção da polpa de tomate.....	30
3.2.3 Obtenção do extrato contendo licopeno.....	31
3.2.4. Identificação do licopeno por espectrofotometria no UV/VIS.....	31
3.2.5. Identificação e quantificação do licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	31
3.2.5.1. Doseamento do licopeno nos diferentes tipos de tomate por CLAE.....	32
3.2.5.2. Validação do método analítico por CLAE.....	32
3.2.5.2.1. Obtenção da curva analítica do padrão de licopeno.....	32
3.2.5.2.2. Precisão.....	32

3.2.5.2.3. Exatidão.....	33
3.2.5.2.4. Robustez.....	33
3.2.5.2.5. Limite de detecção e quantificação.....	33
3.2.5.2.6. Seletividade.....	34
3.2.6. Estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	34
3.2.7. Determinação do tomate de escolha para a realização do desenvolvimento do fitocosmético contendo licopeno.....	35
3.2.8. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	35
3.2.9. Análise estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1. Obtenção da polpa de tomate.....	38
4.2. Obtenção do extrato contendo licopeno.....	38
4.3. Identificação do licopeno por espectrofotometria no UV/vis.....	39
4.4. Identificação e quantificação do licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	41
4.4.1. Doseamento do licopeno nos diferentes tipos de tomate por CLAE.....	42
4.4.2. Validação do método analítico de quantificação por CLAE.....	43
4.4.2.1. Obtenção da curva analítica.....	43
4.4.2.2. Precisão.....	44
4.4.2.3. Exatidão.....	45
4.4.2.4. Robustez.....	46
4.4.2.5. Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	47
4.4.2.6. Seletividade.....	47
4.5. Estudo da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	47
4.6. Determinação do tomate de escolha para a realização do desenvolvimento do fitocosmético contendo extrato com licopeno.....	53
4.7. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	54
5. CONCLUSÃO PARCIAL.....	54

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	55
6. REVISÃO DA LITERATURA.....	55
6.1. Formulações cosméticas.....	55
6.2. Estabilidade das emulsões.....	57
6.2.1. Reologia.....	58
6.2.2. Análise térmica.....	59
7. OBJETIVO.....	59
8. MATERIAL E MÉTODOS.....	60
8.1. Material, acessórios e equipamentos.....	60
8.2. Métodos.....	60
8.2.1. Desenvolvimento da emulsão base.....	60
8.2.2. Preparo do fitocosmético.....	61
8.2.3. Teste de centrifugação.....	62
8.2.4. Determinação do tipo da emulsão.....	62
8.2.5. Teste de estabilidade.....	62
8.2.5.1. Avaliação macroscópica.....	63
8.2.5.2. Determinação do valor do pH.....	63
8.2.5.3. Determinação da densidade.....	63
8.2.5.4. Determinação da viscosidade.....	64
8.2.6. Doseamento do licopeno incorporado na emulsão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	64
8.2.7. Determinação da espalhabilidade.....	64
8.2.8. Determinação do comportamento reológico completo.....	65
8.2.9. Análise térmica.....	66
8.2.10. Controle microbiológico.....	66
8.2.11. Análise estatística.....	67
9. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
9.1. Desenvolvimento do fitocosmético	67

9.1.1. Desenvolvimento da emulsão base.....	67
9.1.2 Teste de centrifugação.....	68
9.1.3. Determinação do tipo de emulsão.....	68
9.2. Teste de estabilidade.....	69
9.2.1. Teste de estabilidade preliminar da formulação F4.....	69
9.2.1.1. Avaliação macroscópica.....	69
9.2.1.2. Determinação do valor de pH.....	69
9.2.1.3. Determinação da densidade.....	71
9.2.1.4. Determinação da viscosidade.....	73
9.3. Preparo do fitocosmético.....	78
9.4. Teste de estabilidade.....	79
9.4.1. Teste de estabilidade preliminar do fitocosmético.....	79
9.4.1.1. Avaliação macroscópica.....	79
9.4.1.2. Determinação do valor de pH.....	79
9.4.1.3. Determinação da densidade.....	82
9.4.1.4. Determinação da viscosidade.....	83
9.4.2. Teste de estabilidade acelerada do fitocosmético.....	87
9.4.2.1. Avaliação macroscópica.....	88
9.4.2.2. Determinação do valor de pH.....	88
9.4.2.3. Determinação da densidade.....	89
9.4.2.4. Determinação da viscosidade.....	91
9.4.3. Doseamento do licopeno incorporado na emulsão por cromatografia de alta eficiência (CLAE).....	96
9.4.4. Determinação da espalhabilidade.....	98
9.4.5. Determinação do comportamento reológico completo.....	98
9.4.6. Análise térmica.....	103
9.4.7. Controle microbiológico.....	105
10. CONCLUSÃO PARCIAL.....	106

CAPÍTULO 3 - ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO.....	107
11. REVISÃO DA LITERATURA.....	107
11.1. Permeação cutânea.....	107
12. OBJETIVO.....	111
13. MATERIAL E MÉTODOS.....	111
13.1. Material, acessórios e equipamentos.....	111
13.2. Métodos.....	111
13.2.1. Permeação cutânea.....	111
13.2.1.1. Teste de liberação.....	112
13.2.1.2. Teste de permeação cutânea.....	112
13.2.1.3. Teste de retenção no estrato córneo.....	113
13.2.1.4. Teste de retenção na epiderme/derme.....	114
13.2.2. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do licopeno incorporado no fitocosmético.....	114
14. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
14.1. Teste de liberação.....	114
14.2. Teste de permeação cutânea, retenção no estrato córneo e retenção na epiderme/derme.....	115
14.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do licopeno incorporado no fitocosmético.....	117
15. CONCLUSÃO PARCIAL.....	119
16. CONCLUSÃO FINAL.....	119
17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

ABREVIATURAS

Abs: Absorvância

ABTS: Radical 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenziltiazolino-6-sulfônico)

A/O: Água em óleo

ATTC: *American Type Culture Collection*

BHT: Butilhidroxitolueno

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DSC: Calorimetria exploratória diferencial

EDTA: Ácido etilelodiamino tetra-acético

EROs: Espécies reativas de oxigênio

HPB: Hiperplasia prostática benigna

HPLC ou CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

IC: Índice de citotoxicidade

IC₅₀: Concentração inibitória 50%

INCI: *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*

L¹: Radical lipídeo

LD: Limite de detecção

LH: Lipídeo associado com hidrogênio

LOO¹: Radical peroxil

LQ: Limite de quantificação

O₂^{•-}: Ânion superóxido

¹O₂: Oxigênio singleto

O/A: Óleo em água

OH[•]: Radical hidroxila

PA: Para análise

p/p: Peso por peso

TG: Termogravimetria

UFC: Unidades formadoras de colônia

USP: *United States Pharmacopeia*

UV: Ultravioleta

UV/vis: Ultravioleta/visível

v/v: Volume por volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural do licopeno.....	26
Figura 2. Tipos de tomate utilizados: caqui, salada, rasteiro e cereja, respectivamente...	30
Figura 3. Esquema do método para avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> utilizando o corante resazurina.....	36
Figura 4. Extratos das polpas de tomate caqui, salada, rasteiro e cereja, respectivamente.....	39
Figura 5. Polpa de tomate descorada (direita) após os métodos de extração comparando com a polpa logo após o processo de obtenção (esquerda).....	39
Figura 6. Identificação do licopeno no extrato obtido do tomate por espectrofotometria na região do visível.....	40
Figura 7. Cromatograma representando o pico do padrão de licopeno (Sigma) obtido por CLAE.....	43
Figura 8. Cromatograma representando os picos dos extratos de tomates salada (verde), rasteiro (vermelho), caqui (azul) e cereja (preto) obtidos por CLAE.....	43
Figura 9. Curva analítica do padrão de licopeno (Sigma) nas concentrações de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 2, 4 e 6 µg/ml obtida por CLAE.....	44
Figura 10. Porcentagem de inibição do radical DPPH na presença dos extratos contendo licopeno obtidos dos quatro tipos de tomate analisados.....	48
Figura 11. Porcentagem de inibição do radical DPPH na presença de vitamina C padrão.....	49
Figura 12. Porcentagem de inibição do radical ABTS na presença dos extratos contendo licopeno obtidos dos quatro tipos de tomate analisados.....	51
Figura 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS na presença de vitamina C padrão.....	52
Figura 14. Sistema utilizado para a realização da determinação da espalhabilidade.....	65
Figura 15. Fotomicrografias da emulsão base em contato com o corante hidrofílico amarelo à esquerda (aumento 10x) e corante lipofílico marrom à direita (aumento 40x)..	69
Figura 16. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que a formulação F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	70

Figura 17. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que a formulação F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	72
Figura 18. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	73
Figura 19. Reograma das viscosidades da formulação F4 na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	74
Figura 20. Reograma das viscosidades da formulação F4 na condição de exposição à luz indireta nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	74
Figura 21. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	75
Figura 22. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	75
Figura 23. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	75
Figura 24. Reograma das viscosidades da formulação F4 submetida a ciclos de congelamento/descongelamento nos dias 1 (vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).....	75
Figura 25. Gráfico das médias dos valores dos índices de consistência nas condições em que a emulsão F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar.....	76
Figura 26. Fitocosmético contendo licopeno obtido do tomate salada.....	78
Figura 27. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade preliminar.....	80
Figura 28. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade preliminar.....	82
Figura 29. Gráfico das médias dos valores de viscosidade do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	84
Figura 30. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84
Figura 31. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição de exposição à luz indireta nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	84

Figura 32. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 33. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 34. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 35. Reograma das viscosidades do fitocosmético submetido a ciclos de congelamento/descongelamento nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).....	85
Figura 36. Gráfico dos valores dos índices de consistência do fitocosmético durante o estudo da estabilidade preliminar.....	86
Figura 37. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada.....	88
Figura 38. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada.....	90
Figura 39. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada.....	91
Figura 40. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza).....	93
Figura 41. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição de exposição à luz indireta nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza).....	93
Figura 42. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza).....	93
Figura 43. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza).....	93

Figura 44. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza).....	94
Figura 45. Gráfico das médias dos valores dos índices de consistência nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada.....	95
Figura 46. Gráfico do doseamento do fitocosmético realizado pelo período de 90 dias de análise.....	97
Figura 47. Gráfico da espalhabilidade do fitocosmético em função do peso adicionado.....	98
Figura 48. Reograma da curva de fluxo do fitocosmético.....	99
Figura 49. Reograma do limite de escoamento do fitocosmético.....	100
Figura 50. Reograma da varredura de tensão do fitocosmético (G' verde, G'' azul, η rosa).....	101
Figura 51. Reograma da varredura de frequência com os pontos de <i>crossover</i> para o fitocosmético.....	102
Figura 52. Reograma da curva de fluência e relaxação do fitocosmético.....	103
Figura 53. Termograma de DSC do fitocosmético obtido em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de 10°C/min	104
Figura 54. Termograma de TG do fitocosmético obtido em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de 10°C/min	104
Figura 55. Célula de difusão do tipo Franz empregada nos estudos de permeação cutânea <i>in vitro</i>	108
Figura 56. Fotografia do sistema de difusão composto de seis células do tipo Franz, conforme o equipamento utilizado.....	109
Figura 57. Pele de porco sendo dermatomizada para a utilização nos testes de permeação cutânea.....	113
Figura 58. Concentração de licopeno retido na epiderme/derme após a exposição do fitocosmético na pele de porco por 4 e 8 horas.....	117

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento da obtenção da polpa de diferentes tipos de tomate.....	38
Tabela 2. Valores de absorvância a 472 nm dos extratos de tomate.....	40
Tabela 3. Peso de extrato seco contendo licopeno obtido a partir dos quatro tipos de tomate.....	41
Tabela 4. Tempo de retenção e concentração de licopeno em 6 mg de cada extrato obtido dos quatro tipos de tomate e em 1000g de tomate.....	42
Tabela 5. Valores obtidos no ensaio de precisão intradia do padrão analítico de licopeno.....	42
Tabela 6. Valores obtidos no ensaio de precisão interdia do padrão analítico de licopeno.....	45
Tabela 7. Preparo das soluções para o teste de recuperação.....	46
Tabela 8. Valores obtidos no ensaio de recuperação do extrato de licopeno.....	46
Tabela 9. Valores do teste de robustez variando o analisador.....	47
Tabela 10. Valores das concentrações e absorvâncias dos extratos dos diferentes tipos de tomate na presença de DPPH.....	48
Tabela 11. Valores de IC ₅₀ frente ao radical DPPH obtidos dos quatro tipos de tomate estudados.....	49
Tabela 12. Valores das concentrações utilizadas dos quatro extratos analisados e das absorvâncias obtidas através do teste de avaliação antioxidante frente ao radical ABTS.	50
Tabela 13. Valores de IC ₅₀ frente ao radical ABTS obtidos dos quatro tipos de tomate estudados.....	51
Tabela 14. Valores dos preços dos quatro tipos de tomates adquirido no mês de março de 2008, no mercado Jaú Serve, na cidade de Araraquara, no estado de São Paulo.....	53
Tabela 15. Composição percentual das formulações base F1, F2, F3 e F4.....	61
Tabela 16. Valores de pH da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar.....	71
Tabela 17. Valores de densidade (g/cm ³) da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar.....	72
Tabela 18. Valores de viscosidade (Pa.s) da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar.....	74

Tabela 19. Valores do índice de consistência (Pa.s) da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar.....	76
Tabela 20. Valores do índice de comportamento de fluxo da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar.....	77
Tabela 21. Valores de pH do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	81
Tabela 22. Valores de densidade (g/cm ³) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	82
Tabela 23. Valores de viscosidade (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	83
Tabela 24. Valores do índice de consistência (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	86
Tabela 25. Valores do índice de comportamento de fluxo do fitocosmético durante a estabilidade preliminar.....	87
Tabela 26. Valores de pH do fitocosmético durante a estabilidade acelerada.....	89
Tabela 27. Valores de densidade (g/cm ³) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada.....	90
Tabela 28. Valores de viscosidade (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada.....	92
Tabela 29. Valores do índice de consistência (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada.....	95
Tabela 30. Valores do índice de comportamento de fluxo do fitocosmético durante a estabilidade acelerada.....	96
Tabela 31. Doseamento do licopeno no fitocosmético realizado pelo período de 90 dias de análise quando submetido às condições de estresse.....	97
Tabela 32. Valores dos dois pontos de <i>crossover</i> , juntamente com os valores das frequências e os tempos em que esses pontos ocorreram.....	102
Tabela 33. Contagem microbiológica do fitocosmético.....	105
Tabela 34. Valores das concentrações em µg/ml de licopeno permeado, retido na epiderme/derme e retido no estrato córneo.....	116

RESUMO

O licopeno é um carotenóide com poderosa ação antioxidante, encontrado em maior quantidade no tomate, utilizado no combate a inúmeras doenças como vários tipos de câncer, dentre eles o de próstata, e doenças cardiovasculares. Sua ação tópica é pouco explorada e, por isso, a proposta de ser utilizado no combate à aceleração do envelhecimento cutâneo, incorporado em uma emulsão. Um estudo preliminar foi realizado para a escolha do tipo de tomate que apresenta maior concentração de licopeno e/ou maior atividade antioxidante. O método de quantificação do fitoquímico foi validado e, em função dos testes de avaliação antioxidante *in vitro*, o tomate do tipo salada foi o escolhido para o desenvolvimento do fitocosmético. Além disso, o extrato foi submetido à avaliação da citotoxicidade *in vitro* que constatou a não ocorrência de toxicidade em fibroblastos e macrófagos. Assim, o cosmético foi desenvolvido contendo fase oleosa constituída de derivados de karité e submetido a testes para avaliar sua estabilidade, identificar as características da emulsão, avaliar seu comportamento reológico e sua atividade cosmética pelos testes de permeação cutânea e verificando a eficácia quanto à ação antioxidante do licopeno incorporado na emulsão. Foi possível observar que o fitocosmético é estável, de acordo com as condições experimentais realizadas neste estudo, permite a retenção do licopeno na epiderme e na derme e apresenta atividade antioxidante, sendo promissor para o combate à aceleração do envelhecimento cutâneo.

Palavras chave: licopeno, fitocosmético, antienvelhecimento, estabilidade, validação, permeação cutânea.

ABSTRACT

Lycopene, a carotenoid with high antioxidant activity, is found in greater quantities in tomatoes used to combat many diseases such as various types of cancers, including of the prostate, and cardiovascular diseases. Its topical action is not explored and therefore the proposal to be used to combat aging, incorporated into an emulsion. A preliminary study was conducted to evaluate which tomato had higher concentration of lycopene and/or higher antioxidant activity. The method of quantification of the phytochemical was validated and the lycopene extract was evaluated by testing *in vitro* antioxidant activity. Tomato salad was chosen for the development of the phytocosmetic. Furthermore, this extract was subjected to the evaluation of cytotoxicity *in vitro* activity and it was found that the non-occurrence of toxicity in fibroblasts and macrophages. Thus was developed a product containing oily phase consists only derived about shea which was submitted to tests to assess its stability, to identify the characteristics of the emulsion, to evaluate the rheological behavior and cosmetic activity carried out tests such as skin permeation and checking the effectiveness in the antioxidant action of lycopene incorporated into emulsion. Through the results it was possible to observe that the phytocosmetic is stable, allows the retention of lycopene in the epidermis and dermis, shows antioxidant activity and it's promising to combat the acceleration of skin aging.

Key words: lycopene, phytocosmetic, antiaging, stability, validation, skin permeation.

INTRODUÇÃO

Envelhecer é um processo natural do organismo, mas o envelhecimento da pele em especial é motivo de preocupação para muitas pessoas. Por este motivo, há uma procura incessante de produtos que possam reduzir os efeitos do tempo.

Muitos dos cosméticos comercializados apresentam em sua formulação substâncias de ação antioxidante que podem agir na pele diminuindo ou retardando o aparecimento de rugas.

O licopeno é um carotenóide encontrado principalmente no tomate e possui uma grande propriedade antioxidante, pois apresenta capacidade de reagir com radicais livres, principalmente o oxigênio singlete, formado a partir da irradiação do oxigênio pelos raios ultravioleta (UV) (SCOTTI e VELASCO, 2003; SIES e STAHL, 1996) responsáveis pela peroxidação lipídica nas membranas das células, danificando-as.

Os radicais livres podem ser responsáveis pelo envelhecimento cutâneo e o uso de substâncias capazes de inibir sua ação, como o licopeno, em cosméticos pode auxiliar, desta forma, na prevenção ou desaceleração dos danos causados na pele. Além da ação na pele, o licopeno é estudado e usado no tratamento de diversas doenças, principalmente do câncer de próstata, por via oral (GIACOMINI, 2007; RAO *et al.*, 2007; SHAO e HATHCOCK, 2006), sendo pouco explorada sua utilização através do uso tópico.

Devido à possível eficiência no combate às espécies reativas de oxigênio, surgiu o interesse de desenvolver um cosmético contendo licopeno, pois a aplicação externa de sequestradores de radicais livres pode ajudar na prevenção da formação ou redução de radicais livres na pele, antes que causem danos.

Fitocosmético é a preparação cosmética que contém substâncias de origem vegetal (GALHARDO *et al.*, 2007; ISAAC *et al.*, 2008a) que vem atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores, principalmente as formulações cosméticas antioxidantes, que são muito comuns no combate ao envelhecimento cutâneo.

Como qualquer produto a ser desenvolvido, o fitocosmético deve ser estável e apresentar segurança e eficácia. Para isso é importante a realização de testes que comprovem estes requisitos.

Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver e estudar a estabilidade e eficácia de um cosmético contendo extrato com licopeno obtido a partir do fruto tomate.

Para melhor entendimento deste estudo, o trabalho foi dividido em três capítulos, sendo que o primeiro descreve a obtenção do extrato contendo licopeno e a realização de testes *in vitro* para avaliar a eficácia da ação antioxidante e sua segurança, através de testes de citotoxicidade. Após a obtenção do extrato, foi realizado o segundo capítulo com o desenvolvimento do fitocosmético e estudo da sua estabilidade, espalhabilidade e comportamento reológico. Além de apresentar estabilidade, a formulação deve ser avaliada quanto à sua eficácia e por isso foi elaborado o terceiro capítulo, submetendo o fitocosmético a ensaios de permeação cutânea e atividade antioxidante *in vitro*.

CAPÍTULO 1 – OBTENÇÃO DE EXTRATO DE TOMATE CONTENDO LICOPENO PARA USO COSMÉTICO NO COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento da pele é provocado por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores extrínsecos, o envelhecimento pode ocorrer pela ação de radicais livres na pele. Cerca de 80% dos sinais visíveis causados no envelhecimento são provocados pelos raios UV e os principais causadores são os radicais livres, proporcionando a aceleração do envelhecimento cutâneo, aumento de rugas, espessamento da epiderme, perda da firmeza e diminuição da elasticidade da pele, modificando sua permeabilidade e funcionamento normal. A destruição de lipídeos da pele por peroxidação contribui para uma pele seca e áspera (MAGALHÃES, 2000; SCOTTI e VELASCO, 2003).

Mudanças celulares como alterações quantitativas das proteínas da matriz extracelular estão envolvidas no envelhecimento da pele, resultando na perda da capacidade de retração e do poder tensor, com a formação de rugas, aumento da fragilidade e diminuição da cicatrização de feridas (JENKINS, 2002; MA *et al.*, 2001).

Além das reações provocadas pelos radicais livres, o envelhecimento também é causado pela ineficiência crescente de nossas defesas naturais antioxidantes. Com o passar da idade, aumenta também a concentração de radicais livres que deveriam ser neutralizados por substâncias antioxidantes (GIACOMINI, 2007).

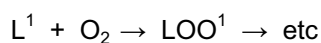
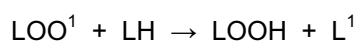
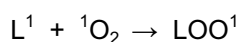
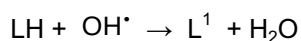
Os radicais livres são espécies bastante reativas de oxigênio (EROs), que contêm um ou mais elétrons não pareados, altamente instáveis, com existência independente e meia-vida curtíssima, que se formam naturalmente dentro do próprio organismo através de vários mecanismos, entre eles a própria respiração. Podem ser formados pela ação de raios UV vindos do sol, poluição, cigarro, alimentação, entre outros (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SCOTTI e VELASCO, 2003; GIACOMINI, 2007).

Dentre as espécies reativas de oxigênio, podem ser encontrados o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e o oxigênio singlete ($^1O_2$) (GIACOMONI, 2007).

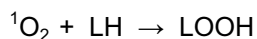
O oxigênio singlete é formado a partir da irradiação do oxigênio pelos raios UV que absorve a energia dos raios, alterando o sentido do *spin* da molécula, transformando-se em uma espécie muito reativa (SCOTTI e VELASCO, 2003).

Um dos efeitos dos radicais livres é o aumento das taxas de peroxidação lipídica, danificando enzimas mitocondriais e a membrana plasmática (FARINATTI, 2002). Eles reagem sobre os componentes das membranas, principalmente os lipídeos. Reage sobre os ácidos graxos membranares que são, em grande parte, do tipo insaturado (C=C), o que os torna muito sensíveis à oxidação. Provocam desorganização da estrutura da membrana por acúmulo de moléculas “deformadas”, podendo provocar disfunção irreversível, chegando até a destruição da célula, ou então, a transmissão de mensagens errôneas do ambiente para o interior da célula (PEYREFITTE, MARTINI e CHIVOT, 1998).

De acordo com GIACOMINI (2007), os lipídeos sofrem com a cascata de peroxidação lipídica, que resulta na multiplicação de danos oxidativos, porque os tipos de espécies reativas de oxigênio (ERO), como o $\text{OH}^\bullet$, podem sequestrar um H do lipídeo (LH) resultando em um radical lipídeo (L^1), formando um radical livre mediando a peroxidação lipídica. O $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) reage rapidamente com L^1 formando radical peroxil (LOO^1), sequestrando o H de outro lipídeo para formar o hidroxiperoxido lipídeo e assim sucessivamente, como mostram as reações:



O oxigênio singlete também pode ser adicionado diretamente na insaturação de lipídeos (C=C) para formar um conjugado com LH gerando LOOH, sem radicais livres intermediários:



O corpo humano possui mecanismos de defesa antioxidante como as enzimas superóxido dismutase, a glutathione peroxidase e a catalase, para destruir esses potentes radicais danosos, mas não há enzimas para destruir o oxigênio singlete que pode ser, potencialmente, a mais perigosa espécie reativa gerada na pele durante a exposição solar. Há,

então, a necessidade da utilização de outros mecanismos antioxidantes como os não enzimáticos e, entre eles estão as vitaminas E e C, flavonóides, taninos e os carotenóides (GIACOMINI, 2007; PINTO, 2006).

1.2. Uso de substâncias antioxidantes no combate ao envelhecimento cutâneo

Os antioxidantes referem-se a substâncias que podem diminuir ou bloquear as reações de oxidação induzidas pelos radicais livres, podendo agir no bloqueio da propagação dos radicais na cadeia, desfazendo a peroxidação lipídica de ácidos graxos, captura de íons metálicos de transição ou ainda através da catálise enzimática na redução do peróxido. Eles melhoram o balanço redução e oxidação (Redox) do estrato córneo da epiderme, evitando ou minimizando, em particular, a peroxidação lipídica dos lipídeos intercelulares da pele (PRIMAVERA e BERARDESCA, 2005; SCOTTI e VELASCO, 2003).

Para determinar sua eficácia, as substâncias antioxidantes podem ser avaliadas através de métodos *in vitro* como o método DPPH, que utiliza o radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), disponível comercialmente e solúvel em metanol. O DPPH é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes, que apresenta máximo de absorção em 531 nm, sendo este o comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras. Na presença de *scavengers* deste radical, a intensidade da absorvância em 531 nm diminuirá e a porcentagem de inibição (%INIBIÇÃO) é calculada de acordo com CUENDET *et al.* (1997).

Outro método para avaliar a atividade antioxidante é a determinação da cinética de redução do radical catiônico de ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenziltiazolino-6-sulfônico (ABTS), que é a base para um dos métodos mais sensíveis que têm sido aplicados para a determinação da capacidade antioxidante em diversos sistemas. Diferentes concentrações dos extratos que serão submetidos à avaliação da atividade antioxidante, devem ser adicionadas à solução de ABTS e a cinética de desaparecimento da absorvância do radical é determinada em 734 nm. Depois da absorvância lida, a porcentagem de inibição de oxidação das amostras é calculada (EREL, 2004; KARAKAYA e YILMAZ, 2007).

Devido ao fato dos efeitos dos radicais livres causarem a diminuição de substâncias antioxidantes contidas na epiderme, o uso de antioxidantes tópicos, como os carotenóides e,

em especial, o licopeno pode ser utilizado com sucesso, diminuindo ou evitando o envelhecimento da pele, de acordo com ANDREASSI *et al.*, 2004.

Os carotenóides são pigmentos naturais lipofílicos, amplamente distribuídos na natureza, que apresentam diversas funções biológicas e benefícios à saúde, funcionando como antioxidantes, precursores hormonais e corantes e, é um componente essencial para a fotossíntese. São tetraterpenos, responsáveis pela coloração vermelha, amarela e laranja de frutas, vegetais, raízes, flores, peixes, invertebrados e pássaros (HOWITT e POGSON, 2006; PINTO, 2006; SIES e STAHL, 1996).

Já foram identificados mais de 600 carotenóides e isso se deve às modificações da sua estrutura básica através da hidrogenação, desidrogenação, ciclização, migração de ligação dupla, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de substituintes ou combinação desses processos (PINTO, 2006; SIES e STAHL, 1996).

Os carotenóides agem na inibição da formação de radicais livres sequestrando o oxigênio livre, inibindo assim a cronicidade do estresse oxidativo, que pode causar severos problemas metabólicos e estar envolvido na origem e no desenvolvimento de numerosas doenças (SHAMI e MOREIRA, 2004).

Outros antioxidantes possuem a capacidade de reagir com radicais livres, impedindo que ataquem inúmeras moléculas, dentre elas as do tecido cutâneo, porém o licopeno consegue reagir com mais eficiência contra o oxigênio singlete, que pode ser predominantemente formado a partir da exposição solar, sendo potencialmente a mais perigosa espécie reativa de oxigênio gerada na pele durante essa exposição, segundo GIACOMONI (2007).

1.3. Licopeno

O licopeno (*Solanum lycopersicon*) é um carotenóide natural, sem atividade pró-vitamina A, e um potente antioxidante. Não é sintetizado pelo organismo, mas pode ser obtido através da dieta alimentar. Encontra-se principalmente no tomate (*Lycopersicon* sp.) na forma *in natura*, em suco, purê, pasta, extrato, *catchup*, mas também pode ser encontrado no mamão, na goiaba vermelha, na pitanga e na melancia (BRAMLEY, 2000; SHAMI e MOREIRA, 2004; SENTANIN e AMAYA, 2007).

O tomate, dicotiledônea pertencente à família *Solanaceae* e gênero *Lycopersicon*, é fonte de carotenóides e é um importante fruto consumido no mundo todo. Estudos epidemiológicos têm mostrado que o aumento do consumo de tomate e derivados pode reduzir o risco de certos tipos de câncer, como o de próstata, pulmão e estômago (LIN e CHEN, 2003; RAFFO *et al.*, 2006; TAVAREZ e RODRIGUEZ-AMAYA, 1994; KIMURA e RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

Os frutos de tomate podem ser classificados de acordo com o formato, a coloração, a durabilidade e sua apresentação. Nos últimos anos tem aumentado em muito a diversidade dos produtos oferecidos, sendo ainda mais comuns os tomates de formatos oblongo (salada e rasteiro) e redondo (cereja e caqui). Em relação à coloração, os tomates podem ser classificados como vermelho (salada, rasteiro e cereja), rosado (caqui), amarelo e laranja. Os tomates de coloração laranja e amarelo não são comuns no Brasil, mas quando os tomates vermelhos são submetidos a altas temperaturas podem demonstrar coloração amarelada, característica encontrada facilmente nos meses mais quentes do ano, principalmente no Norte e Nordeste do nosso país (FEAGRI, 2008; EMBRAPA, 2008).

Os tomates também podem ser divididos em relação à sua durabilidade e, desta forma, podem ser denominados como os de longa vida (salada), ou seja, possuem uma vida pós-colheita mais prolongada, permanecendo firmes por um período maior de tempo, e os normais (rasteiro, cereja e caqui), que apresentam menor durabilidade após a colheita. Em relação à apresentação, o tomate pode ser oferecido ao consumidor na forma normal (salada, rasteiro, cereja e caqui) ou em penca (rácimo), ou seja, na forma em que é colhido (FEAGRI, 2008; EMBRAPA, 2008).

De acordo com RAFFO *et al.* (2006), o tomate possui em sua composição, vitaminas como as do tipo C e E, e carotenóides como o betacaroteno e o licopeno, sendo o mais abundante, o licopeno.

O licopeno (Figura 1) possui estrutura simétrica e acíclica, formada por carbonos e hidrogênios, e fórmula molecular $C_{40}H_{56}$. É lipossolúvel e apresenta onze duplas ligações conjugadas e duas não conjugadas (SIES e STAHL, 1996).

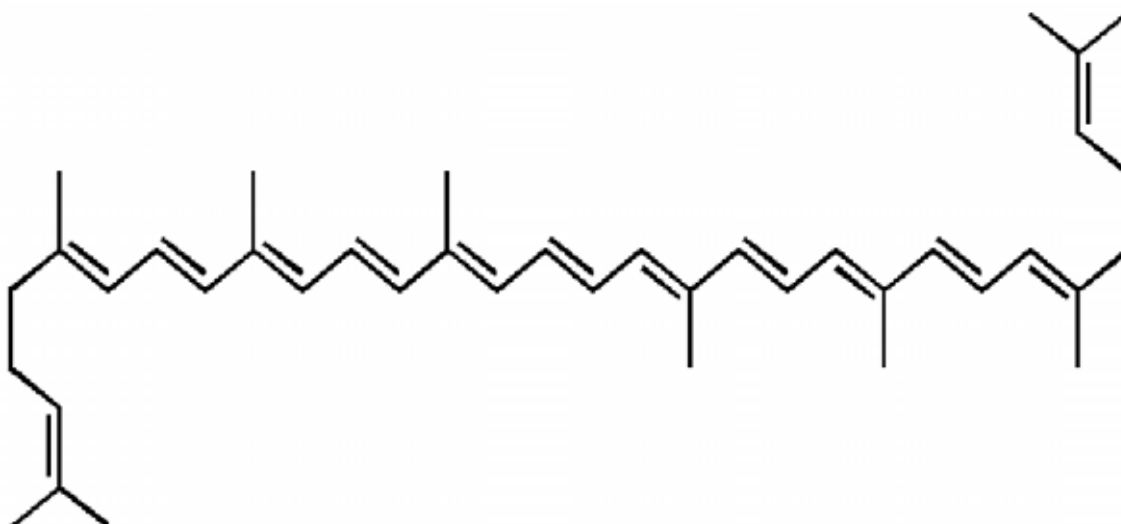


Figura 1. Fórmula estrutural do licopeno (SIES e STAHL, 1996)

Devido à sua longa cadeia carbônica com duplas ligações conjugadas, o licopeno tem sido considerado um poderoso antioxidante, com atividade superior à da luteína e betacaroteno (LIN e CHEN, 2003).

O licopeno exerce função antioxidante em fases lipídicas, bloqueando radicais livres que danificam as membranas protéicas (SHAMI e MOREIRA, 2004). Diminui o estresse oxidativo prevenindo o aparecimento de vários tipos de cânceres, principalmente o de próstata, a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), assim como previne problemas no sistema cardiovascular, olhos e pele. É benéfico no combate à incidência de doenças como a osteoporose em mulheres na pós-menopausa e diabetes, e atua também na prevenção ao envelhecimento celular, além de acelerar a regeneração epitelial (RAO e RAO, 2007; SHAO e HATHCOCK, 2006). Um estudo realizado por JEONG *et al.* (2009a) avaliou a relação entre a concentração de micronutrientes com ação antioxidante como beta-caroteno, licopeno, luteína, retinol, alfa-tocoferol e gama-tocoferol, em plasma de mulheres coreanas e o risco de câncer endometrial. Foi observado que os níveis de beta-caroteno e licopeno no plasma foram inversamente proporcionais ao risco do câncer. O licopeno também pode estar relacionado com a redução de risco de câncer ovariano, de acordo com outro estudo realizado por JEONG *et al.* (2009b).

Este carotenóide pode ser usado no combate ao envelhecimento cutâneo na forma de fitocosmético, devido sua capacidade de neutralizar espécies de oxigênio reativos, principalmente o $^1\text{O}_2$, inibindo ou diminuindo os efeitos do estresse oxidativo, provocados pelos raios UV, especialmente na epiderme. Um estudo realizado por ANDREASSI *et al.*, 2004, determinou que a aplicação tópica prévia de 6% de extrato seco contendo licopeno incorporado em uma emulsão constituída de sweet almond oil (óleo de amêndoas doces), polyacrylamide/C13-14-isoparaffin/Laureth-7 (Sepigel 305) e aqua (água), apresentando concentração final de licopeno na formulação de 0,03%, foi capaz de diminuir o edema apresentado na pele de voluntários submetidos à radiação UV, evidenciando sua provável atividade antioxidante em relação aos radicais livres provenientes da luz solar. Apesar dos resultados apresentados, o licopeno não apresenta fator de proteção solar, pois é absorvido em um comprimento de onda na região do visível e não do ultravioleta.

Para a obtenção dos extratos de carotenóides podem ser utilizados solventes apolares, devido à baixa polaridade destes compostos. O licopeno pode ser identificado e quantificado através da cromatografia líquida de alta eficiência a 472 nm, que é uma das técnicas mais utilizadas na análise de substâncias devido à eficiência, rapidez e por permitir boa separação em menor tempo (MERCADANTE e RODRIGUEZ-AWAYA, 2001; MERCK INDEX, 2006; OLIVER e PALOU, 2000).

1.4. Validação do método de quantificação de substâncias

A validação de método analítico é necessária para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método de análise atenda às exigências necessárias das aplicações analíticas, e assegurar a confiabilidade dos resultados. Para isso, é necessário que alguns parâmetros sejam avaliados como especificidade e seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade ou limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (BRASIL, 2003).

O teste de especificidade e seletividade determina a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

A linearidade demonstra que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado, realizando para isso uma curva analítica (BRASIL, 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra (BRASIL, 2003). As duas formas mais comuns de expressar a precisão de um método analítico são por meio da reprodutibilidade e a repetitividade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão (INMETRO, 2007).

A determinação do limite de detecção é necessária para descobrir a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas. O limite de quantificação, por sua vez, é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

A exatidão de um método analítico é determinada através da proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência, aceito como verdadeiro (BRASIL, 2003). O processo normalmente utilizado para avaliar a exatidão de um método é a realização de ensaios de recuperação (INMETRO, 2007). E, finalmente, a robustez de um método tem por finalidade avaliar a sensibilidade que o método apresenta diante de pequenas variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003; INMETRO, 2007).

1.5. Atividade citotóxica *in vitro*

Os ensaios de citotoxicidade, de acordo com BRASIL (2008), objetivam determinar a resposta biológica de células *in vitro* com o uso de parâmetros biológicos adequados, através da avaliação de dano celular por meios morfológicos e medições desses danos, do crescimento celular e de aspectos específicos do metabolismo celular.

Desta maneira, a avaliação citotóxica *in vitro* permite determinar a segurança de substâncias a serem utilizadas na terapêutica como, por exemplo, as de origem vegetal, tendo como objetivo, garantir que o produto esteja livre de efeitos tóxicos indesejáveis.

A técnica consiste em testar as amostras frente a células como macrófagos e fibroblastos e determinar o Índice de Citotoxicidade (IC) ou Viabilidade. A citotoxicidade das amostras pode ser determinada pela adição do revelador resazurina que age como indicador de crescimento celular e/ou viabilidade que, para a resazurina, a cor azul que representa a ausência de crescimento/inviabilidade celular e a cor rosa crescimento ou ausência de viabilidade (O'BRIEN *et al.*, 2000).

2. OBJETIVO

Obter extrato contendo licopeno a partir do tomate, para o desenvolvimento de um fitocosmético. Para isso foram realizadas as etapas:

1. Identificação do tipo de tomate que possui maior quantidade de licopeno e maior atividade antioxidante perante as reações com os reagentes DPPH e ABTS; e obtenção do extrato contendo licopeno a partir de extrações com acetato de etila;
2. Validação do método analítico de identificação e quantificação do licopeno no extrato obtido;
3. Realização do ensaio de citotoxicidade *in vitro* no extrato contendo licopeno escolhido para comprovar a segurança do mesmo com o objetivo posterior de incorporá-lo em uma emulsão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material, acessórios e equipamentos

Material: Tomates salada, rasteiro, cereja e caqui *in natura* adquiridos no mercado Jaú Serve, na cidade de Araraquara, no estado de São Paulo, acetato de etila PA, etanol PA, acetato de etila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), acetonitrila (grau HPLC), padrão de licopeno (Sigma), clorofórmio PA, butilhidroxitolueno (BHT), 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenziltiazolino-6-sulfônico (ABTS), vitamina C padrão analítico, macrófagos da linhagem J774, fibroblastos CCL-60, meio de cultura RPMI 1640, meio de cultura Eagle (pH 7), soro fetal bovino, bicarbonato de sódio, solução de estreptomicina/penicilina, anfotericina B, meio Leibovitz L-15, dimetilsulfóxido (DMSO), solução tripsina 0,25% – EDTA 0,53 mM, corante Turk, resazurina.

Acessórios: espátulas, termômetro, fonte de aquecimento, erlenmeyers, peneira comum, funil de vidro, papel de filtro qualitativo e quantitativo, balão de fundo redondo, béckeres, tubos de ensaio, balões de diluição, micropipetas, membrana FH (Millipore, 0,45 μm), vials.

Equipamentos: balança analítica (GEHAKA, BG 2000), agitador magnético (MARCONI, MA 085), rotaevaporador (MARCONI, MA 120), espectrofotômetro de UV/VIS (HITACHI, mod U 2001), cromatógrafo de alta eficiência (WATERS 1525 - BINARY HPLC PUMP), acoplado ao detector de absorvância (WATERS 2487), coluna de fase reversa (C18) (NOVA PAK 250 x 4,60 mm 5 μm), balança analítica (BEL, MARK), estufa de incubação de CO_2 (Thermo Electron Corporation – Forma Series II Hepa Class 100), câmara de Neubauer, microplaca de 96 poços, leitor de fluorescência (SpectraFluor Plus – Tecan).

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das amostras de tomate

Foram utilizados 4 tipos de tomate *in natura*: caqui, salada, rasteiro e cereja (Figura 2). Todos foram adquiridos no mercado Jaú Serve da cidade de Araraquara, estado de São Paulo, no mês de março de 2008.



Figura 2. Tipos de tomate utilizados: caqui, salada, rasteiro e cereja, respectivamente

3.2.2. Obtenção da polpa de tomate

Foram utilizados cerca de 1000 g de cada um dos quatro tipos de tomate, inteiros e na forma *in natura*, pesados em balança analítica. Os tomates, lavados com água e detergente neutro foram cortados em cubos e levados ao aquecimento a 90°C , dando origem a polpa (BORGUINI, 2006).

3.2.3. Obtenção do extrato contendo licopeno

Para a obtenção do extrato contendo licopeno, foi realizada, primeiramente, a retirada de água presente na polpa do tomate. Este processo foi executado quatro vezes utilizando, em cada etapa, 30 ml de álcool etílico. O frasco erlenmeyer contendo polpa de tomate e álcool etílico ficou sob agitação em agitador magnético, por 30 minutos em cada etapa. O sobrenadante foi descartado e sobre a polpa desidratada, foram realizadas quatro extrações com acetato de etila (1:0,7 massa/volume) durante 120 minutos para cada extração, sob agitação em agitador magnético (NUNES e MERCADANTE, 2004). O extrato com acetato de etila foi recolhido e analisado para verificar a presença de licopeno.

3.2.4. Identificação do licopeno por espectrofotometria no UV/VIS

O conteúdo de licopeno obtido no extrato foi analisado pela leitura de absorvância a 472 nm utilizando acetato de etila como branco. Depois de analisado, o acetato de etila foi evaporado utilizando para isso o rotaevaporador até a obtenção do extrato seco contendo licopeno (adaptação BORGUINI, 2006; NUNES e MERCADANTE, 2004; MERCK INDEX, 2006).

3.2.5. Identificação e quantificação do licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi utilizado cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters 1525- Binary HPLC Pump), acoplado ao detector de absorvância (Waters 2487). O software utilizado foi o EMPOWER.

A amostra foi diluída em acetato de etila e, posteriormente, filtrada em membrana de 0,45 µm antes da injeção no cromatógrafo.

A identificação do licopeno foi realizada em uma coluna de fase reversa (C₁₈) utilizando a fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila na proporção de 48:26:26 (v/v/v) durante 5 minutos e com vazão de 1,0 ml/min. O processamento dos dados foi realizado em 472 nm, adaptando a metodologia descrita por NUNES e MERCADANTE, 2004.

3.2.5.1. Doseamento do licopeno nos diferentes tipos de tomate por CLAE

Para o doseamento, foram pesados 6 mg de cada extrato obtido dos quatro tipos de tomate, os quais foram dissolvidos em acetato de etila e transferidos para balão volumétrico de 10 ml. Os extratos diluídos foram filtrados em membrana de 0,45 μ m e injetados no cromatógrafo líquido a 472 nm, utilizando o padrão analítico para comparação e quantificação do licopeno. Através dos resultados foram obtidas as concentrações do fitoquímico nas amostras e foi escolhido o tomate com maior concentração de licopeno para a realização da validação do método analítico.

3.2.5.2. Validação do método analítico por CLAE

O método foi validado com a realização das análises para a obtenção dos parâmetros exigidos de acordo a Resolução nº 899 (BRASIL, 2003), porém, para fitoterápicos, os resultados podem seguir os níveis de aceitação estipulados para métodos bioanalíticos, considerando-se a complexidade da matéria-prima vegetal. Para métodos bioanalíticos, o valor do coeficiente de correlação linear (R), para aceitação da curva analítica deve ser igual ou superior a 0,98 e pode-se aceitar uma dispersão de 15% em todos os pontos médios e 20% próximo ao limite inferior de quantificação, de acordo com a referida legislação (BRASIL, 2009a).

3.2.5.2.1. Obtenção da curva analítica do padrão de licopeno

A curva analítica foi obtida utilizando as concentrações de 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 2, 4 e 6 μ g/ml do padrão analítico de licopeno e as áreas representativas das concentrações foram determinadas por CLAE a 472 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.5.2.2. Precisão

O teste de precisão foi realizado pelo ensaio de repetibilidade intradia e interdia, ou seja, repetições ao longo do mesmo dia e em dias consecutivos, respectivamente. Para isso foram analisadas seis amostras de concentração de 5 μ g/ml do padrão analítico no mesmo dia e durante dois dias consecutivos (BRASIL, 2003).

3.2.5.2.3. Exatidão

O teste de exatidão é realizado através do ensaio de recuperação, que consiste em adicionar uma concentração conhecida do padrão de licopeno ao extrato de tomate salada. Foram transferidos para quatro balões volumétricos de 10 ml denominados de A, R₁, R₂ e R₃, 1,25 ml de extrato de licopeno. Em seguida, foram adicionados 1,5, 2,5 e 3,5 ml da solução padrão de licopeno (100 µg/ml) nos balões R₁, R₂ e R₃ respectivamente. Estas soluções foram analisadas e as concentrações determinadas, para avaliar a recuperação do licopeno adicionado. A média das porcentagens de recuperação foi determinada e comparada com a legislação (BRASIL, 2003). A porcentagem de licopeno recuperado (R%) foi calculada utilizando a Equação I.

$$\text{Equação I: } \%R = [(C_f - C_a) / C_r] \times 100$$

Em que: C_f = Concentração da solução contendo extrato de licopeno adicionada de padrão (µg/ml)

C_a = Concentração da solução do extrato de licopeno (µg/ml)

C_r = Concentração ou volume teórico da solução do padrão adicionada (ml)

3.2.5.2.4. Robustez

Para determinar a robustez do método, foram variados alguns parâmetros como o analisador e comparados os resultados (BRASIL, 2003; CASEDEY, 2009).

3.2.5.2.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, e o limite de quantificação é a menor quantidade do analito que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Foram preparadas soluções com baixas concentrações do padrão de licopeno e analisadas por CLAE para determinar os valores das áreas e obtenção das curvas analíticas. Para determinar os valores de LD e LQ, foram realizados os cálculos conforme as Equações II e III (BRASIL, 2003).

$$\text{Equação II: LD} = \text{DP} \times 3 / \text{IC}$$

$$\text{Equação III: LQ} = \text{DP} \times 10 / \text{IC}$$

Em que: DP = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. IC = inclinação da curva analítica.

3.2.5.2.6. Seletividade

Para determinar a seletividade, foram comparados os cromatogramas dos extratos analisados com o do padrão analítico, para evidenciar a existência de impurezas presentes no extrato utilizado (BRASIL, 2003; CASEDEY, 2009).

3.2.6. Estudo da atividade antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante do extrato etanólico foi determinado baseado na avaliação da atividade sequestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). Em tubos de ensaio, foram adicionadas diferentes concentrações do extrato de licopeno (200, 250, 300, 350 e 400 µg/ml) seguida de 2,5 ml da solução de DPPH (concentração 0,004%). O ensaio também foi realizado para a vitamina C como padrão antioxidante nas diferentes concentrações de 5, 10, 15, 25, 50 e 100 µg/ml. As absorvâncias foram medidas utilizando etanol (P.A.) e extrato como branco a 531 nm (BRACA *et al.*, 2003). Na presença de sequestradores (*scavengers*) deste radical, como o licopeno, a intensidade da absorvância em 531 nm diminuiu e a porcentagem de inibição (%INIBIÇÃO) foi calculada como a Equação IV:

$$\text{Equação IV: \% inibição} = \frac{A_{\text{Max}} - A_{\text{Teste}}}{A_{\text{Max}}} \cdot 100, \text{ sendo que:}$$

Em que: A_{Max} é a absorvância do radical na ausência de amostra.

A_{Teste} é a absorvância do radical na presença de amostra.

A determinação da cinética de redução do radical catiônico de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenziltiazolino-6-sulfônico) (ABTS) é a base para um dos métodos mais sensíveis, que tem

sido aplicado para a determinação da capacidade antioxidante em diferentes sistemas. As concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 µg/ml dos extratos que foram submetidos à avaliação da atividade antioxidante, foram adicionadas à solução de ABTS, e a cinética de desaparecimento da absorvância do radical foi determinada em 734 nm. Depois da absorvância lida, foi calculada a porcentagem de inibição de oxidação das amostras através da Equação IV, da mesma maneira que no método utilizado para o radical DPPH (KARAKAYA e YILMAZ, 2007).

3.2.7. Determinação do tomate de escolha para a realização do estudo de desenvolvimento do fitocosmético contendo licopeno

O tomate escolhido para o desenvolvimento do fitocosmético foi o que obteve maior concentração de licopeno e principalmente maior atividade antioxidante, perante os radicais DPPH e ABTS.

3.2.8. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

O teste de atividade citotóxica *in vitro* foi analisado coletando alíquotas do extrato contendo licopeno obtido do tomate salada e foram adicionadas a macrófagos da linhagem J774 e de fibroblastos CCL-60, para determinação de Índice de Citotoxicidade (IC) ou Viabilidade. As concentrações do extrato utilizadas foram de 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 µg/ml.

As células foram mantidas em garrafas de cultura celular, em estufa a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ sob atmosfera de 5% de CO_2 em estufa de incubação de CO_2 . O meio de cultura utilizado para cultivo dos macrófagos foi RPMI-1640 (pH 7) suplementado com 2 g de bicarbonato de sódio e 10% de soro bovino fetal. Foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina/penicilina e 0,1% de solução de anfotericina B, ambas na concentração de 10 µg/ml, com o objetivo de evitar contaminação microbiana nas células. Para a cultura de fibroblastos, foi utilizado o meio Eagle (pH 7) suplementado com 50% de meio Leibovitz L-15, 15% de soro bovino fetal, sem bicarbonato de sódio.

O método consistiu em coletar os macrófagos por raspagem e fibroblastos por tripsinização (solução tripsina 0,25% e EDTA 0,53 mM), centrifugar a 1500 rpm por 10 minutos

e contar as células com auxílio do corante Turk, ajustando para a concentração de 1×10^5 células/ml em meio de cultura. As células de cada uma destas suspensões foram incubadas em diferentes microplacas de 96 poços, a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e 5% de CO_2 por 72 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e foi retirado o meio existente. Em outra microplaca foram colocados 100 μl de meio em todos os poços. Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v) nos demais poços da respectiva microplaca. A amostra diluída foi transferida para a microplaca contendo o tapete celular e incubada por 24 h a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e 5% de CO_2 (OHNO *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 2008). Posteriormente, foram adicionados 15 μl de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/ml, incubando a microplaca por 3 h em estufa a $37 \pm 2^\circ \text{C}$ e 5% de CO_2 . Foi utilizado como controle negativo, 20 μl de solução DMSO:meio (1:5; v/v) e ausência de células em uma sequência dos poços da microplaca, e como controle positivo, apenas a solução contendo células vivas sem a adição do extrato. A leitura dos resultados foi feita visualmente pela diferenciação entre a cor azul (ausência de células vivas) e cor-de-rosa, presença de células vivas (O'BRIEN, 2000), e por meio do leitor de fluorescência Spectra Fluor Plus – Tecan, com filtros de luz de 530 e 590 nm e programa de análise Magellin.

O método está descrito na Figura 3.

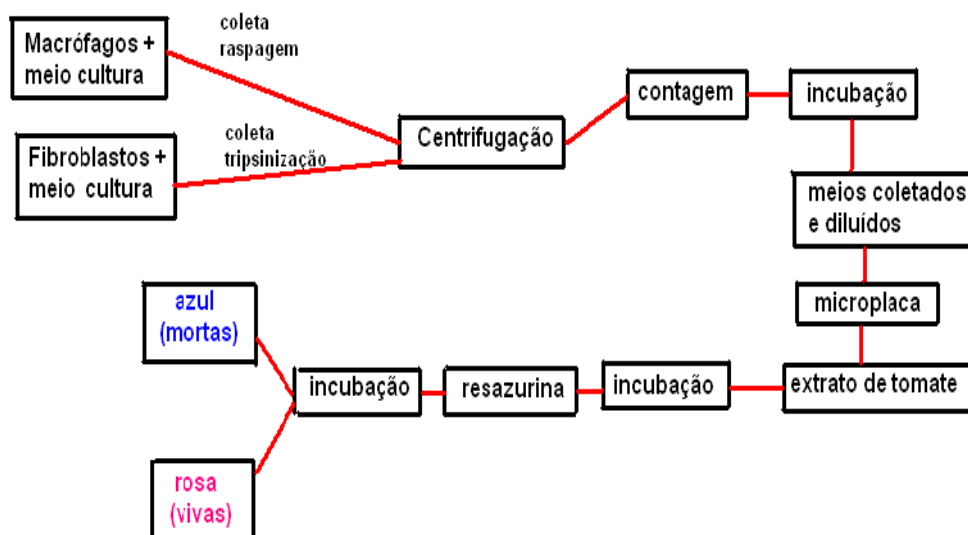


Figura 3. Método para avaliação da citotoxicidade *in vitro* utilizando o corante resazurina

3.2.9. Análise estatística

A análise estatística realizada foi a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa Microsoft Excel, versão 2000 e regressão linear utilizando o programa ORIGIN 7.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a obtenção das polpas de tomates, foram adquiridos frutos maduros que apresentam maior concentração de licopeno, pois de acordo com MOURA *et al.* (2002) e FACHIN (2003), no processo de amadurecimento do tomate, ocorre alterações fisiológicas e bioquímicas, aumentando desta maneira, a concentração de licopeno no fruto.

O tomate é um fruto muito conhecido pela alta contaminação de pesticidas, tais como benzimidazóis, carbendazim e ditiocarbamato. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2009b) divulgou em 2004, dados de um estudo realizado no ano de 2002, em que 186 amostras de tomate foram analisadas e foi determinado que o índice de contaminação do fruto foi de 26,1%. Porém, no estudo realizado por FERREIRA (2004), a análise toxicológica de três amostras de tomate de mesa cultivados no sistema convencional e três do sistema orgânico, não detectou valores superiores aos limites de 0,1 mg/kg de benzimidazóis. Nos resíduos de pesticidas do grupo químico ditiocarbamatos foram identificados 0,01 mg/kg nas amostras do tomate de mesa, cultivado no sistema convencional e abaixo de 2,0 mg/kg de mancozebe, indicado pela ANVISA (BRASIL, 2009c), como ingrediente ativo de ditiocarbamatos.

A ANVISA divulgou uma nota, neste ano de 2009 (BRASIL, 2009d), de que a cultura de tomate apresentou maiores avanços quanto à diminuição dos índices de irregularidades em relação à presença de resíduos de agrotóxicos, em comparação com o ano de 2007, quando 44,72% das amostras de tomate analisadas apresentaram resíduos acima do permitido. Em 2009, esse número caiu para 18,27%.

Por este motivo, os quatro tipos de tomate utilizados neste trabalho não foram submetidos a outro processo de limpeza a não ser água corrente e detergente neutro, método também realizado por BORGUINI, 2006.

4.1. Obtenção da polpa de tomate

As polpas dos tomates foram obtidas com o auxílio do aquecimento porque o processamento térmico rompe a parede celular dos cromoplastos, que são as células responsáveis pela produção e armazenagem do licopeno, permitindo, portanto, sua extração (WILLCOX, 2003). Um estudo realizado por BORGUINI (2006), detectou a presença de licopeno em tomate cru e em polpa de tomate, mas as maiores concentrações do fitoquímico foram encontradas nas amostras em que o tomate foi submetido ao aquecimento.

O rendimento da obtenção da polpa de diferentes tipos de tomate a partir de 1000 g de cada amostra está expresso na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento da obtenção da polpa de diferentes tipos de tomate

Tipos de tomate	Peso de polpa de tomate a partir de 1000 g de amostra	Rendimento de polpa de tomate
Salada	210 g	21,0%
Rasteiro	166 g	16,6%
Caqui	136 g	13,6%
Cereja	267 g	26,7%

O tomate que apresentou o maior rendimento foi o do tipo cereja, provavelmente por ter uma quantidade maior de parte sólida, já que foi preciso uma quantidade grande do fruto para obter 1000 g. O caqui, por sua vez, por ser de maior tamanho, foi necessário apenas 4 tomates para obter 1000 g, possuindo grande quantidade de parte líquida, que foi evaporada durante o processo de aquecimento.

4.2. Obtenção do extrato contendo licopeno

Após o método extrativo a partir das polpas obtidas e relativas aos quatro tipos de tomate, foram obtidos extratos contendo carotenóides que apresentaram uma coloração vermelha intensa (Figura 4), característica desses compostos, já que são os responsáveis pela cor avermelhada de frutos e de outros vegetais. Após as extrações, as polpas ficaram descoradas com a retirada do licopeno (Figura 5).



Figura 4. Extratos das polpas de tomate caqui, salad, rasteiro e cereja, respectivamente

Foi observado que o extrato obtido do tomate cereja apresentou uma coloração mais amarelada, evidenciando uma possível concentração de licopeno inferior aos outros extratos.



Figura 5. Polpa de tomate descorada (direita) após os métodos de extração comparando com a polpa logo após o processo de obtenção (esquerda)

4.3. Identificação do licopeno por espectrofotometria no UV/VIS

Foi constatada a presença de licopeno em todos os extratos obtidos dos diferentes tipos de tomate estudados, por identificação pela espectrofotometria na região do visível, apresentando três bandas em 447, 472 e 503 nm (Figura 6), resultado semelhante ao descrito por NUNES e MERCADANTE (2004).

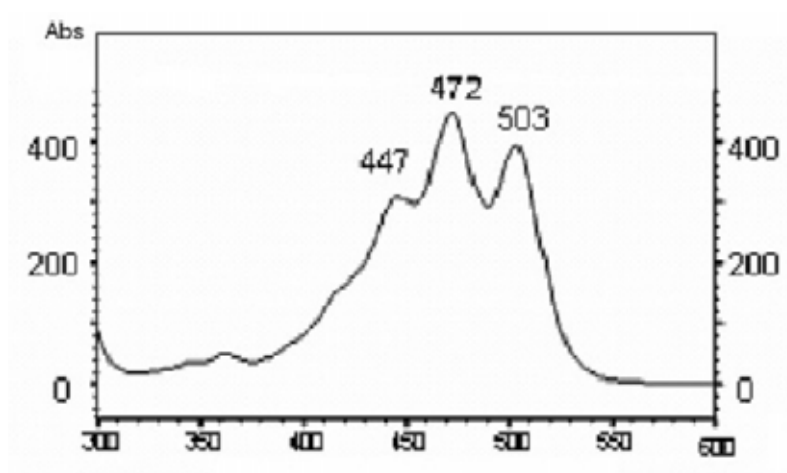


Figura 6. Identificação do licopeno no extrato obtido do tomate por espectrofotometria na região do visível

Foram realizadas quatro extrações para cada tipo de tomate e os valores de absorvância dos extratos obtidos das polpas de tomates estão expressas na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de absorvância a 472 nm dos extratos de tomate

Tipos de tomate	Valores de absorvância da primeira extração*	Valores de absorvância da segunda extração*	Valores de absorvância da terceira extração*	Valores de absorvância da quarta extração*
Salada	2,869	3,180	3,207	3,200
Rasteiro	3,196	3,182	3,173	2,459
Caqui	1,807	3,539	3,438	2,173
Cereja	2,262	3,328	3,440	3,033

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

A Tabela 2 indica que os valores de absorvância dos extratos obtidos a partir dos tomates cereja, caqui e salada, cresceram depois da segunda extração do licopeno e todos apresentaram uma diminuição dos valores de absorvância, ou seja, diminuição da concentração do fitoquímico, quando submetidos à quarta extração, evidenciando que este processo extrativo foi efetivo para a obtenção dos extratos contendo licopeno a partir das polpas de tomate. Os valores de absorvância do extrato obtido do tomate rasteiro diminuíram desde a segunda extração, constatando que o licopeno foi extraído com o aumento do número de extrações com acetato de etila.

Foi realizado um estudo preliminar para comprovar se as primeiras extrações com álcool etílico eram realmente necessárias. Foi observado que os extratos sem a desidratação prévia das polpas, ou seja, submetendo-as apenas às extrações com acetato de etila, apresentaram valores de absorvância muito inferiores e até ausência de licopeno nos extratos, em comparação com o método utilizando álcool etílico. Desta maneira, foi comprovado que o álcool etílico foi essencial, juntamente com o aquecimento dos tomates, para a liberação e obtenção do licopeno.

Após a identificação dos extratos, o acetato de etila presente foi evaporado utilizando para isso o equipamento de rotaevaporação, gerando extratos secos contendo licopeno (Tabela 3).

Tabela 3. Peso de extrato seco contendo licopeno obtido a partir dos quatro tipos de tomate

Tipos de tomate	Peso do extrato seco contendo licopeno (mg)
Salada	83,55
Rasteiro	81,35
Caqui	65,10
Cereja	74,63

Foi possível observar através da Tabela 3 que o tomate salada apresentou maior peso de extrato seco contendo licopeno e o tomate caqui apresentou menor peso de extrato. Este resultado pode estar relacionado com o rendimento de polpa que comprovou menor rendimento do tomate caqui, e, portanto, menor massa de extrato. O tomate cereja apresentou um rendimento de polpa superior aos demais tomates, mas não foi o que obteve maior quantidade em gramas de extrato depois de submetido à rotaevaporação.

4.4. Identificação e quantificação do licopeno por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para identificar e quantificar a presença do licopeno, os extratos foram submetidos à análise por CLAE. Foi utilizado como fase móvel, para a análise cromatográfica do licopeno, o sistema solvente formado por acetonitrila, metanol e acetato de etila, uma vez que a acetonitrila possui melhor seletividade na presença de carotenóides, quando é utilizada coluna

monomérica C₁₈, e o acetato de etila apresenta maior solubilidade e, portanto, melhor retenção do licopeno, considerando a característica apolar (RODRIGUEZ-AWAYA, 1999).

Foi gerado um cromatograma esboçando um grande pico caracterizando a existência do licopeno em 472 nm em todos os tipos de tomate. O padrão analítico de licopeno (Sigma) foi utilizado para a identificação e comprovação da existência do carotenóide nos extratos.

Foi observado que o tempo de retenção do licopeno extraído dos quatro extratos estudados foi semelhante ao do padrão analítico, próximo aos 3,9 minutos (Tabela 3), utilizando para isso uma vazão de 1 ml/minuto, evidenciando a existência do ativo nas amostras.

4.4.1. Doseamento do licopeno nos diferentes tipos de tomate por CLAE

O tempo de retenção e a concentração de licopeno nos extratos obtidos das polpas dos tipos de tomate estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Tempo de retenção e concentração de licopeno em 6 mg de cada extrato obtido dos quatro tipos de tomate e em 1000 g de tomate

Tipos de tomate	Tempo de retenção (min)*	Concentração (µg/ml) de licopeno em 6 mg de extrato*	Concentração (mg/ml) de licopeno em 1000 g de tomate*
Padrão analítico	3,963	-	-
Salada	3,938	35,60	4,95
Rasteiro	3,940	7,30	0,98
Caqui	3,926	6,71	0,72
Cereja	3,931	3,55	0,43

*Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Todos os tomates apresentaram um pico no cromatograma com tempo de retenção semelhantes ao do padrão analítico e o tomate que apresentou maior concentração de licopeno foi o do tipo salada. O cromatograma do padrão de licopeno está demonstrado na Figura 7 e os cromatogramas dos extratos estão representados pela Figura 8.

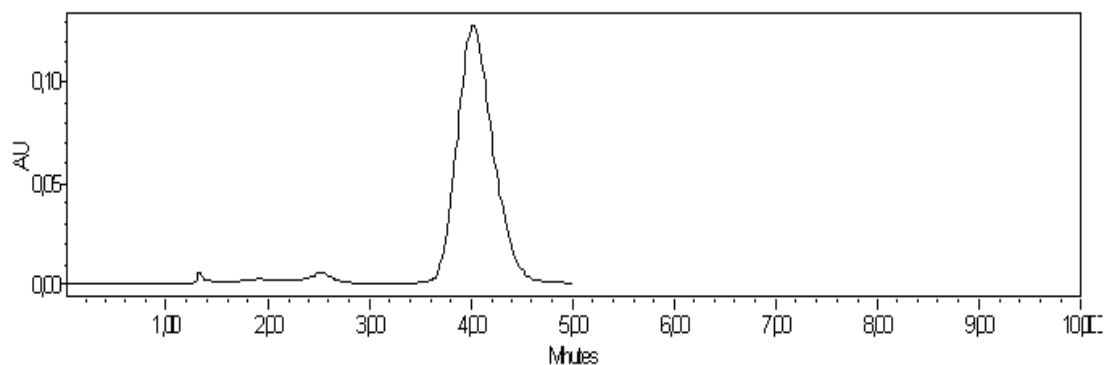


Figura 7. Cromatograma representando o pico do padrão de licopeno (Sigma) obtido por CLAE

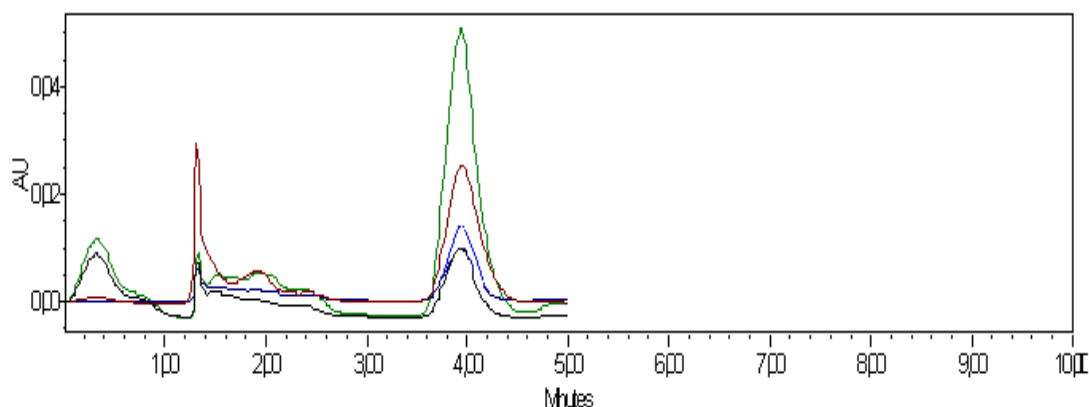


Figura 8. Cromatograma representando os picos dos extratos de tomates salada (verde), rasteiro (vermelho), caqui (azul) e cereja (preto) obtidos por CLAE

O cálculo para determinar a concentração do licopeno nos extratos foi realizado pela equação da reta representada pela Equação V obtida pela curva analítica do padrão de licopeno.

De acordo com o resultado obtido, o tomate salada apresentou maior concentração de licopeno em relação às outras espécies e por esse motivo, o extrato obtido do tomate salada foi escolhido para a realização do ensaio de exatidão, sendo um dos parâmetros avaliados para a validação do método analítico de quantificação.

4.4.2. Validação do método analítico de quantificação por CLAE

4.4.2.1. Obtenção da curva analítica

A curva analítica foi obtida pela preparação das concentrações crescentes do padrão analítico de licopeno realizada em triplicata. Com a obtenção das médias dos valores das áreas

correspondentes aos picos de licopeno pela CLAE, representada pela Figura 9, foi determinada a curva e a equação da reta representada pela Equação V, com um valor de coeficiente de correlação igual a 0,99925.

Equação V: $y = 236602x + 2927,2$

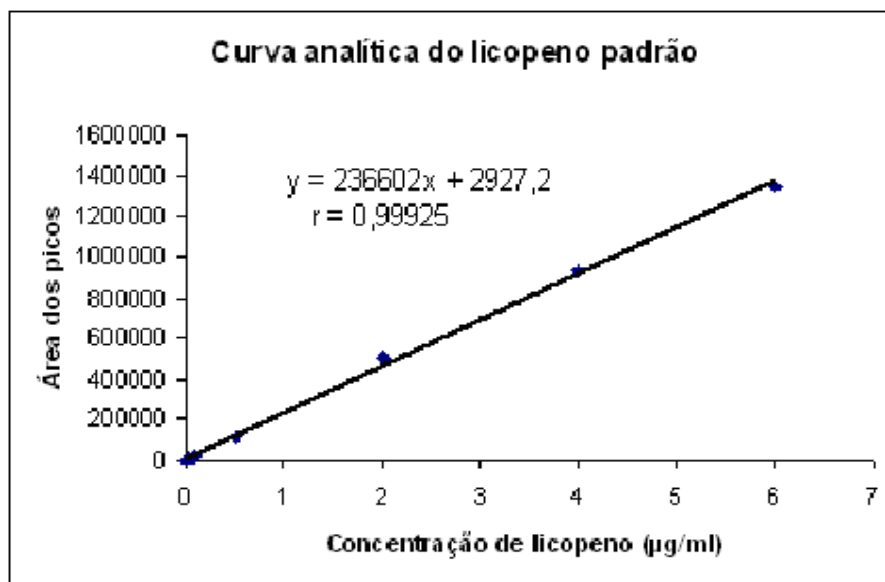


Figura 9. Curva analítica do padrão de licopeno (Sigma) nas concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 2; 4 e 6 µg/ml obtida por CLAE.

A partir da curva analítica foi possível determinar a concentração de licopeno nos extratos estudados, apresentado no item 4.4.1. do Capítulo 1.

4.4.2.2. Precisão

Os valores das áreas dos picos obtidos por CLAE do licopeno padrão estão expressas nas Tabelas 5 (ensaio intradia) e 6 (ensaio interdia), juntamente com os valores do coeficiente de variação dos ensaios intradia e interdia. Foram obtidos valores dos coeficientes de variação inferiores a 5%, que é o limite permitido para produtos farmacêuticos (BRASIL, 2003) e fitoterápicos (BRASIL, 2009a), comprovando assim que o método analisado é preciso.

Tabela 5. Valores obtidos no ensaio de precisão intradia do padrão analítico de licopeno.

Áreas dos picos do licopeno padrão	Média da área dos picos de licopeno padrão	Coefficiente de variação (%)	Coefficiente de variação total (%)
1271037; 1232539			
1211065; 1266500	1258552	3,03	
1248161; 1322010			3,11
1136275; 1158718			
1159896; 1151524	1169045	3,19	
1165634; 1242223			

Tabela 6. Valores obtidos no ensaio de precisão interdia do padrão analítico de licopeno

Dias	Áreas dos picos do licopeno padrão	Média da áreas dos picos de licopeno padrão	Coefficiente de variação (%)	Coefficiente de variação total (%)
1	1136275; 1158718			
	1159896; 1151524	1258552	3,19	
	1165634; 1242223			3,63
2	1151523; 1107672			
	1069146; 1068637	1079544	4,08	
	1054122; 1026165			

4.4.2.3. Exatidão

O ensaio realizado para determinar a exatidão do método foi o de recuperação. Depois da adição das soluções de padrão analítico (1,5 ml, 2,5 ml e 3,5 ml) nos balões volumétricos de 10 ml contendo em cada 1,25 ml de extrato de licopeno obtido do tomate salada, os volumes nos balões foram completados com acetato de etila gerando concentrações de 0,86 (Ca), 2,37, 3,51 e 4,57 µg/ml encontradas nos balões de A, R₁, R₂ e R₃ respectivamente, de acordo com a Tabela 7.

Tabela 7. Preparo das soluções para o teste de recuperação

	Volume de extrato de licopeno (ml)	Volume de padrão de licopeno (Cr) (ml)	Concentração final (Cf) (µg/ml)
A	1,25	-	0,86 (Ca)
R ₁	1,25	1,50	2,37
R ₂	1,25	2,50	3,51
R ₃	1,25	3,50	4,57

A porcentagem de licopeno recuperado (R%) foi calculado de acordo com a Equação I, e os valores obtidos no teste de recuperação estão expressos na Tabela 8.

$$\text{Equação I: \%R} = [(Cf - Ca)/Cr] \times 100$$

Tabela 8. Valores obtidos no ensaio de recuperação do extrato de licopeno

	Volume de padrão adicionado (Cr) (ml)	Concentração final (Cf) (µg/ml)	% de licopeno recuperado (R%)	Média da R%	Coefficiente Variação da R%
R ₁	1,50	2,37	100,61		
R ₂	2,50	3,51	105,86	104,13	2,92
R ₃	3,50	4,57	105,90		

Os dados obtidos comprovaram a exatidão do método, pois a média das recuperações foi de 104,13%, estando de acordo com o especificado na legislação de produtos fitoterápicos (BRASIL, 2009a).

4.4.2.4. Robustez

Os valores obtidos do teste de robustez estão expressos na Tabela 9, alterando o analisador.

Tabela 9. Valores do teste de robustez variando o analisador

Analisador	Áreas dos picos do licopeno padrão	Média das áreas dos picos de licopeno padrão	Coeficiente de variação (%)	Coeficiente de variação total (%)
1	950916; 909781	944844	3,87	3,97
	996979; 975401			
	905491; 930496			
2	1151523; 1107672	1079544	4,08	
	1069146; 1068637			
	1054122; 1026165			

O coeficiente de variação apresentou um valor inferior ao estipulado na legislação (BRASIL, 2003; BRASIL, 2009a), determinando que o método é robusto.

4.4.2.5. Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através das Equações II e III, e os valores encontrados foram LD de 0,0012 µg/ml e LQ de 0,0039 µg/ml.

Estes valores apresentam as menores concentrações possíveis de serem detectadas e quantificadas do método desenvolvido.

4.4.2.6. Seletividade

Os resultados obtidos pelos extratos foram muito semelhantes ao do padrão analítico, e o método foi considerado exato, evidenciando que os extratos não possuem impurezas ou outros compostos capazes de interferir no pico de identificação do composto.

4.5. Estudo da atividade antioxidante *in vitro*

Os extratos contendo licopeno foram avaliados quanto à atividade antioxidante *in vitro* utilizando o radical DPPH e todos apresentaram atividade em torno de 300 µg/ml da solução metanólica dos extratos, devido à diminuição da absorvância do radical, porém o extrato que apresentou maior atividade foi obtido do tomate salada, de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10. Valores das concentrações e absorvâncias dos extratos dos diferentes tipos de tomate na presença de DPPH

SALADA			RASTEIRO			CAQUI			CEREJA		
µg/ml	Abs*	% inibição*	µg/ml	Abs*	% inibição*	µg/ml	Abs*	% inibição*	µg/ml	Abs*	% inibição*
0	0,68	-	0	0,68	-	0	0,68	-	0	0,68	-
200	0,59	13,23	200	0,58	10,29	200	0,67	10,29	200	0,61	14,70
250	0,53	22,05	250	0,56	13,70	250	0,61	14,70	250	0,58	17,64
300	0,52	23,52	300	0,55	16,17	300	0,57	19,11	300	0,55	19,11
350	0,05	92,64	350	0,06	91,17	350	0,06	91,17	350	0,06	91,17
400	0,05	92,64	400	0,06	92,34	400	0,06	91,17	400	0,05	92,59

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

A porcentagem de inibição ao DPPH provocada pelo licopeno presente nos extratos e os valores de IC₅₀ foram calculados e estão expressos na Figura 10 e na Tabela 11, respectivamente.

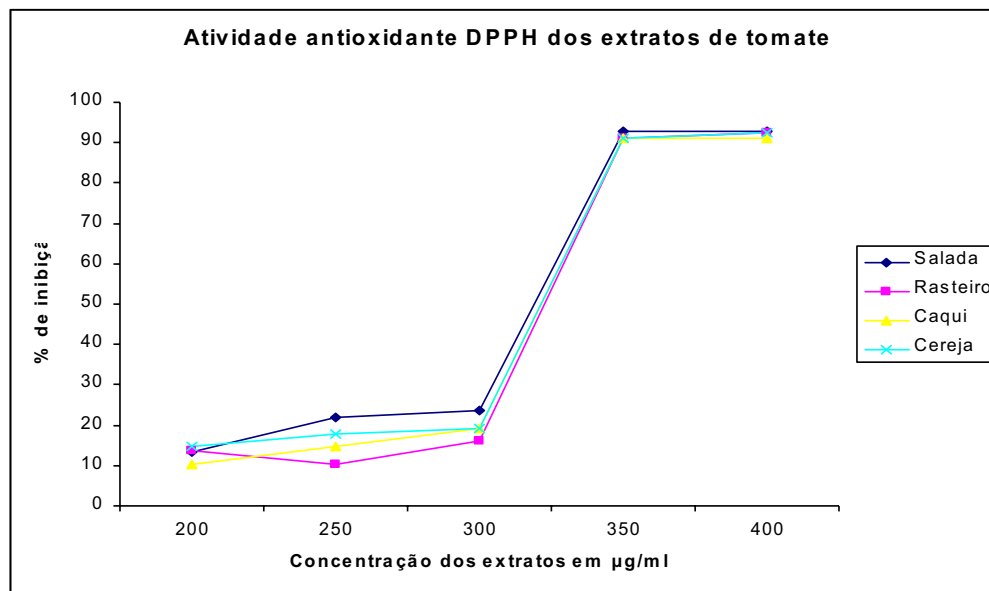


Figura 10. Porcentagem de inibição do radical DPPH na presença dos extratos contendo licopeno obtidos dos quatro tipos de tomate analisados

Os valores de IC_{50} dos extratos foram calculados para as preparações de quatro concentrações dos extratos (300, 310, 325, 350 $\mu\text{g/ml}$) para a obtenção de uma curva analítica e equação da reta, sendo possível a determinação destes valores.

Tabela 11. Valores de IC_{50} frente ao radical DPPH obtidos dos quatro tipos de tomate estudados

Extratos dos tomates estudados	Valores de IC_{50} (mg/ml)*
Salada	0,305
Rasteiro	0,310
Cereja	0,306
Caqui	0,311

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

O mesmo teste foi realizado com a vitamina C como padrão. Foi preparada uma solução de vitamina C com concentração de 1 mg/ml e a partir desta, foram preparadas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 11). O valor de IC_{50} foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva analítica representada pelas concentrações de 5, 10, 15 e 25 $\mu\text{g/ml}$, e apresentou um valor igual a 0,014 mg/ml.

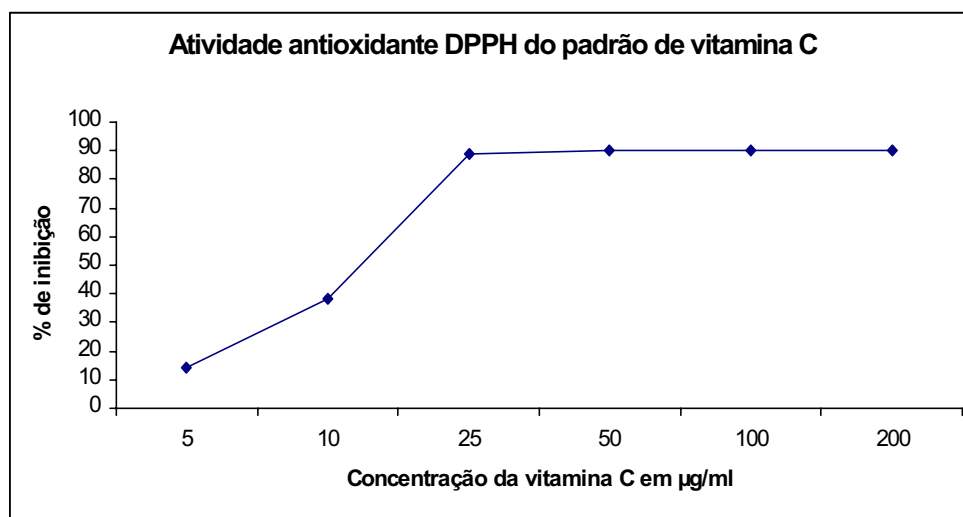


Figura 11. Porcentagem de inibição do radical DPPH na presença de vitamina C padrão

O extrato de tomate salada, embora apresente maior atividade antioxidante, não foi tão eficiente quanto à vitamina C. No entanto, a ação pode ser considerada satisfatória, pois na concentração de 350 $\mu\text{g/ml}$ (2 $\mu\text{g/ml}$ de licopeno) o extrato inibiu 92,6% dos radicais DPPH presentes, resultado obtido pela Equação IV.

$$\text{Equação IV: \% inibição} = \frac{A_{\text{Max}} - A_{\text{Teste}}}{A_{\text{Max}}} \cdot 100$$

$$A_{\text{Max}}$$

O teste para avaliar a atividade antioxidante frente ao radical ABTS também foi realizado com os quatro extratos contendo licopeno, e o extrato obtido do tomate salada apresentou maior atividade antioxidante. Os valores das absorvâncias, das concentrações utilizadas dos extratos e a porcentagem de inibição frente ao radical, obtida pela Equação IV, estão descritos na Tabela 12.

Tabela 12. Valores das concentrações utilizadas dos quatro extratos analisados e das absorvâncias obtidas através do teste de avaliação antioxidante frente ao radical ABTS

SALADA			RASTEIRO			CAQUI			CEREJA		
%			%			%			%		
µg/ml	Abs*	inibição*	µg/ml	Abs*	inibição*	µg/ml	Abs*	inibição*	µg/ml	Abs*	inibição*
0	0,75	-	0	0,75	-	0	0,75	-	0	0,75	-
5	0,67	10,66	5	0,72	4,00	5	0,73	2,66	5	0,58	22,66
10	0,58	22,66	10	0,57	24,00	10	0,65	13,33	10	0,53	29,33
20	0,40	46,66	20	0,55	26,66	20	0,59	21,33	20	0,50	33,33
30	0,32	57,33	30	0,50	33,33	30	0,53	29,33	30	0,48	36,00
40	0,25	66,66	40	0,35	53,33	40	0,36	52,00	40	0,30	60,00

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Para a obtenção dos valores de IC₅₀ foram preparadas concentrações de 32,5 µg/ml, 35,0 µg/ml e 37,5 µg/ml. As porcentagens de inibição e os valores de IC₅₀ podem ser encontrados na Figura 12 e na Tabela 13.

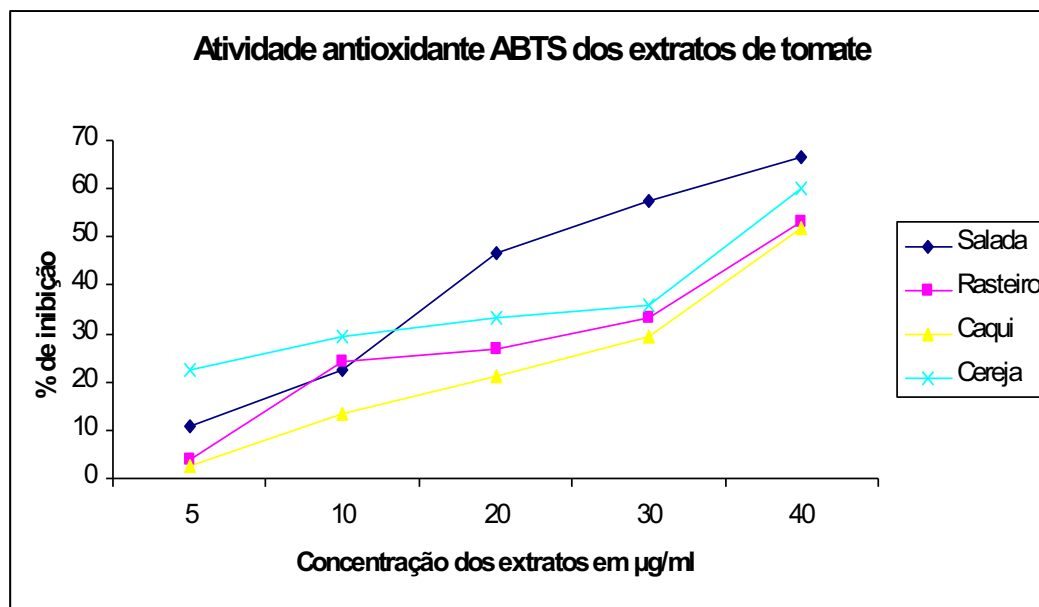


Figura 12. Porcentagem de inibição do radical ABTS na presença dos extratos contendo licopeno obtidos dos quatro tipos de tomate analisados

Tabela 13. Valores de IC_{50} frente ao radical ABTS obtidos dos quatro tipos de tomate estudados

Extratos dos tomates estudados	Valores de IC_{50} (mg/ml)*
Salada	0,250
Rasteiro	0,355
Cereja	0,326
Caqui	0,375

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Da mesma maneira que o teste para o radical DPPH, foi determinada a atividade antioxidante *in vitro* da vitamina C como padrão analítico frente ao radical ABTS. Foram preparadas concentrações de 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 µg/ml (Figura 13). O valor de IC_{50} foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva analítica representada pelas concentrações de 1,5, 2,0, 2,5 e 3 µg/ml, e apresentou um valor igual a 0,0023 mg/ml.

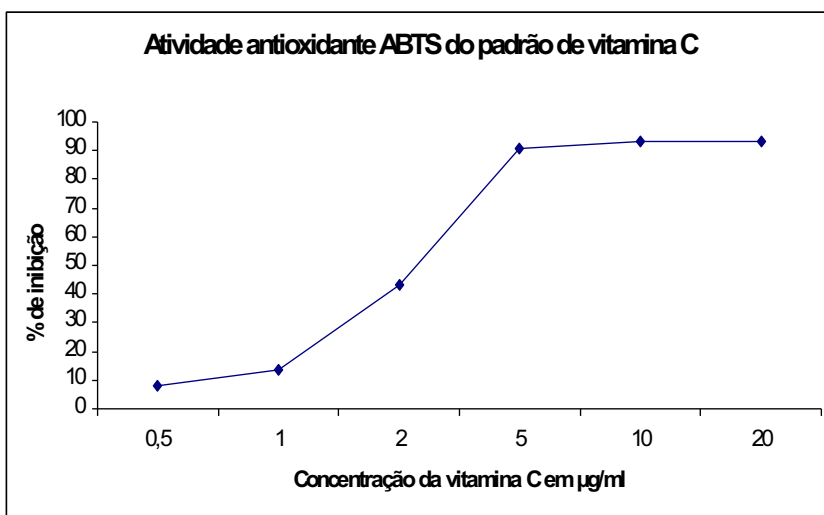


Figura 13. Porcentagem de inibição do radical ABTS na presença de vitamina C padrão

Os resultados constataram que todos os extratos possuem atividade antioxidante perante os radicais utilizados para os testes *in vitro*, por conterem licopeno, e, apesar de apresentarem atividade inferior à do padrão analítico, são capazes de inibir os radicais. O tomate salada, que apresentou maior atividade em ambos os testes, foi capaz de inibir 66,66 % do radical ABTS na concentração de 40 µg/ml e 92,6% do radical DPPH na concentração de 350 µg/ml, como já descrito anteriormente.

O estudo de atividade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais frente a estes radicais é muito vasto. HUBINGER (2008) analisou a atividade antioxidante *in vitro* frente aos radicais DPPH e ABTS do extrato etanólico dos frutos de *Dimorphandra mollis*, o qual apresentou atividade antioxidante, inibindo 92,5% do radical DPPH na concentração de 300 µg/ml e 98% do radical ABTS na concentração de 20 µg/ml. O teste realizado para o padrão analítico quercetina apresentou atividade bem superior ao extrato, como observado para a vitamina C em relação aos extratos de tomate, porém foi constatada a atividade antioxidante dos extratos vegetais.

4.6. Determinação do tomate de escolha para a realização do estudo de desenvolvimento do fitocosmético contendo extrato com licopeno

Para a escolha do tipo de tomate no desenvolvimento do fitocosmético foi considerada a atividade antioxidante do extrato perante os radicais livres DPPH e ABTS, o preço e a concentração de licopeno determinada.

Em relação à atividade antioxidante, foi considerado o valor do teste utilizando o DPPH como radical livre, pois todos os extratos apresentaram valores superiores de porcentagem de inibição frente ao radical em relação ao teste utilizando o ABTS. Desta maneira, o extrato do tomate do tipo salada apresentou maior atividade antioxidante *in vitro* em comparação com os outros extratos contendo licopeno.

O doseamento realizado para os quatro extratos obtidos dos diferentes tipos de tomate indicou que o tomate salada apresentou maior concentração de licopeno.

O preço dos quatro tipos de tomates praticados durante o mês de março de 2008 está descrito na Tabela 14, evidenciando que o tomate salada possui um preço inferior aos demais tomates.

Tabela 14. Valores dos preços dos quatro tipos de tomates adquiridos no mês de março de 2008, no mercado Jaú Serve, na cidade de Araraquara, no estado de São Paulo

Tipos de tomate	Preço por quilo (R\$)
Salada	1,99
Rasteiro	2,69
Caqui	4,49
Cereja	8,00

Através dos resultados obtidos, o tomate escolhido foi o do tipo salada, pois apresentou maior concentração de licopeno e maior atividade antioxidante *in vitro* perante o radical DPPH em relação aos demais. Além destes, o fator econômico também influenciou a escolha, uma vez que o preço do tomate salada foi inferior às outras espécies testadas. Assim, as próximas etapas deste trabalho foram realizadas com esta espécie de tomate.

4.7. Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

Para determinar a citotoxicidade do extrato contendo licopeno obtido do tomate salada, foi utilizado o corante resazurina, que identifica a existência de células vivas (coloração rosa) e mortas (coloração azul). Todos os poços contendo extrato apresentaram coloração rosa, evidenciando a presença de células vivas. Com isso, foi observado que o extrato vegetal não apresentou citotoxicidade nas linhagens de macrófagos e fibroblastos analisadas, pois mesmo a mais alta concentração testada do extrato (200 µg/ml) não atingiu o índice de citotoxicidade de 50%.

Com os resultados obtidos neste trabalho, foi possível constatar que os quatro tipos de tomate analisados apresentam licopeno, atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS. Porém, o tomate que possui maior concentração deste carotenóide e maior atividade antioxidante foi o do tipo salada e, além disso, apresenta um valor inferior de custo em relação aos demais. Desta maneira, este foi o tomate escolhido para o desenvolvimento do fitocosmético.

O método de identificação e quantificação do licopeno foi considerado preciso, exato, seletivo e robusto, através dos testes realizados e o extrato contendo licopeno obtido da extração do tomate salada, não apresentou citotoxicidade frente às linhagens de fibroblastos e macrófagos utilizadas.

5. CONCLUSÃO PARCIAL

Foi possível concluir que o tomate salada pode ser utilizado para o desenvolvimento do fitocosmético a ser utilizado no combate à aceleração do envelhecimento cutâneo.

CAPÍTULO 2 – DESENVOLVIMENTO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

6. REVISÃO DA LITERATURA

6.1. Formulações cosméticas

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2003), produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes são preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, de uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, com o objetivo exclusivo ou principal de limpá-los, perfumá-los, alterar sua aparência e ou corrigir odores corporais e ou protegê-los ou mantê-los em bom estado.

Fitocosmético, do grego *phyto* e *kosmein*, pode ser entendido como a preparação cosmética que contenha substâncias de origem vegetal, sejam elas extratos e/ou óleos (ISAAC *et al.*, 2008a).

Fórmulas cosméticas antioxidantes são muito comuns no combate ao envelhecimento cutâneo, pois muitos destes produtos hoje contêm pelo menos uma substância com essa finalidade (GIACOMONI, 2007). O uso de extratos vegetais que possuam atividade antioxidante vem atraindo cada vez mais a atenção dos consumidores, pois os extratos de frutas, cereais e de diferentes vegetais, e seus produtos derivados, de acordo com VELLOSA (2005), têm mostrado atividades antioxidantes efetivas em diferentes sistemas modelos, e o uso de plantas com propriedades farmacológicas também têm chamado a atenção de pesquisadores.

Para promover um efeito satisfatório na ação antienvhecimento, a formulação deverá ser estável e promover a efetiva liberação do ativo na pele, para apresentar atividade antioxidante. As emulsões representam, historicamente, a forma mais antiga de aplicação cosmética, sendo o primeiro creme aquele criado por Galeno, para aplicação facial (ISAAC, 1998).

Emulsão é um sistema constituído por dois líquidos imiscíveis, contendo uma parte aquosa ou hidrofílica e outra parte oleosa ou lipofílica, sendo que uma das partes está dispersa na outra em forma de gotículas, tornando-se homogêneo pela adição de substâncias tensoativas que emulsificam o sistema (ANSEL *et al*, 2000; CORRÊA, 2009; SILVA e SOARES, 1996).

As emulsões que possuem fase interna oleosa e fase externa aquosa são classificadas como óleo em água, ou designadas como O/A, e as emulsões que são constituídas de fase interna aquosa e fase externa oleosa são denominadas água em óleo ou A/O (ANSEL *et al*, 2000; LEONARDI, 2004).

A emulsão constitui um importante excipiente para a administração de ativos cosméticos por via tópica, proporcionando a inclusão de substâncias tanto hidrossolúveis quanto lipossolúveis sendo, historicamente, uma das mais antigas formas de aplicação cosmética. No passado, este tipo de formulação era considerada simples, no entanto, atualmente é sabido que podem influenciar a biodisponibilidade dos fármacos e ou ativos devido a possíveis interações dos seus componentes, bem como por influenciar a solubilidade e a difusão do produto para a pele. Estas interações substância ativa-veículo e veículo-pele combinadas, influenciam a concentração que os ativos cosméticos alcançam a superfície cutânea, permanecendo nesta região ou penetrando através do estrato córneo (CORRÊA, 2009; ECCLESTON, 1997).

Do ponto de vista cosmético, as emulsões leves, ou seja, aquelas com pequenas quantidades de material graxo são as preferidas pelos consumidores, uma vez que proporcionam melhor espalhabilidade e melhor sensação quando aplicadas (ISAAC, 1998).

A procura de novas matérias-primas ou de formulações contendo substâncias de origem vegetal tem aumentado nos últimos anos; dentre elas, os derivados de karité, que têm sido muito utilizados e estudados. Na indústria cosmética é empregado essencialmente como emoliente, com ação estimulante do metabolismo e propriedades vasodilatadoras. Combate a secura cutânea, a inflamação e o eritema solar (PROENÇA da CUNHA *et al*, 2004).

O karité (*Vitellaria paradoxa* Gaertner) é uma árvore africana economicamente importante (MARANZ *et al*, 2004). É uma planta espontânea no Sudão e no Mali, hoje muito cultivada no sul do Marrocos e em outros países de clima quente e seco. A parte utilizada é a

semente do fruto (semente de karité), da qual se obtém uma gordura amarelo-pálida. É constituída por ésteres glicéricos de ácidos graxos (esteárico, palmítico, mirístico, oleico e linoleico), álcoois triterpênicos esterificados com ácidos graxos e ácido cinâmico e é constituída principalmente por álcoois livres e fitoestéroides (PROENÇA da CUNHA *et al.*, 2004).

Uma vez que novas formulações são propostas é de extrema importância o estudo da estabilidade destas emulsões, usando assim, maior tempo de prateleira e prevenindo degradação dos constituintes da formulação provocada por instabilidade físico-química, organoléptica ou mesmo microbiológica.

6.2. Estabilidade das emulsões

As formulações propostas devem ser avaliadas por testes de estabilidade que forneçam indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possam ser submetidas, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008a).

A estabilidade das emulsões pode ser influenciada por fatores intrínsecos e extrínsecos. Dentre os intrínsecos podem ser citadas incompatibilidades físicas e químicas entre componentes da formulação, seja ativo ou não, interação destes com o material de acondicionamento e o processo de fabricação. Dentre os fatores extrínsecos podem ser citados o tempo, a temperatura, luz e oxigênio, umidade, material de acondicionamento, micro-organismos e agitação durante o transporte (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008a).

Para avaliar a estabilidade de produtos cosméticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, segundo o Guia de estabilidade de produtos cosméticos realizado em 2004 (BRASIL, 2004), preconiza alguns testes:

1. Ensaio organoléptico: aspecto, cor, odor e sabor.
2. Ensaio físico-químico: potencial hidrogeniônico (pH), materiais voláteis, teor de água, viscosidade, comportamento reológico, análise da distribuição do tamanho de partículas, centrifugação, densidade, granulometria, condutividade elétrica, espectrofotometria e cromatografia.
3. Ensaio microbiológico: o controle microbiológico tem como função determinar o número total de micro-organismos presentes em preparações não estéreis e cosméticos, além

de visar a identificação de patogênicos, como *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes. É importante assegurar a estabilidade microbiológica desses produtos e evitar potenciais riscos provocados por toxinas ou outras substâncias derivadas do metabolismo microbiano, além de manter os atributos do produto, como cor, odor e viscosidade. Há também o teste de eficácia de conservantes ou teste-desafio que consiste na contaminação proposital do produto a ser analisado com microrganismos específicos e, posteriormente, a avaliação desta carga microbiana em intervalos de tempos definidos, desde a fabricação até sua utilização final pelo consumidor (BRASIL, 2004; F. Bras. IV, 1988; PINTO *et al.*, 2003).

6.2.1. Reologia

As características reológicas são propriedades importantes a serem consideradas na fabricação, estocagem e aplicação de produtos de uso tópico. Reologia representa o estudo das propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças, com o objetivo central de descrever as relações entre as tensões e deformações, através das leis constitutivas ou de comportamento de fluxo (CORREA *et al.*, 2005; ALMEIDA e BAHIA, 2003).

A determinação do comportamento reológico da formulação auxilia na avaliação da natureza físico-química do veículo, de tal forma que torna possível detectar sinais precoces de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes, formulações teste e produtos finais (BARRY, 1993).

Do ponto de vista reológico, os sistemas podem ser denominados Newtonianos e não-Newtonianos. As formulações que possuem partículas assimétricas, como a maioria dos produtos cosméticos e farmacêuticos, apresentam fluxo não Newtoniano, que normalmente é representado por três tipos de curvas: plástica, pseudoplástica e dilatante, sendo o fluxo pseudoplástico mais comum para as formulações cosméticas (ANSEL *et al.*, 2000; SCHOTT, 1995).

Diferentes processos físicos como cremeação ou sedimentação, floculação e coalescência podem ocorrer em sistemas emulsionados e serem investigados usando-se diferentes técnicas reológicas. Características sensoriais e desempenho do produto são frequentemente relacionados às suas propriedades reológicas, principalmente às propriedades

de fluxo, que determinam a consistência, a fácil espalhabilidade e ausência de escoamento excessivo do produto (MASSON, 2005).

6.2.2. Análise Térmica

Os produtos cosméticos também podem ser submetidos à análise térmica que compreende um grupo de técnicas através da qual uma propriedade física de uma substância e ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura, enquanto a substância é submetida à propagação controlada de temperatura. Esta análise possibilita uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, estudo de reações químicas, avaliação de estabilidade térmica, determinação da composição química dos materiais e desenvolvimento de metodologia analítica (FARIA *et al.*, 2002; GUILLEN *et al.*, 2006).

As técnicas termoanalíticas possuem grande importância no âmbito cosmético devido à grande variedade de aplicações e os métodos mais utilizados são Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Termogravimetria (TG) e Termogravimetria derivada (DTG). A análise térmica pode ser utilizada tanto no controle da matéria-prima, quanto do produto acabado, possuindo potencial de emprego no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos (FARIA *et al.*, 2002; GUILLEN *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

A análise térmica em produtos cosméticos pode ser aplicada a uma gama de materiais, como polímeros, substâncias sintéticas e naturais, alimentos e fármacos (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

7. OBJETIVO

Desenvolver uma emulsão fitocosmética constituída por extrato contendo licopeno obtido do tomate salada e avaliar sua estabilidade através da realização dos ensaios de centrifugação, testes preliminares e acelerados de estabilidade físico-química, espalhabilidade, análise térmica, comportamento reológico completo e qualidade microbiológica.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1. Material, acessórios e equipamentos

Material: Shea butter (manteiga de karité), liquid shea butter (manteiga líquida de karité), oleyl sheabutterate (éster de manteiga de karité líquido), PEG-23 shea butterate (éster de manteiga de karité não iônico), PEG 75 shea butter glycerides (manteiga de karité etoxilada) (gentilmente doados pela ION-QUÍMICA), imidazolidinyl urea (imidazolidiluréia), butilhidroxitolueno (BHT), propylparaben (propilparabeno), methylparaben (metilparabeno), EDTA, propyleneglycol (propilenoglicol), xanthan gum (goma xantana), carbomer (carbopol), triethanolamine (trietanolamina), aqua (água), ethyl acetate (acetato de etila) (grau HPLC), methanol (metanol) (grau HPLC), acetonitrile (acetonitrila) (grau HPLC), lycopene padrão analítico (licopeno) (Sigma), clorofórmio (PA), ágar bismuto sulfito, ágar caseína-soja, ágar cetrimida, ágar MacConkey, ágar Sabouraud, ágar tioglicolato, ágar verde brilhante, ágar Vogel Johnson, ágar xilose lisina desoxina, caldo lactosado, caldo selenito-cistina, caldo tetracionato.

Acessórios: Béckeres, cálices, bastões de vidro, espátulas, termômetro, fonte de aquecimento, pesos de 200 g, cadinho de platina, cadinho de alumínio com tampa perfurada, tubos de ensaio, pipetas, placas de petri, provetas, placa molde de vidro, picnômetro, papel de filtro qualitativo e quantitativo, *vials*, balões de diluição, membrana (Millipore, 0,45 µm), alça de Drigalski.

Equipamentos: balança analítica (Gehaka, BG 2000), peagômetro digital (Quimis), reômetro (Haake RS-1), centrífuga (Fanem-Baby 208), freezer (Eletrolux Prosdócimo, doublé D44), microscópio (Carl Zeiss – Axioskop - 40), equipamento de análise térmica TA-4000 (Mettler), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, 1525), coluna de fase reversa (C₁₈) (Nova Pak 250 x 4,60 mm 5 µm), estufa de secagem e esterilização (Famen, 315 SE), estufa para cultura bacteriológica (Odontobrás, ECB 1.2 digital), autoclave vertical (Phoenix, AV 5C).

8.2. Métodos

8.2.1. Desenvolvimento da emulsão base

Foram desenvolvidas quatro emulsões O/A (F1, F2, F3 E F4) com os agentes capazes de promover emoliência Shea Butter (manteiga de karité), Liquid Shea Butter (manteiga líquida de Karité) e Oleyl Sheabutterate (éster de manteiga de karité líquido), e os agentes

emulsionantes PEG 75 Shea Butter Glycerides (glicerídeos de manteiga de karité etoxilada), PEG-23 Shea Butterate (éster de manteiga de karité etoxilada), gentilmente cedidos pela ION-QUÍMICA. Esses derivados de karité conferem toque suave à pele. A composição percentual das formulações está descrita na Tabela 15.

Tabela 15. Composição percentual das formulações base F1, F2, F3 e F4

Nomenclatura INCI	% dos componentes (p/p)			
	F1	F2	F3	F4
Shea Butter (manteiga de karité)	4,0	4,0	4,0	1,2
Liquid Shea Butter (manteiga líquida de karité)	3,0	-	-	-
Oleyl Sheabutterate (éster de manteiga de karité líquido)	-	3,0	3,0	0,8
PEG 75 Shea Butter Glycerides (glicerídeos de manteiga de karité etoxilada)	2,0	-	3,0	-
PEG-23 Shea Butterate (éster de manteiga de karité etoxilada)	6,0	6,0	6,0	1,5
Imidazolidinyl urea (imidazolidiluréia)	0,1	0,1	0,1	0,1
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Propylparaben (propilparabeno)	0,02	0,02	0,02	0,02
Methylparaben (metilparabeno)	0,18	0,18	0,18	0,18
EDTA	0,02	0,02	0,02	0,02
Propylene Glycol (propilenoglicol)	4,0	4,0	4,0	4,0
Xanthan gum (goma xantana)	-	-	-	0,15
Carbomer (polímero carboxivinílico) (dispersão a 2%)	-	-	-	25,0
Triethanolamine (trietanolamina) q.s.	-	-	-	pH 6,0
Aqua (água) q.s.p.	100,00	100,00	100,00	100,00

8.2.2. Preparo do fitocosmético

A emulsão do tipo O/A foi preparada de acordo com técnica usual de preparação de emulsões. Foi aquecida a fase aquosa até $75 \pm 2^\circ \text{C}$ e a fase oleosa com os componentes

oleosos da formulação até a fusão. A fase aquosa foi transferida sobre a oleosa e a agitação manual foi realizada até o resfriamento.

O extrato de licopeno obtido foi incorporado diretamente na emulsão já desenvolvida na concentração de 0,1%, pois nesta concentração o licopeno foi capaz de ficar retido na epiderme e na derme e apresentou atividade antioxidante, de acordo, respectivamente, com os testes de permeação cutânea *in vitro* e atividade antioxidante *in vitro*, apresentados através dos itens 16.2 e 16.3, respectivamente, no Capítulo 3 deste trabalho.

A incorporação do extrato foi realizada pela técnica de diluição geométrica, favorecendo maior homogeneidade, e o fitocosmético apresentou uma concentração final de licopeno de 0,59 mg em 100 g do fitocosmético.

8.2.3. Teste de centrifugação

Para realizar o teste de centrifugação foram pesados 5 g de cada amostra, submetidos a três ciclos de 3000 rpm em centrífuga, permanecendo 30 minutos em cada ciclo à temperatura ambiente (BRASIL, 2004; IDSON, 1993a e 1993b). A separação das fases é indicativa de instabilidade.

8.2.4. Determinação do tipo de emulsão

Para determinar o tipo da emulsão (O/A ou A/O) foi realizado o ensaio de diluição, acrescentando 5 ml de água destilada em 1 g de cada emulsão e ensaio com gotejamento de corantes de origem oleosa e aquosa sobre a emulsão analisada, podendo ser observada a homogeneização ou não, através da microscopia, de acordo com PRISTA *et al.* (1996).

8.2.5. Testes de estabilidade

A formulação foi avaliada conforme os testes de estabilidade, segundo preconiza o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2004) e ISAAC *et al.* (2008a). Todos os testes foram realizados em triplicata.

As preparações foram estocadas em geladeira a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, em temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$), exposta à luz indireta, em estufa termostaticada a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ e em freezer a $-5 \pm 2^\circ$

C. Além destas condições, as emulsões também foram submetidas à avaliação macroscópica e do pH, durante 15 dias consecutivos (teste de estabilidade preliminar). Os testes de densidade e viscosidade foram realizados nos dias 1 para a amostra estocada em temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) e nos dias 7 e 15 para todas as amostras.

Para a realização dos ciclos de congelamento e descongelamento, as amostras foram submetidas a condições extremas de temperaturas, alternado 24 horas em temperaturas elevadas ($45 \pm 2^\circ \text{C}$) e 24 horas em temperaturas baixas ($-5 \pm 2^\circ \text{C}$), durante 12 dias seguidos.

Para a realização do teste de estabilidade acelerada, os ensaios (avaliação microscópica, do pH, da densidade e da viscosidade) foram realizados nos intervalos de 1, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de análise. A variação dos resultados não deve ser maior que 10% (BRASIL, 2004).

O teste de estabilidade foi realizado para a formulação base escolhida e para o fitocosmético desenvolvido, envasados em recipientes de vidro (BRASIL, 2004).

8.2.5.1. Avaliação macroscópica

Na avaliação macroscópica foram observadas características como cor, odor e aparência da emulsão. Também foi avaliado a existência ou não de separação das fases das amostras.

8.2.5.2. Determinação do valor de pH

A determinação do valor de pH foi realizada na dispersão aquosa a 10% (p/p) da amostra em água recém destilada, usando peagômetro digital. O eletrodo foi inserido diretamente na dispersão aquosa (DAVIS, 1977). O valor compatível com o pH cutâneo, entre 5,5 e 6,5 foi usado como critério no teste de estabilidade, e a variação dos resultados não deve ser maior que 10% (BRASIL, 2004).

8.2.5.3. Determinação da densidade

A determinação da densidade da amostra foi realizada verificando a massa, em balança analítica, do picnômetro vazio com 5 ml de capacidade e do picnômetro contendo a amostra até atingir o volume de 5 ml. A densidade foi calculada pela diferença entre as massas

do picnômetro cheio e do vazio, dividindo pelo volume da amostra (F. Bras. IV, 1988). A variação dos resultados não deve ser maior que 10% (BRASIL, 2004).

8.2.5.4. Determinação da viscosidade

O teste para determinar a viscosidade das emulsões submetidas às condições de estresse foi realizado pelo ensaio reológico de curva de fluxo, tendo como parâmetros uma faixa de taxa de cisalhamento de 0-100 s⁻¹ para a curva de subida durante 120 segundos e de 100-0 s⁻¹ para a curva de descida também por 120 segundos. O reograma foi avaliado quanto à viscosidade (Pa.s) em relação à taxa de cisalhamento. O teste foi realizado a 25 ± 0,5° C e em triplicata (CEFALI *et al.*, 2009a), e de acordo com BRASIL (2004), a variação dos resultados não deve ser maior que 10%.

8.2.6. Doseamento do licopeno incorporado na emulsão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O doseamento do licopeno incorporado na emulsão desenvolvida foi realizado coletando alíquotas de 400 mg do fitocosmético nas cinco condições de estresse em que foi submetido (geladeira a 5 ± 2° C, em temperatura ambiente a 27 ± 2° C, exposta à luz indireta, em estufa termostatzada a 45 ± 2° C e em freezer a -5 ± 2° C), dissolvidas em sistema solvente constituído de clorofórmio/isopropanol (1:1, v/v), (ISAAC, 1993) e transferidas em balão de diluição de 5 ml, atingindo uma concentração final de licopeno de 0,47 µg/ml. Os valores foram avaliados utilizando a CLAE (Waters 1525- Binary HPLC Pump), acoplado ao detector de absorvância (Waters 2487). O software utilizado foi o Empower. A identificação do licopeno foi realizada em coluna de fase reversa (C₁₈) utilizando a fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila nas proporções de 48:26:26 (v/v/v) durante 5 minutos e com vazão de 1,0 ml/min. O comprimento de onda utilizado foi realizado em 472 nm, adaptando a metodologia descrita por NUNES e MERCADANTE, 2004.

8.2.7. Determinação da espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade do fitocosmético foi realizada a partir da leitura dos diâmetros abrangidos por 1g da amostra em sistema formado de placa molde de vidro sobre

uma placa suporte de vidro de 200 g posicionada sobre escala milimetrada, após um minuto (Figura 14).



Figura 14. Sistema utilizado para a realização da determinação da espalhabilidade

O procedimento foi repetido acrescentando outras placas de 200 g, em intervalos de um minuto (KNORST, 1991), atingindo um peso máximo de 800 g sobre a amostra.

8.2.8. Determinação do comportamento reológico completo

A amostra teve seu comportamento reológico avaliado em reômetro utilizando um sensor cone/placa (C35/2° Ti) e os dados analisados pelo software Rheowin 3.5.

Foi determinado o comportamento reológico completo do fitocosmético, realizando os ensaios de curva de fluxo utilizando para isso uma faixa de taxa de cisalhamento de 0 a 100 Pa/s para a rampa de subida durante 120 segundos e de 100 a 0 Pa/s para a rampa de descida durante 120 segundos. Foi determinada em qual tensão de cisalhamento a amostra apresentou limite de escoamento, ou seja, sofreu deformação, através do teste de rampa de tensão com limite de escoamento com uma faixa de tensão de 0 a 10 Pa durante 120 segundos (CEFALI *et al.*, 2009b; ZAMBON *et al.*, 2009).

Os ensaios reológicos de varredura de tensão e varredura de frequência foram realizados para analisar a viscosidade dinâmica (η) e o módulo de estocagem (G') da amostra. Para o teste de varredura de tensão, foi utilizada uma faixa de tensão de cisalhamento de 0 a 100 Pa e frequência de 1 Hz. O teste de varredura de frequência foi realizado utilizando uma faixa de frequência de 0,01 a 100 Hz a uma tensão de 1 Pa. Deste modo, foram determinados o módulo elástico (G') e o módulo viscoso (G'') (CHIARI *et al.*, 2009; ISAAC *et al.*, 2008b).

O ensaio de fluência e relaxação foi realizado para determinar a viscoelasticidade da amostra utilizando, para isso, tensão de cisalhamento de 1 Pa durante 300 segundos para fluência e 300 segundos para a relaxação (CEFALI *et al.*, 2009b; CHIARI *et al.*, 2008).

Todos os ensaios foram realizados a $25 \pm 0,5^\circ \text{C}$ e utilizando cerca de 1 g de amostra para cada teste.

8.2.9. Análise térmica

O fitocosmético foi submetido à análise por DSC e TG no equipamento de análise térmica TA-4000. A massa da amostra utilizada foi de 7,4 mg, utilizando cadinho de alumínio com tampa perfurada para a análise de DSC. A taxa de aquecimento foi de 10°C/min em atmosfera de N_2 , utilizando uma faixa de temperatura de 30 a 600°C . Para a análise de TG foi utilizado cadinho de platina, massa da amostra de 6,31 mg, taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de N_2 e faixa de temperatura de 30 a 900°C (FARIA *et al.*, 2002; GUILLEN *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2004; SCHNITZLER *et al.*, 2001).

8.2.10. Controle microbiológico (BRASIL, 1999; USP, 2008; PINTO *et al.*, 2003)

A realização do controle microbiológico para produtos não estéreis visa à determinação do número total de micro-organismos presentes na amostra, e a identificação de patógenos como *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não devem estar presentes (BRASIL, 1999; USP 31, 2008; PINTO *et al.*, 2003).

Para a contagem de micro-organismos totais presentes no fitocosmético, foi pesado 1 g da amostra e diluído em 9 ml de solução tampão fosfato pH 7,2. Foi pipetado 1 ml desta amostra diluída e adicionado em 20 ml de ágar tioglicolato para bactérias e Sabouraud para leveduras em placas de Petri, incubadas posteriormente em estufa a 35°C por 24 horas e 25°C por 7 dias, para a pesquisa de bactérias e fungos, respectivamente. Após este período, foi realizada a contagem para a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC/g).

Foi pesado 1 g do fitocosmético e diluído em 9 ml de caldo lactosado, para a pesquisa de *Salmonella* sp e *E. coli*, incubados a 35°C durante 24 a 48 horas. Após este período, 1 ml do caldo lactosado foi transferido para 2 tubos de ensaio contendo caldo tetrationato e caldo

selenito cistina, que foram incubados a 35° C por 24 horas. Após este período, a diluição foi semeada nos caldos tetracionato e selenito cistina, com o auxílio da alça de Drigalski, para tubos contendo ágar verde brilhante e placas de Petri contendo ágar xilose-lisina-desoxicolato e ágar bismuto sulfito. As placas e tubos foram incubados a 35° C por 24 horas.

Para a pesquisa de *Escherichia coli*, 1 ml do caldo lactosado foi transferido para placa contendo 20 ml de ágar Mac Conkey e incubados a 35° C por 24 horas. Para identificar a presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* no fitocosmético, foi pesado 1 g da amostra e diluído em 9 ml de caldo peptonado em tubos de ensaio. Os tubos foram incubados a 35° C por 24 a 48 horas. Após a incubação, a diluição foi semeada dos tubos utilizando a alça de Drigalski, para placas contendo 20 ml de ágar Vogel Johnson e placas contendo ágar cetrimida, para a pesquisa de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, respectivamente. As placas foram incubadas a 35° C por 24 horas. As características das colônias foram observadas após o período de incubação (F. Bras IV, 1988; CARTURAN, 1999; PINTO *et al.*, 2003; USP 31, 2008).

8.2.12. Análise estatística

Foi realizada utilizando a análise de variância (ANOVA) no programa Microsoft Excel, versão 2000.

9. RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1. Desenvolvimento do fitocosmético

9.1.1. Desenvolvimento da emulsão base

As formulações F1, F2 e F3 apresentaram separação de fases 24 horas após o preparo. Por esse motivo, foi desenvolvida uma nova formulação (F4) com quantidade inferior de agentes emolientes e foram adicionados à formulação Xanthan gum (goma xantana) e dispersão a 2% de Carbomer (polímero carboxivinílico), pois são considerados excelentes espessantes hidrofílicos, que podem ser empregados no preparo de emulsões de fase externa aquosa (O/A), uma vez que contribuem para o aumento da viscosidade do sistema e, portanto, proporcionam a estabilidade da emulsão. Estes espessantes melhoram as características

reológicas das formulações e a Xanthan gum (goma xantana) confere um sensorial sedoso ou toque aveludado em contato com a pele (CORRÊA, 2009).

Devido à alta estabilidade que os agentes espessantes podem promover às emulsões O/A, as concentrações dos agentes emolientes e emulsionantes derivados do karité foram diminuídas, tornando a emulsão com menor teor de oleosidade, proporcionando um toque seco quando aplicada à pele.

A emulsão F4 apresentou aspecto uniforme, inodora, coloração branca e com brilho, sendo escolhida para a realização dos testes posteriores.

9.1.2. Teste de centrifugação

A emulsão F4, após ser submetida à centrifugação por três ciclos de 3000 rpm durante 30 minutos em cada ciclo, não apresentou instabilidade, caracterizada pela separação das fases, mesmo após 24 horas da preparação e, por isso, foi escolhida para o desenvolvimento deste trabalho.

9.1.3. Determinação do tipo de emulsão

De acordo com os ensaios de coloração e de diluição, foi determinado que a emulsão é do tipo O/A, pois a emulsão solubilizou-se totalmente em contato com água. Em relação ao teste de coloração, a emulsão corou homogeneamente com o corante hidrofílico e não apresentou uniformidade de coloração em contato com o corante lipofílico, comprovando que a fase externa é aquosa. As fotomicrografias da emulsão em contato com corante hidrofílico (amarelo) e lipofílico (marrom) estão demonstradas na Figura 15.

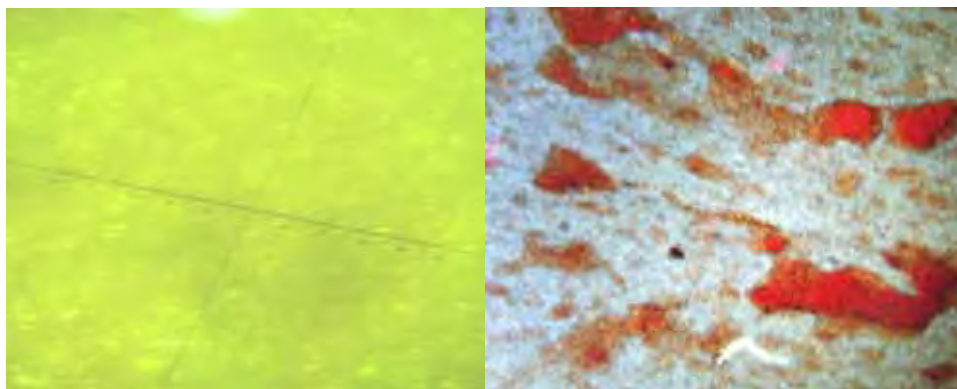


Figura 15. Fotomicrografias da emulsão base em contato com o corante hidrofílico amarelo à esquerda (aumento 10x) e corante lipofílico marrom à direita (aumento 40x)

9.2. Teste de estabilidade

O teste de estabilidade foi realizado para a formulação F4, que não apresentou separação de fases durante o teste de centrifugação.

9.2.1. Teste de estabilidade preliminar da formulação F4 (BRASIL, 2004; CEFALI *et al.*, 2009a)

A qualificação de uma nova formulação como estável depende da manutenção de características, que são avaliadas periodicamente, durante o estudo da estabilidade preliminar, realizando os ensaios de avaliação macroscópica e determinação dos valores de pH, densidade e viscosidade.

9.2.1.1. Avaliação macroscópica

Nenhuma alteração foi observada quanto ao aspecto, odor e cor na formulação F4 submetida a todas as condições de estresse, durante 15 dias de análise.

9.2.1.2. Determinação do valor de pH

A Figura 16 apresenta o gráfico construído com os valores de pH da formulação F4 durante 15 dias. A estabilidade pode ser confirmada na Tabela 16, que mostra os valores dos desvios padrão e variância das médias de pH.

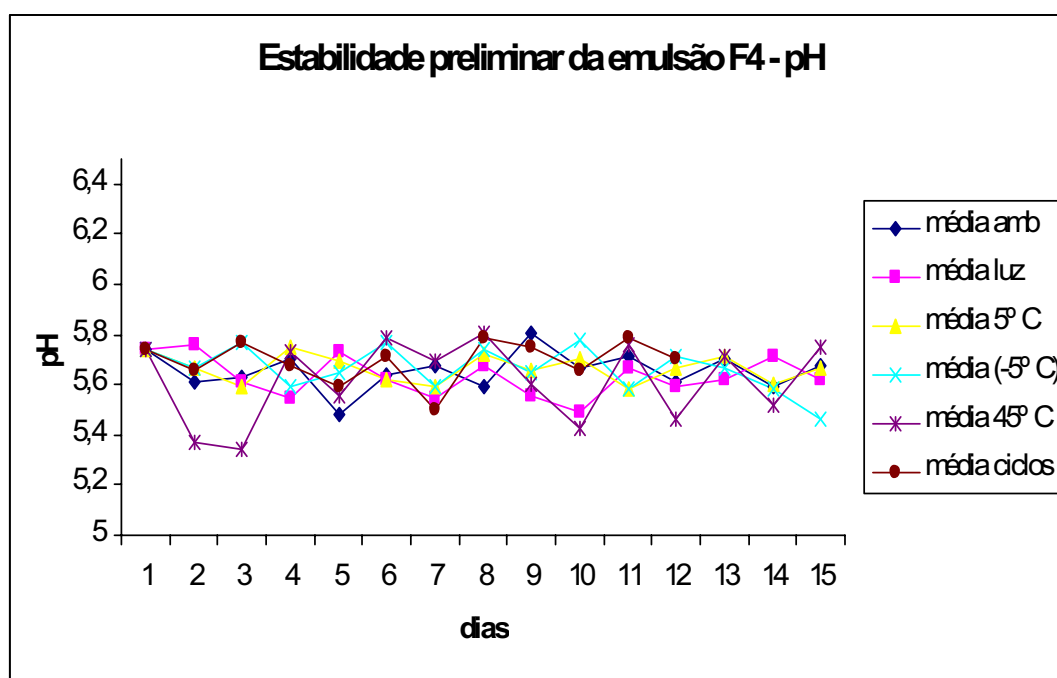


Figura 16. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que a formulação F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar

Tabela 16. Valores de pH da emulsão F4, durante a estabilidade preliminar

Dia	Ambiente	Luz				Ciclos*	DP	VAR
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*			
1	5,74	5,74	5,74	5,74	5,74	5,74	0,000	0,000
2	5,61	5,76	5,67	5,67	5,37	5,66	0,377	0,142
3	5,63	5,61	5,59	5,77	5,34	5,77	0,292	0,086
4	5,70	5,55	5,75	5,59	5,73	5,68	0,324	0,105
5	5,48	5,73	5,69	5,65	5,56	5,59	0,345	0,119
6	5,64	5,62	5,62	5,77	5,79	5,71	0,174	0,030
7	5,68	5,55	5,59	5,59	5,69	5,50	0,228	0,052
8	5,59	5,68	5,72	5,74	5,81	5,79	0,252	0,064
9	5,81	5,56	5,66	5,65	5,6	5,75	0,215	0,046
10	5,67	5,49	5,7	5,78	5,43	5,66	0,659	0,434
11	5,71	5,67	5,58	5,58	5,76	5,79	0,274	0,075
12	5,61	5,59	5,67	5,71	5,46	5,7	0,248	0,062
13	5,70	5,62	5,71	5,67	5,71	-	0,297	0,088
14	5,59	5,71	5,60	5,58	5,52	-	0,243	0,059
15	5,68	5,62	5,67	5,46	5,75	-	0,376	0,141
DP	0,486	0,441	0,430	0,439	0,362	0,468		
VAR	0,236	0,194	0,185	0,193	0,131	0,219		

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

A formulação F4 apresentou valor médio de pH de 5,64, sendo assim compatível ao pH cutâneo (5,5 – 6,5). Todas as condições apresentaram desvios padrão inferiores a 0,70 (Tabela 16) nas médias do pH medido diariamente, ou seja, uma variação não significativa, constatando a estabilidade da emulsão quanto a este aspecto (BRASIL, 2004).

9.2.1.3. Determinação da densidade

A manutenção da densidade também é um parâmetro importante que precisa ser avaliado na determinação da estabilidade de uma formulação. A formulação F4 apresentou estabilidade quanto a este fator, que foi demonstrado nos gráficos das médias de densidade

medidas nos dias 1, 7 e 15 (Figura 17), e pela pequena variação destes valores entre os dias de análise, observados na Tabela 17.

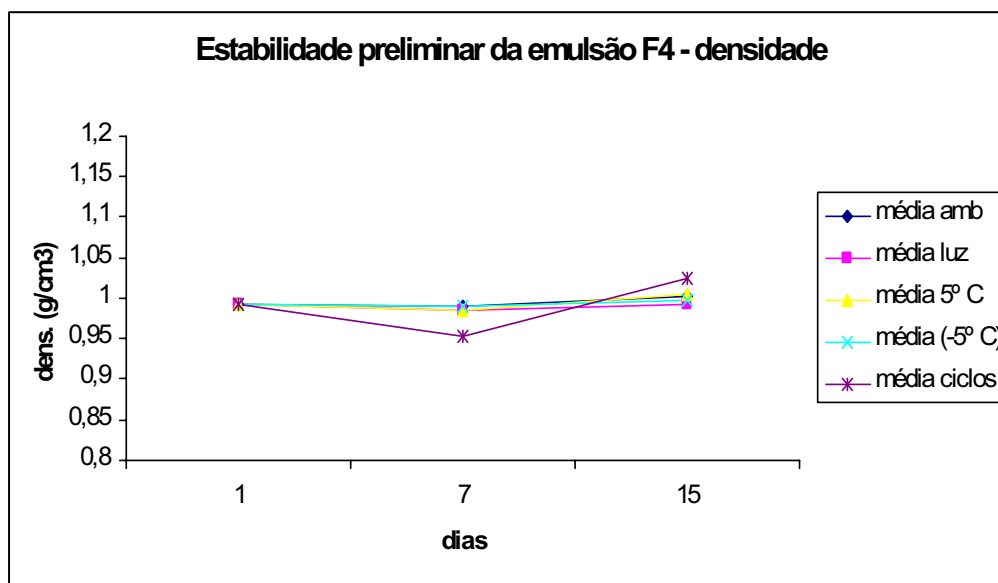


Figura 17. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que a formulação F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar

Tabela 17. Valores de densidade (g/cm^3) da emulsão F4, durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente		Luz			Ciclos*	DP	VAR
	($27 \pm 2^\circ \text{C}$)*	indireta*	($5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($45 \pm 2^\circ \text{C}$)*			
1	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,993	0,000	0,000
7	0,989	0,985	0,984	0,990	0,988	0,954	0,014	0,0001
15	1,003	0,993	1,006	0,997	0,993	1,024	0,012	0,0002
DP	0,007	0,004	0,011	0,004	0,002	0,035		
VAR	0,0002	0,0001	0,0002	0,0001	0,0001	0,0002		

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

A formulação F4 apresentou valor de densidade próximo a $0,990 \text{ g/cm}^3$ e a variância entre os valores apresentados foi menor que 10%, considerando que não houve variação significativa entre os valores de densidade determinados, o que mostra a estabilidade da emulsão, diante das condições de estresse em que foi submetida durante os 15 dias de análise.

9.2.1.4. Determinação da viscosidade

A viscosidade é um dos parâmetros físico-químicos avaliados durante o teste de estabilidade de produtos cosméticos que compreende o estudo das propriedades de escoamento de um fluido (BRASIL, 2004; BRASEQ, 2009).

Foram determinados os valores de viscosidade da emulsão F4 durante 15 dias, quando submetido às seis condições de estresse: à temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$), exposição à luz indireta, a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$, a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ e ao ciclo de congelamento e descongelamento.

Os valores de viscosidade da emulsão (Figura 18 e Tabela 18) aumentaram quando a emulsão foi exposta a $45 \pm 2^\circ \text{C}$, mas este aumento não foi significativo, apresentando um desvio padrão igual a 5,69%. O mesmo foi observado com a emulsão submetida ao ciclo de congelamento e descongelamento, pois com o aumento da temperatura ocorreu a evaporação da água, provocando o aumento da viscosidade.

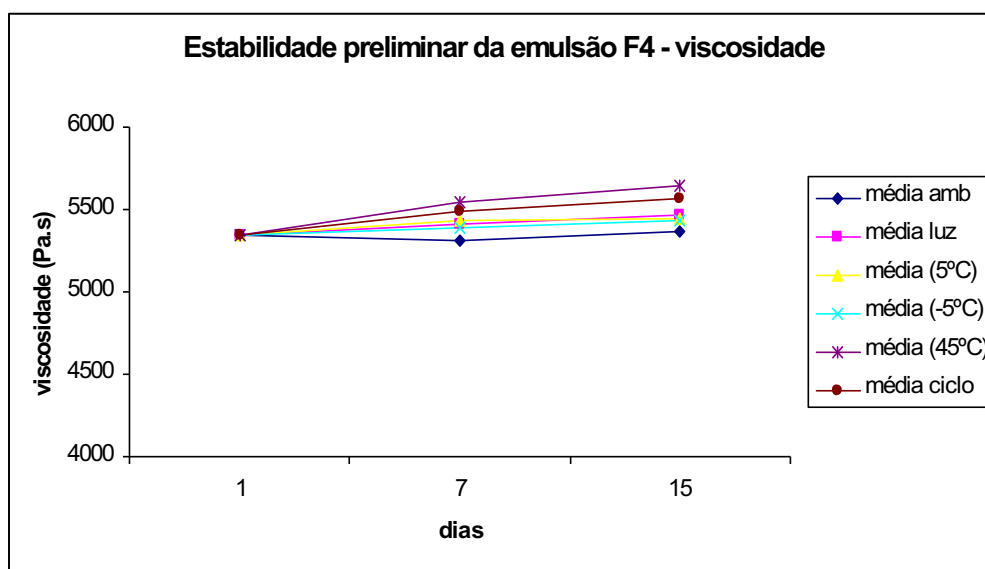


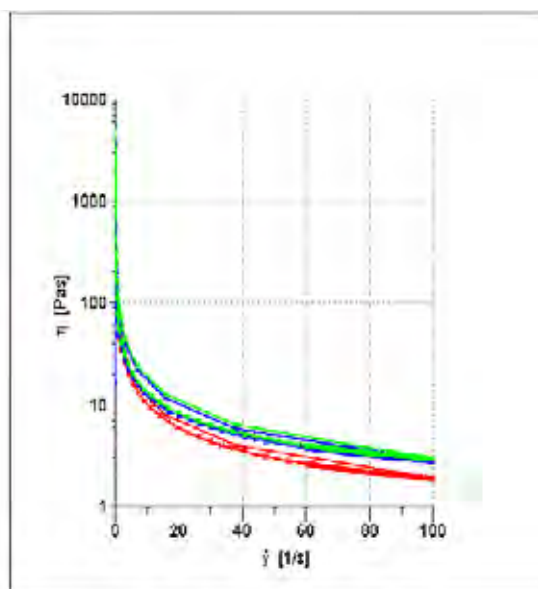
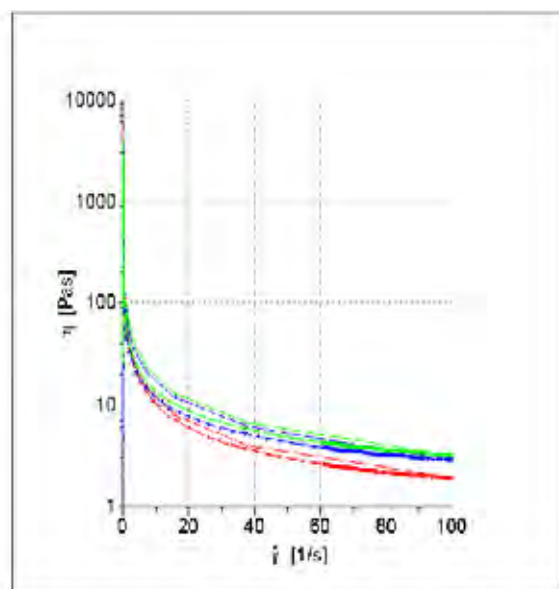
Figura 18. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que a emulsão F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar

Tabela 18. Valores de viscosidade (Pa.s) da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				Ciclos*
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*	
1	5341,0	5341,0	5341,0	5341,0	5341,0	5341,0
7	5316,5	5413,0	5428,0	5385,5	5545,0	5489,0
15	5367,0	5463,3	5448,0	5437,5	5645,0	5567,3

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

A viscosidade determinada neste estudo pode ser denominada como viscosidade aparente máxima, pois os valores de viscosidade apresentados foram obtidos quando a emulsão foi submetida à menor taxa de cisalhamento ($0,005 \pm 5$ 1/s), ou seja, à menor deformação, com o objetivo de determinar a viscosidade da emulsão próxima ao repouso. Por apresentar comportamento não-Newtoniano, a emulsão analisada apresenta diminuição do valor de viscosidade com o aumento da tensão aplicada, como pode ser observado nas Figuras 19 a 24. Nas figuras pode ser observado que a viscosidade da emulsão F4, representada pela cor vermelha no primeiro dia de análise, diminuiu depois de 7 dias, representada pela cor azul e, 14 dias de análise, representada pela cor verde.

**Figura 19.** Reograma das viscosidades da**Figura 20.** Reograma das viscosidades da

formulação F4 na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde). indireta nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).

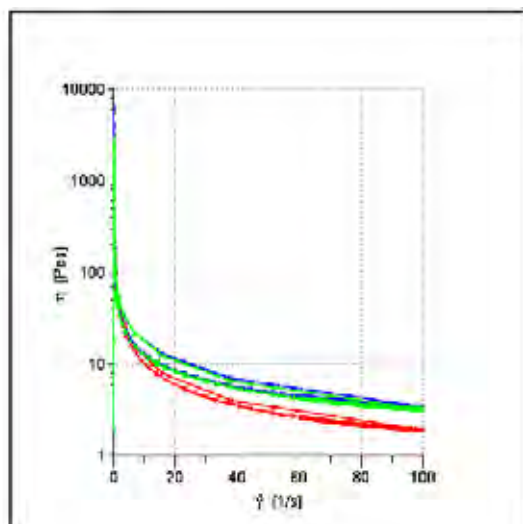


Figura 21. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).

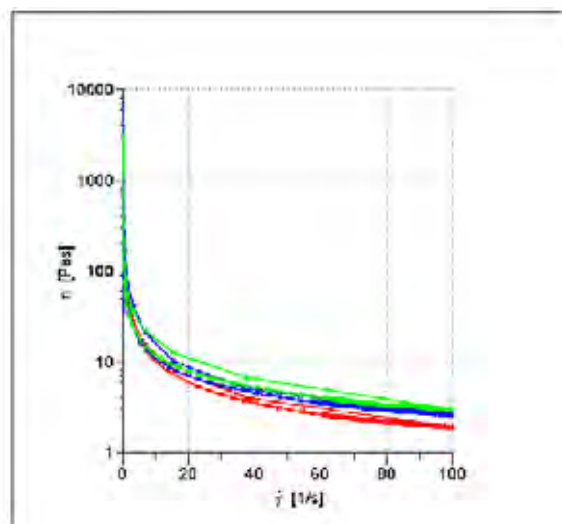


Figura 22. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).

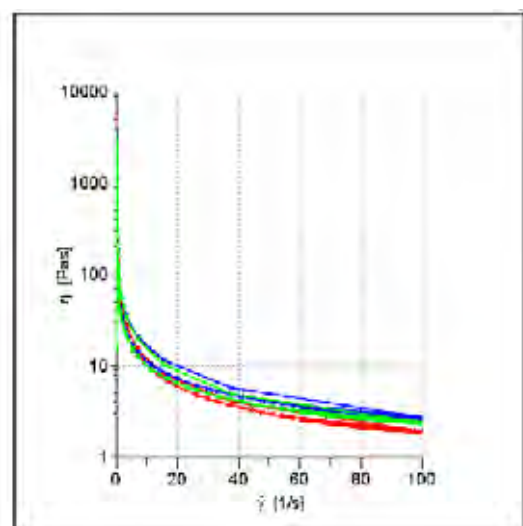


Figura 23. Reograma das viscosidades da formulação F4 mantida a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).

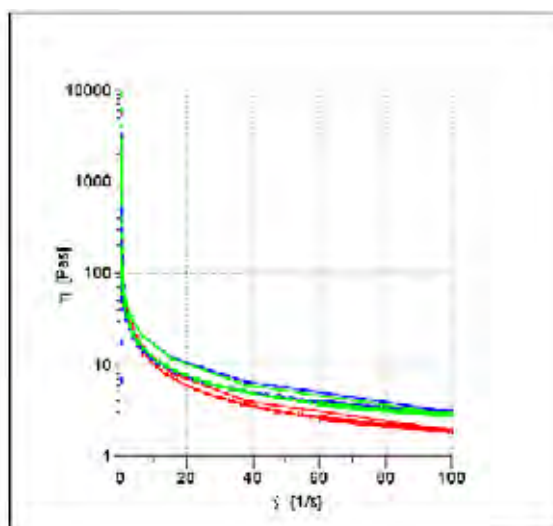


Figura 24. Reograma das viscosidades da formulação F4 submetida a ciclos de congelamento/descongelamento nos dias 1(vermelho), 7 (azul) e 15 (verde).

Os valores de índice de consistência (K_H) e índice de comportamento de fluxo (n_H) mostrados nas Tabelas 19 e 20 foram obtidos a partir da Equação V representada pelo modelo reológico de Herschel-Bulkley adequado ao sistema estudado, apresentando coeficiente de correlação igual a 0,99.

$$\text{Equação V: } \sigma = \sigma_0 + K_H \dot{\gamma}^{n_H}$$

Em que: σ = tensão de cisalhamento aplicada

σ_0 : = limite de escoamento do material

K_H = índice de consistência

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

n_H = índice de comportamento de fluxo

Foi observado que o índice de consistência da emulsão aumentou após ter sido submetida às condições de estresse e durante os dias de análise (Figura 25 e Tabela 19), provocando o acréscimo da viscosidade, sendo mais acentuado nas condições de estresse a 45° C e ao ciclo de congelamento e descongelamento.

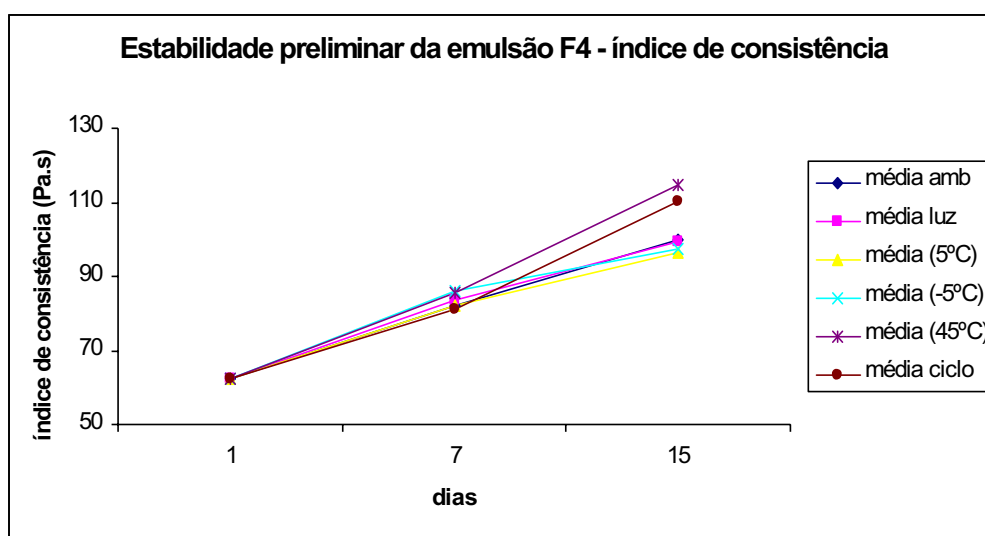


Figura 25. Gráfico das médias dos valores dos índices de consistência nas condições em que a emulsão F4 foi analisada durante a estabilidade preliminar

Tabela 19. Valores do índice de consistência (Pa.s) da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*	Ciclos*
1	62,28	62,28	62,28	62,28	62,28	62,28
7	81,94	83,50	82,09	86,26	85,71	81,09
15	99,70	99,29	96,25	97,64	114,50	110,40

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Um estudo realizado por CABRAL *et al.* (2002) detectou que os índices de consistência da amostra de polpa de cupuaçu peneirada decresceram quando submetida ao aumento de temperatura, e a viscosidade diminuiu, confirmando a pseudoplasticidade da polpa.

PIANOVSKI *et al.* (2008) observou que o índice de consistência, calculado a partir do modelo reológico de Herschel-Bulkley para a emulsão cosmética contendo óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) não apresentou diferença significativa depois de submetida a ensaios de estabilidade acelerada. Os valores de viscosidade desta amostra, da mesma maneira, não apresentaram diferença significativa durante o tempo de estudo da estabilidade acelerada, em um estudo realizado por FERRARI no ano de 2002.

Desta forma, os estudos confirmam a relação entre viscosidade e índice de consistência, apresentando uma proporção direta entre estes parâmetros.

O índice de comportamento de fluxo é obtido da inclinação da curva de log da tensão de cisalhamento em relação ao log da taxa de cisalhamento e indica o quanto o produto se afasta do perfil Newtoniano. Quando este parâmetro é igual a 1, a amostra apresenta comportamento Newtoniano. Se o resultado é menor que 1, a amostra é classificada como pseudoplástica e acima de 1, como dilatante (CABRAL, *et al.*, 2002; GUARATINI *et al.*, 2006; FERRARI, 2002; MARTIN, 1993; PIANOVSKI *et al.*, 2008).

É possível observar na Tabela 20 que o índice de comportamento de fluxo da emulsão F4 em todas as condições de estresse em que foi submetida, apresentou valores menores que 1, possibilitando classificar o comportamento da amostra como não-Newtoniano e pseudoplástico.

Tabela 20. Valores do índice de comportamento de fluxo da emulsão F4 durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				Ciclos*
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*	
1	0,253	0,253	0,253	0,253	0,253	0,253
7	0,236	0,245	0,319	0,270	0,268	0,298
15	0,223	0,242	0,275	0,274	0,227	0,251

* Média de três medidas. Desvio padrão menor que 5%

SILVA (2000) e CABRAL *et al.* (2002) observaram em seus estudos com suco de acerola e polpa de cupuaçu peneirada, respectivamente, que os valores do índice de comportamento de fluxo aumentaram com a elevação da temperatura e consequente diminuição da viscosidade das amostras, o que poderia ser interpretado como uma relação proporcional e indireta entre índice de comportamento de fluxo e viscosidade. Porém, estes resultados não foram semelhantes aos apresentados por CORREA *et al* (2005), RODRIGUES *et al* (2003) e PIANOVSKI *et al* (2008) que obtiveram valores de índice de comportamento de fluxo não proporcionais aos da viscosidade das amostras.

Desta forma, os resultados obtidos neste trabalho não corroboram com as pesquisas realizadas por SILVA (2000) e CABRAL *et al.* (2002), sugerindo a novas investigações.

9.3. Preparo do fitocosmético

Para a preparação do fitocosmético, foi colocado em um gral de vidro, 0,1% de extrato do tomate salada contendo licopeno, pois nesta concentração o licopeno foi capaz de ficar retido na epiderme e na derme e apresentou atividade antioxidante, de acordo, respectivamente, com os ensaios realizados no teste de permeação *in vitro* encontrados no item 16.2 e atividade antioxidante *in vitro* encontrados no item 16.3 do Capítulo 3 deste trabalho. Ao gral, foi adicionada a emulsão base F4 sob a forma de diluição geométrica, em quantidade suficiente para o desenvolvimento do trabalho em um único lote. O processo foi realizado lentamente e com cuidado para evitar a perda de extrato. A formulação final apresentou coloração amarelada, devido à presença do extrato (Figura 26), aspecto uniforme, inodora e com brilho.



Figura 26. Fitocosmético contendo licopeno obtido do tomate salada

9.4. Teste de estabilidade

9.4.1. Teste de estabilidade preliminar do fitocosmético

O teste de estabilidade preliminar realizado durante 15 dias seguidos de análise no fitocosmético compreendeu os ensaios de avaliação macroscópica e determinação dos valores de pH, densidade e viscosidade da amostra, após envase do fitocosmético em recipientes de vidro (BRASIL, 2004).

9.4.1.1. Avaliação macroscópica

Nenhuma alteração no odor e no aspecto do fitocosmético foi observada durante o teste de estabilidade preliminar. Quanto à coloração, sofreu escurecimento quando a emulsão foi submetida à estufa, à luz e ao ciclo de congelamento e descongelamento. Nesta última condição, a alteração da cor pode ter ocorrido pela amplitude do intervalo da temperatura, de – 5° C para 45° C.

9.4.1.2. Determinação do valor de pH

Foram observadas na Figura 27 que o fitocosmético manteve-se estável em relação ao pH, que apresentou um valor médio de 5,85, sendo compatível com o pH cutâneo. A estabilidade pode ser confirmada na Tabela 21, onde estão os valores dos desvios padrão e variância das médias dos valores de pH obtidos.

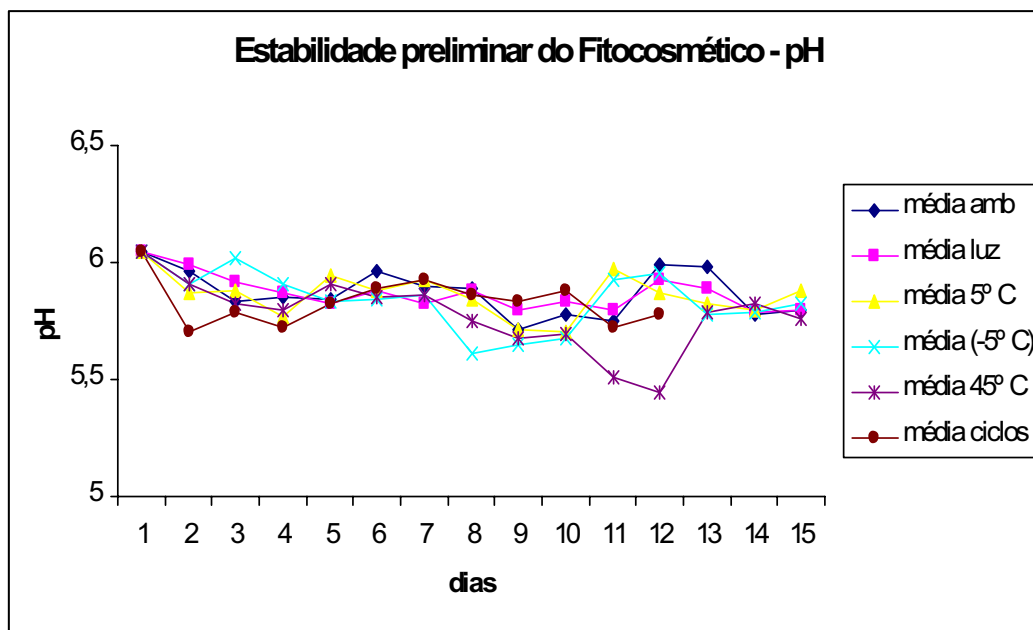


Figura 27. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade preliminar

Tabela 21. Valores de pH do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Dia	Ambiente	Luz					DP	VAR
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2 °C)*	(-5 ± 2°C)*	(45± 2°C)*	Ciclos*		
1	6,05	6,05	6,05	6,05	6,05	6,05	0	0
2	5,96	5,99	5,87	5,91	5,91	5,70	0,101	0,0103
3	5,83	5,92	5,88	6,02	5,82	5,79	0,084	0,0071
4	5,85	5,87	5,77	5,91	5,80	5,72	0,071	0,0050
5	5,84	5,82	5,94	5,83	5,91	5,82	0,050	0,0025
6	5,96	5,88	5,88	5,84	5,85	5,89	0,041	0,0017
7	5,90	5,82	5,93	5,86	5,86	5,93	0,043	0,0019
8	5,89	5,88	5,84	5,61	5,75	5,86	0,106	0,0113
9	5,71	5,80	5,71	5,65	5,68	5,83	0,070	0,0049
10	5,78	5,83	5,70	5,68	5,69	5,88	0,082	0,0068
11	5,75	5,80	5,97	5,93	5,51	5,72	0,167	0,0280
12	5,99	5,93	5,87	5,95	5,44	5,78	0,204	0,0420
13	5,98	5,89	5,82	5,78	5,79	-	0,083	0,0069
14	5,78	5,79	5,80	5,79	5,82	-	0,014	0,0002
15	5,80	5,80	5,88	5,82	5,76	-	0,045	0,0020
DP	0,1003	0,0761	0,0940	0,1271	0,1543	0,1003		
VAR	0,01006	0,0058	0,0088	0,0161	0,0238	0,0100		

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

O fitocosmético, em todas as condições, apresentou, nos valores de pH determinados, desvio padrão inferior a 0,21 (Tabela 21) para as médias dos valores obtidos diariamente, o que representa uma variação muito pequena (inferior a 0,02), provando a estabilidade da formulação quanto a este aspecto.

Foi possível observar que o extrato contendo licopeno, quando incorporado à emulsão base, não alterou significativamente o valor de pH (Figura 27 e Tabela 21) apresentado pela formulação base (F4), ou seja, não houve uma variação maior que 10% entre os valores apresentados pela emulsão base e pelo fitocosmético.

9.4.1.3. Determinação da densidade

A manutenção da densidade também é um parâmetro importante que precisa ser avaliado na determinação da estabilidade de uma formulação. O fitocosmético apresentou estabilidade quanto à densidade ($1,0037 \text{ g/cm}^3$), que foi demonstrada no gráfico das médias de densidade determinadas periodicamente (Figura 28), e pela pequena variação destes valores entre os dias de análise, observados na Tabela 22.

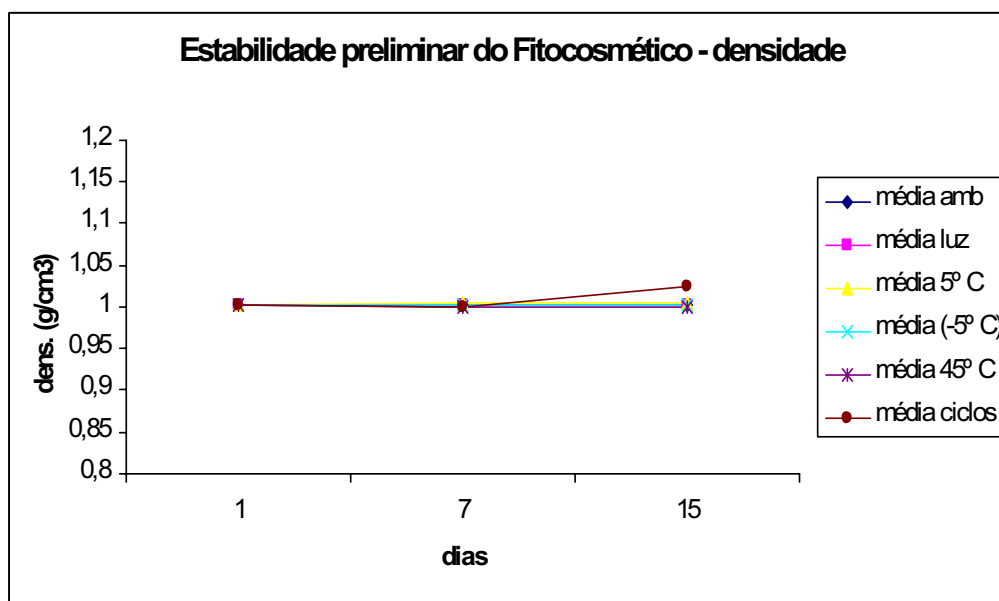


Figura 28. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade preliminar

Tabela 22. Valores de densidade (g/cm^3) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente		Luz			Ciclos*	DP	VAR
	($27 \pm 2^\circ \text{C}$)*	indireta*	($5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($45 \pm 2^\circ \text{C}$)*			
1	1,0029	1,0029	1,0029	1,0029	1,0029	1,0029	0	0
7	1,0025	1,0017	1,0051	1,0017	1,0008	1,0012	0,0015	2×10^{-6}
15	1,0017	1,0025	1,0061	1,0015	0,9995	1,0240	0,0091	8×10^{-5}
DP	0,0006	0,0006	0,0015	0,0007	0,0017	0,0126		
VAR	$4,2 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-6}$	$6,2 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-6}$	0,00016		

* Média de três valores. Desvio padrão menor que 5%

Da mesma maneira que nos valores de pH, a incorporação do extrato contendo licopeno não alterou o valor da densidade da emulsão significativamente (variação maior que 10%), sendo possível observar que a emulsão permaneceu estável quanto a este parâmetro.

9.4.1.4. Determinação da viscosidade

A viscosidade é um dos parâmetros físico-químicos avaliados durante o teste de estabilidade de produtos cosméticos que compreende o estudo das propriedades de escoamento de um fluido (BRASIL, 2004; BRASEQ, 2009).

Foram determinados os valores de viscosidade do fitocosmético durante 15 dias, quando submetido às seis condições de estresse: à temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$), exposição à luz indireta, a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$, a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ e ao ciclo de congelamento e descongelamento (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008a).

Foi observado que os valores de viscosidade do fitocosmético (Tabela 23 e Figura 29) aumentaram significativamente quando exposto a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ (desvio padrão de 20,44%) e ao ciclo de congelamento e descongelamento (desvio padrão 15,47%), supondo que com o aumento da temperatura, tenha ocorrido a evaporação da água, provocando o aumento da viscosidade. Deste modo, o fitocosmético não deve ser armazenado em locais com temperatura elevada.

Tabela 23. Valores de viscosidade (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				
	($27 \pm 2^\circ \text{C}$)*	indireta*	($5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($45 \pm 2^\circ \text{C}$)*	Ciclos*
1	5394,3	5394,3	5394,3	5394,3	5394,3	5394,3
7	5776,0	5853,0	5691,0	5766,0	6781,0	6273,0
15	5232,0	5758,0	5164,0	5832,0	6647,6	6382,0

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

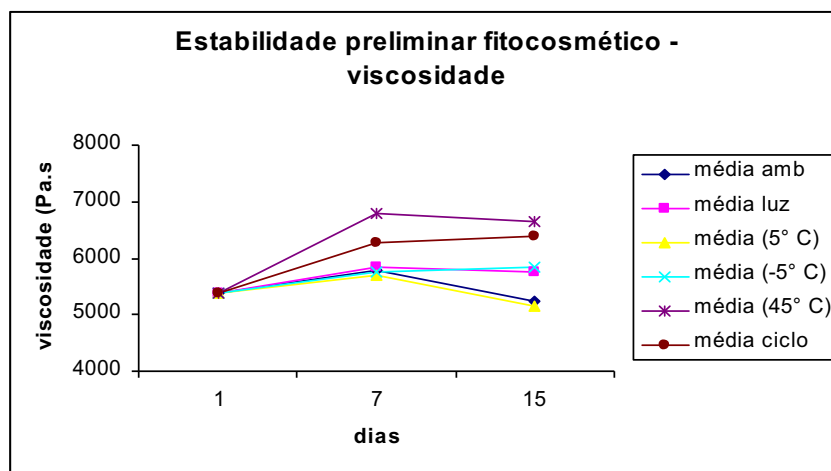


Figura 29. Gráfico das médias dos valores de viscosidade do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Os valores de viscosidade apresentados foram obtidos quando o fitocosmético foi submetido à menor taxa de cisalhamento ($0,005 \pm 5$ 1/s), com o objetivo de determinar a viscosidade da emulsão próxima ao repouso. Por apresentar comportamento não-Newtoniano, o fitocosmético apresenta diminuição do valor de viscosidade com o aumento da tensão aplicada, como pode ser observado nas Figuras 30 a 35. Nas figuras pode ser observado que a viscosidade do fitocosmético, representada pela cor vermelha no primeiro dia de análise, diminuiu depois de 7 dias, representada pela cor azul e, 15 dias de análise, representada pela cor verde, em todas as condições de estresse.

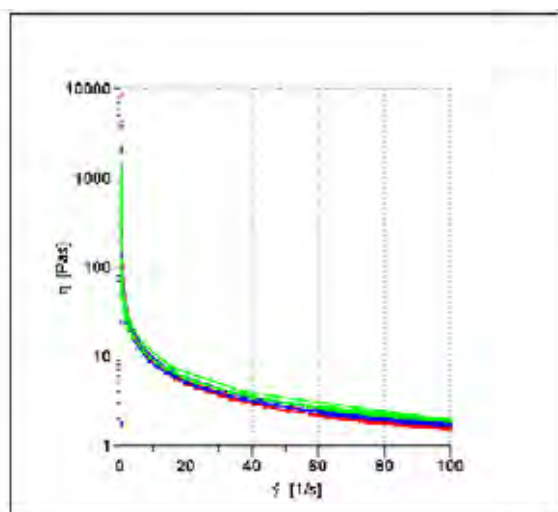


Figura 30. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

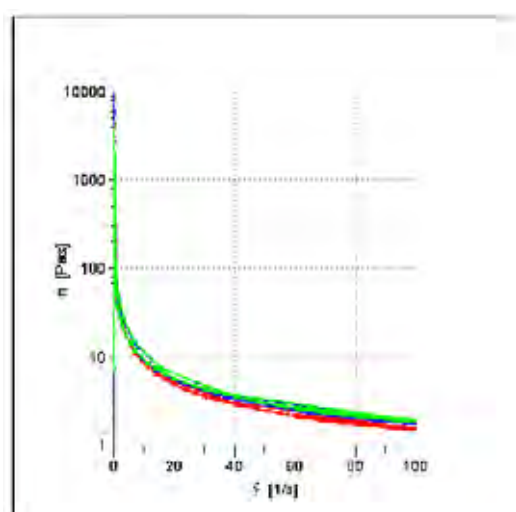


Figura 31. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição de exposição à luz indireta nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

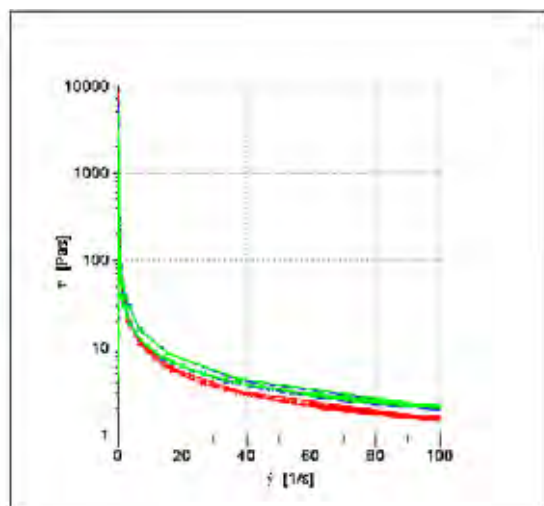


Figura 32. Reograma das viscosidades do fitocsmético mantido a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

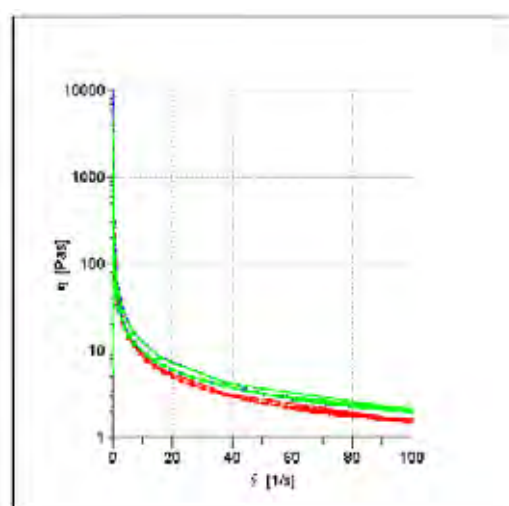


Figura 33. Reograma das viscosidades do fitocsmético mantido a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

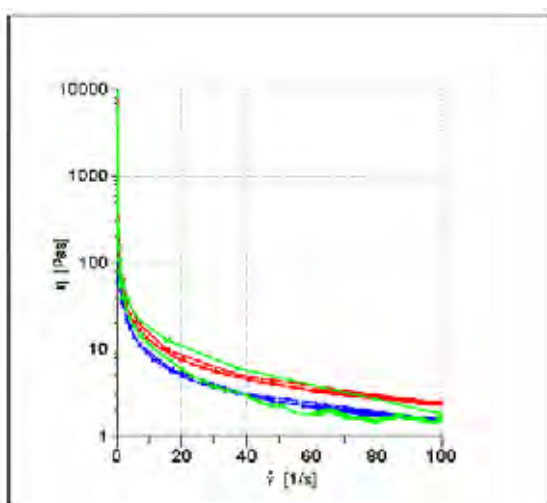


Figura 34. Reograma das viscosidades do fitocsmético mantido a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

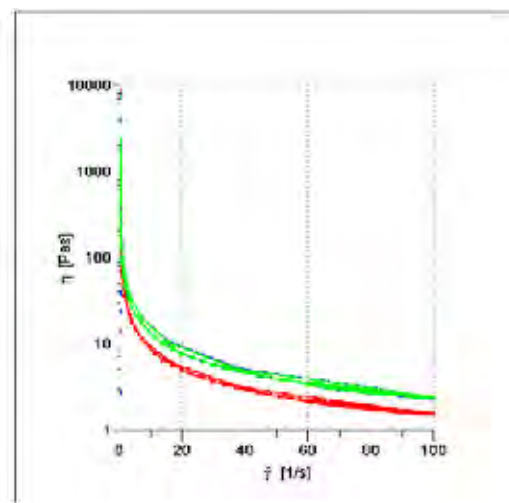


Figura 35. Reograma das viscosidades do fitocsmético submetido a ciclos de congelamento/descongelamento nos dias 1 (azul), 7 (vermelho) e 15 (verde).

Os valores de índice de consistência (K_H) e índice de fluxo (n_H) foram obtidos a partir da Equação V representada pela modelo reológico de Herschel-Bulkley, sendo o modelo mais adequado às curvas apresentadas para a determinação da viscosidade, apresentando coeficiente de variação igual a 0,99.

$$\text{Equação V: } \sigma = \sigma_0 + K_H \dot{\gamma}^{n_H}$$

Em que: σ = tensão de cisalhamento aplicada

σ_0 : = limite de escoamento do material

K_H = índice de consistência

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

n_H = índice de comportamento de fluxo

Foi observado que o índice de consistência da emulsão aumentou quando submetida às condições de estresse e durante os dias de análise (Figura 36 e Tabela 24), provocando o aumento da viscosidade, sendo mais acentuado quando submetida a $45 \pm 2^\circ \text{C}$.

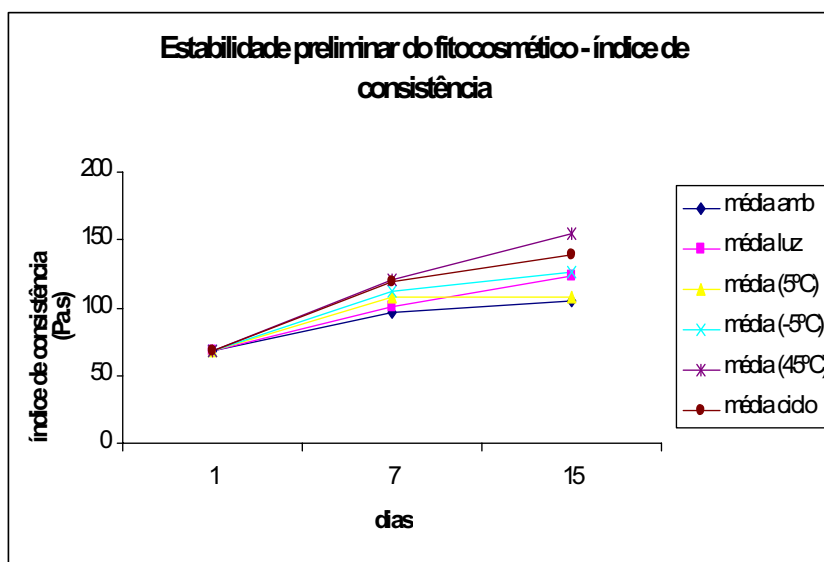


Figura 36. Gráficos dos valores dos índices de consistência do fitocosmético durante o estudo da estabilidade preliminar

Tabela 24. Valores do índice de consistência (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				Ciclos*
	($27 \pm 2^\circ \text{C}$)*	indireta*	($5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($-5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($45 \pm 2^\circ \text{C}$)*	
1	68,75	68,75	68,75	68,75	68,75	68,75
7	95,75	100,69	107,50	111,80	120,50	119,50
15	104,40	124,10	108,50	126,00	154,40	139,20

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Da mesma maneira que o resultado apresentado pela emulsão F4, o índice de comportamento de fluxo do fitocosmético, quando submetido às condições de estresse durante a estabilidade preliminar, apresentou valores menores que 1 (Tabela 25), classificando a amostra com comportamento não-Newtoniano e pseudoplástico, e as condições de estresse não alterou seu comportamento.

De acordo com os resultados obtidos, é possível constatar que o índice de comportamento de fluxo não está relacionado diretamente à viscosidade e consistência do produto, e sim com o comportamento reológico da amostra.

Tabela 25. Valores do índice de comportamento de fluxo do fitocosmético durante a estabilidade preliminar

Dias	Ambiente	Luz				Ciclos*
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*	
1	0,248	0,248	0,248	0,248	0,248	0,248
7	0,219	0,245	0,241	0,161	0,234	0,226
15	0,168	0,155	0,146	0,157	0,237	0,153

*Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Foi observado através dos resultados obtidos da estabilidade preliminar que a incorporação do extrato contendo licopeno alterou a cor e a viscosidade do fitocosmético quando exposto a temperaturas elevadas. A amostra também sofreu alteração de cor quando exposta à luz indireta. Desta maneira, é importante o armazenamento do fitocosmético na ausência de calor e de luz.

9.4.2. Teste de estabilidade acelerada do fitocosmético

O teste de estabilidade acelerada foi realizado após o teste de estabilidade preliminar e é indicado para avaliar as características do fitocosmético durante 90 dias quando submetido às condições de estresse. Foram avaliados os parâmetros: avaliação macroscópica e determinação dos valores de pH, densidade e viscosidade.

9.4.2.1. Avaliação macroscópica

O aspecto e o odor não foram alterados durante o teste de estabilidade acelerada do fitocosmético estudado, mas como no teste de estabilidade preliminar, o fitocosmético apresentou uma coloração amarela mais intensa quando exposto à temperatura de $45 \pm 2^\circ \text{C}$ e à luz indireta.

9.4.2.2. Determinação do valor do pH

Foram observadas na Figura 37 que os valores de pH do fitocosmético mantiveram-se estável. A estabilidade pode ser melhor confirmada na Tabela 26, onde estão os valores dos desvios padrão e variância das médias de pH.

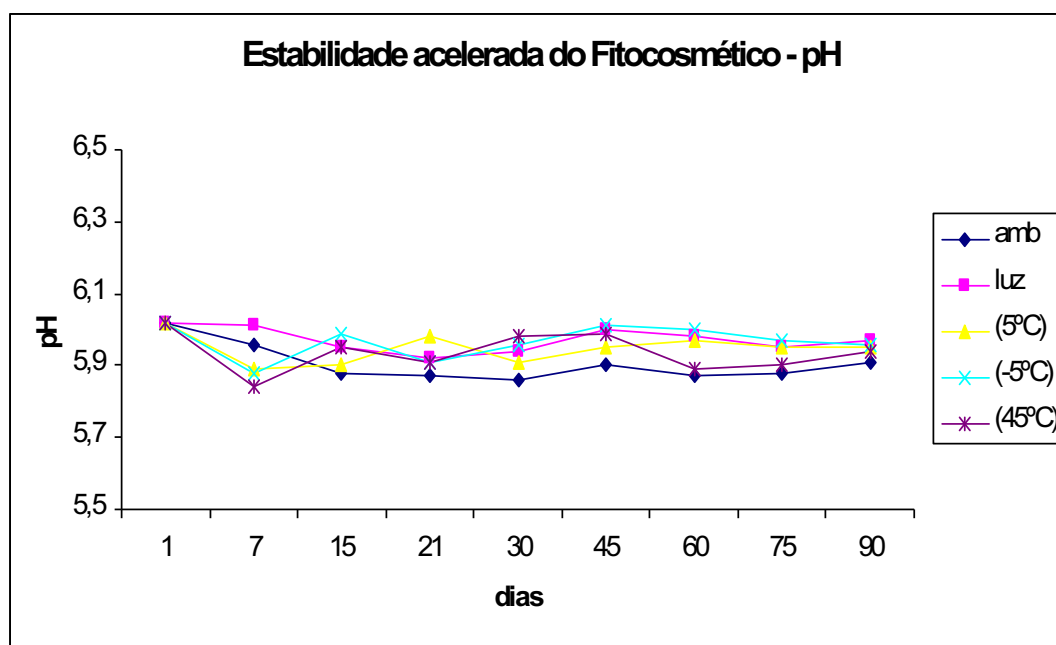


Figura 37. Gráfico das médias dos valores de pH nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada

Tabela 26. Valores de pH do fitocosmético durante a estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz				DP	VAR
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2°C)*	(-5 ± 2°C)*	(45 ± 2°C)*		
1	6,02	6,02	6,02	6,02	6,02	0	0
7	5,96	6,01	5,89	5,88	5,84	0,068	0,004
15	5,88	5,95	5,90	5,99	5,95	0,045	0,0020
21	5,87	5,92	5,98	5,91	5,91	0,038	0,0014
30	5,86	5,94	5,91	5,96	5,98	0,045	0,0020
45	5,90	6,00	5,95	6,01	5,99	0,039	0,0017
60	5,87	5,98	5,97	6,00	5,89	0,038	0,0011
75	5,88	5,95	5,95	5,97	5,90	0,038	0,0014
90	5,91	5,97	5,95	5,96	5,94	0,023	0,0005
DP	0,0523	0,0340	0,0415	0,0463	0,0563		
VAR	0,0027	0,0011	0,0017	0,0021	0,0031		

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Quanto ao pH, o fitocosmético apresentou desvio padrão menor do que 0,10 (Tabela 26) nas médias dos valores de pH medido durante os dias de análise. Pelos resultados apresentados, o fitocosmético apresenta estabilidade, e a presença do extrato não alterou significativamente o valor de pH da formulação.

9.4.2.3. Determinação da densidade

Em relação à densidade, o fitocosmético também apresentou estabilidade, demonstrado na Figura 38 devido à pequena variação dos valores entre os dias de análise, observados na Tabela 27, apresentando também valores de desvio padrão menores que 0,10%.

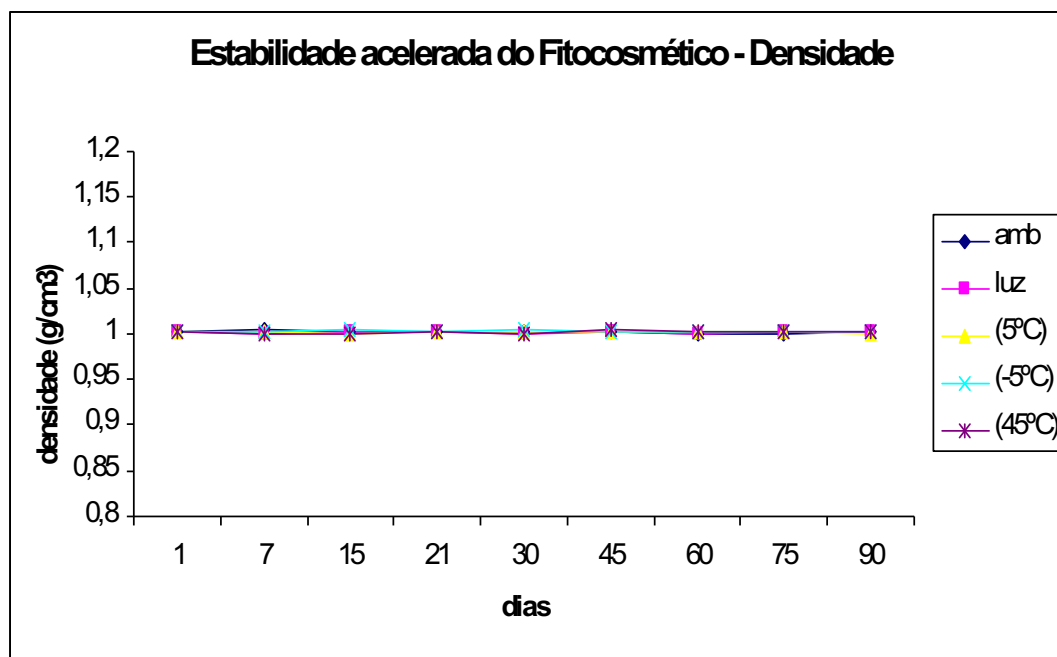


Figura 38. Gráfico das médias dos valores de densidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada

Tabela 27. Valores de densidade (g/cm^3) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada

	Ambiente	Luz					
Dias	($27 \pm 2^\circ \text{C}$)*	indireta*	($5 \pm 2^\circ \text{C}$)*	($-5 \pm 2^\circ$)*	($45 \pm 2^\circ \text{C}$)*	DP	VAR
1	1,003	1,003	1,003	1,003	1,003	0	0
7	1,004	1,001	1,002	1,002	1,001	0,0012	0,00002
15	1,002	1,003	1,001	1,004	1,001	0,0013	0,00001
21	1,002	1,003	1,002	1,003	1,002	0,0005	0,00001
30	1,003	1,001	1,002	1,004	1,001	0,0013	0,00002
45	1,003	1,002	1,003	1,003	1,004	0,0011	0,00001
60	1,001	1,001	1,002	1,003	1,002	0,0008	0,00001
75	1,001	1,003	1,002	1,002	1,003	0,0008	0,00001
90	1,002	1,002	1,001	1,002	1,002	0,0004	0,00001
DP	0,0010	0,0009	0,0007	0,0007	0,0010		
VAR	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001		

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

9.4.2.4. Determinação da viscosidade

Para a determinação dos valores de viscosidade do fitocosmético durante a estabilidade acelerada, a amostra foi submetida às cinco condições de estresse (temperatura ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$), exposição à luz indireta, a $5 \pm 2^\circ \text{C}$, a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$, e a $45 \pm 2^\circ \text{C}$). Os valores de viscosidade do fitocosmético (Figura 39 e Tabela 28) aumentaram significativamente quando exposto a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ (desvio padrão de 28,64%), do mesmo modo que na avaliação da estabilidade preliminar, pois com o aumento da temperatura, ocorre a evaporação da água, o que provoca o aumento da viscosidade.

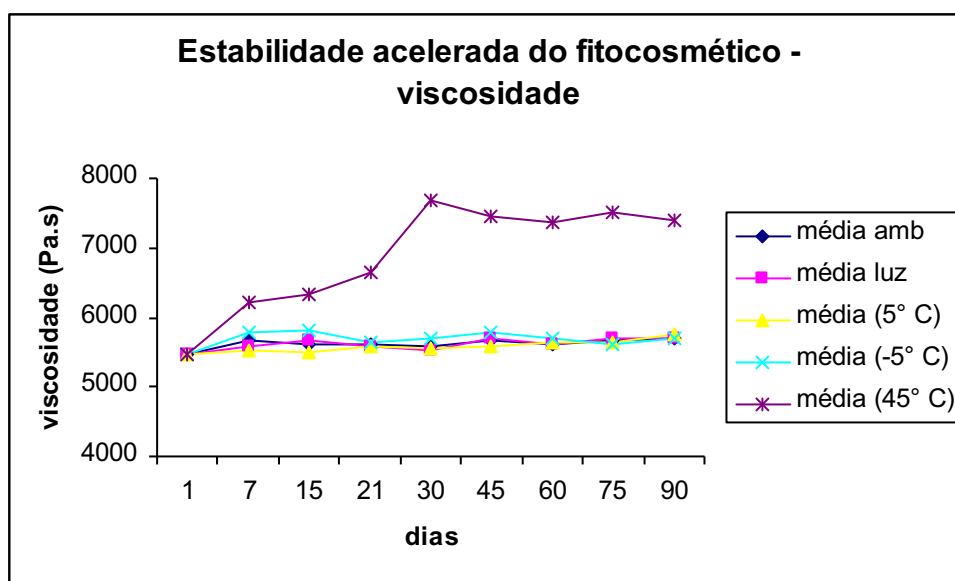


Figura 39. Gráfico das médias dos valores de viscosidade nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada

Tabela 28. Valores de viscosidade (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada

Dias	Ambiente	Luz			
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*
1	5477,0	5477,0	5477,0	5477,0	5477,0
7	5659,0	5576,0	5532,0	5786,0	6226,0
15	5602,0	5673,0	5499,0	5820,0	6332,0
21	5632,0	5582,0	5579,0	5634,0	6647,0
30	5581,0	5529,0	5525,0	5699,0	7676,0
45	5659,0	5687,0	5595,0	5791,0	7454,5
60	5599,0	5613,0	5648,3	5689,0	7356,0
75	5678,0	5706,0	5632,0	5623,5	7497,0
90	5691,0	5711,0	5746,0	5684,0	7396,3

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Os valores de viscosidade apresentados durante a avaliação da estabilidade acelerada, foram obtidos quando o fitocosmético foi submetido à menor taxa de cisalhamento ($0,0052 \pm 5 \text{ 1/s}$), com o objetivo de determinar a viscosidade da emulsão próxima ao repouso. Por apresentar comportamento não-Newtoniano, o fitocosmético apresenta diminuição do valor de viscosidade com o aumento da tensão aplicada, como pode ser observado nas Figuras 40 a 44. É possível observar nas figuras que a viscosidade do fitocosmético, representada pela cor azul no primeiro dia de análise, diminuiu depois dos dias de análise representados pelas cores vermelha (7 dias), azul claro (15 dias), verde (21 dias), lilás (30 dias), rosa (45 dias), amarelo (60 dias), marrom (75 dias) e cinza (90 dias) em todas as condições de estresse.

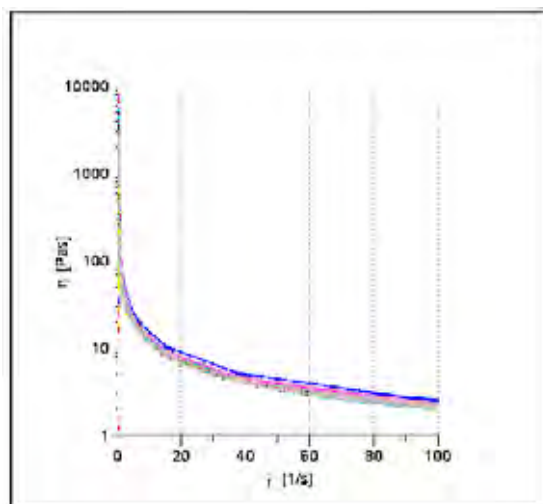


Figura 40. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição ambiente ($27 \pm 2^\circ \text{C}$) nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza)

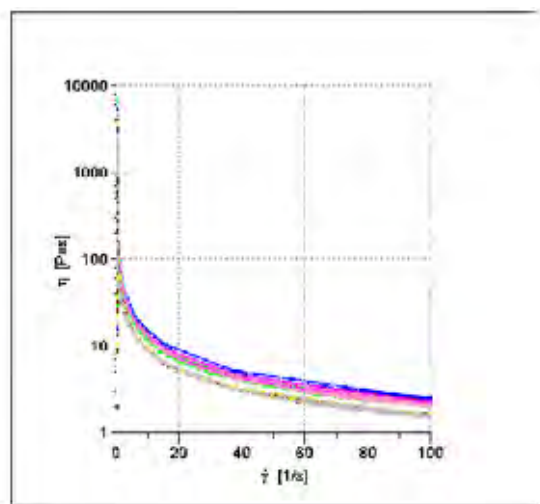


Figura 41. Reograma das viscosidades do fitocosmético na condição de exposição à luz indireta nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza)

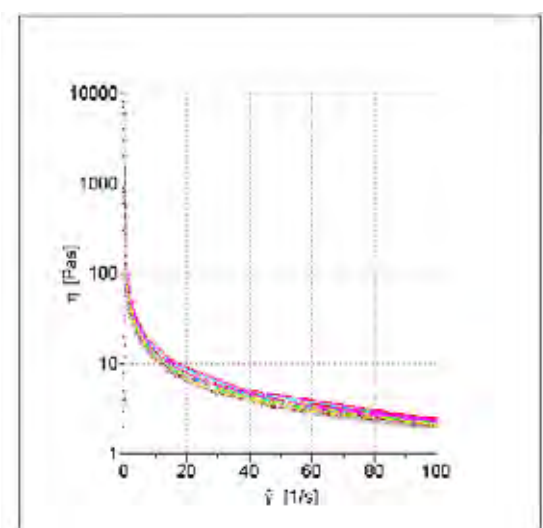


Figura 42. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza)

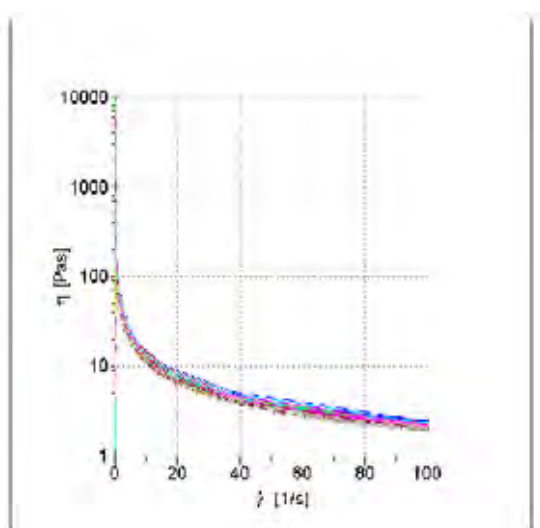


Figura 43. Reograma das viscosidades do fitocosmético mantido a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza)

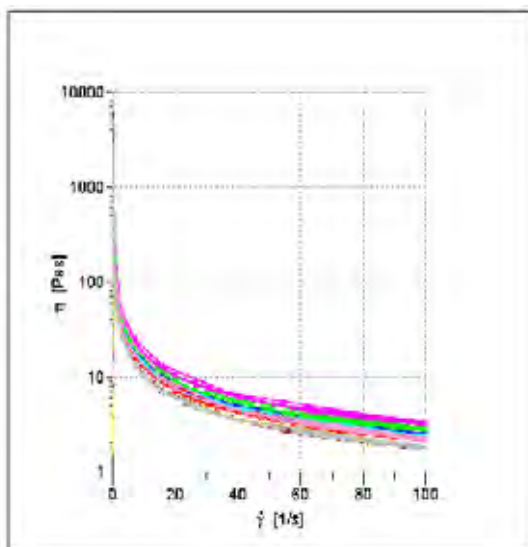


Figura 44. Reograma das viscosidades do fitocsmético mantido a $45 \pm 2^\circ \text{C}$ nos dias 1 (azul), 7 (vermelho), 15 (azul claro), 21 (verde), 30 (lilás), 45 (rosa), 60 (amarelo), 75 (marrom) e 90 (cinza)

Os valores de índice de consistência (K_H) e índice de comportamento de fluxo (n_H) foram obtidos a partir da Equação V representada pela modelo reológico de Herschel-Bulkley, sendo o modelo mais adequado às curvas apresentadas para a determinação da viscosidade, apresentando coeficiente de variação igual a 0,99, como observado no teste de estabilidade da emulsão F4 e no teste de estabilidade preliminar do fitocsmético.

$$\text{Equação V: } \sigma = \sigma_0 + K_H \dot{\gamma}^{n_H}$$

Em que: σ = tensão de cisalhamento aplicada

σ_0 : = limite de escoamento do material

K_H = índice de consistência

$\dot{\gamma}$ = taxa de cisalhamento

n_H = índice de fluxo

Foi observado que o índice de consistência do fitocsmético aumentou quando submetido às condições de estresse e durante os dias de análise (Figura 45 e Tabela 29), provocando o acréscimo da viscosidade, sendo mais acentuado quando submetida a 45°C , devido à evaporação da água provocada pelo aquecimento.

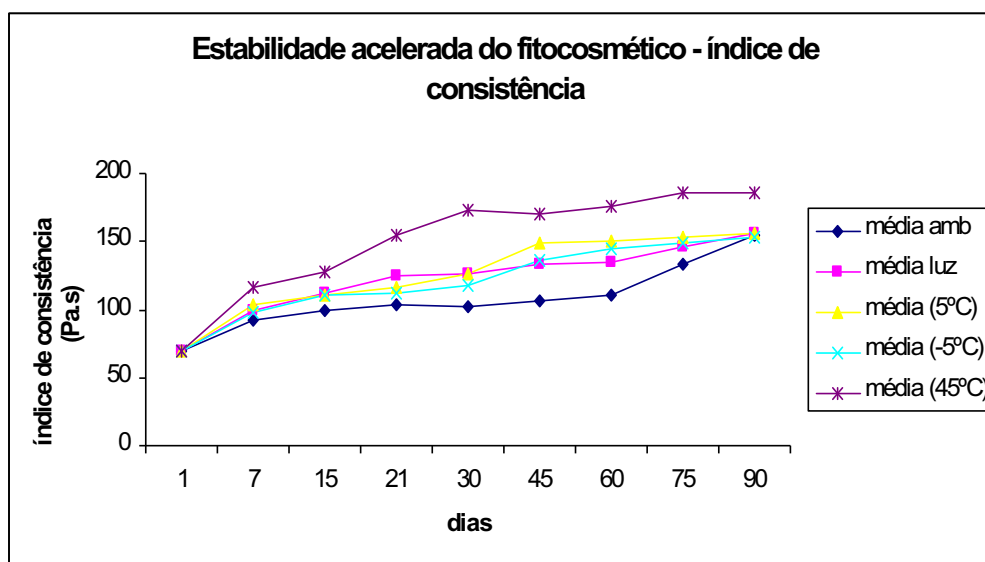


Figura 45. Gráfico das médias dos valores dos índices de consistência nas condições em que o fitocosmético foi analisado durante a estabilidade acelerada

Tabela 29. Valores do índice de consistência (Pa.s) do fitocosmético durante a estabilidade acelerada

Dias	Ambiente (27	Luz			
	± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2 °C)*	(-5 ± 2 ° C)*	(45 ± 2 ° C)*
1	69,33	69,33	69,33	69,33	69,33
7	92,27	99,75	103,62	98,48	115,72
15	99,09	111,55	110,80	110,21	127,54
21	104,10	124,50	115,93	112,35	155,10
30	102,76	126,30	126,00	117,90	172,55
45	106,54	133,43	149,50	136,76	170,59
60	110,80	134,10	150,81	145,00	175,90
75	133,10	145,62	153,40	149,60	186,23
90	154,55	155,36	156,40	153,30	186,10

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

O índice de comportamento de fluxo do fitocosmético manteve valores menores que 1 (Tabela 30), classificando a amostra com comportamento não-Newtoniano e pseudoplástico, como o apresentado pela emulsão F4 e pelo fitocosmético submetidos à estabilidade preliminar.

Tabela 30. Valores do índice de comportamento de fluxo do fitocosmético durante a estabilidade acelerada

Dias	Ambiente				
	(27 ± 2° C)*	Luz indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*
1	0,239	0,239	0,239	0,239	0,239
7	0,205	0,231	0,247	0,241	0,225
15	0,184	0,214	0,230	0,228	0,221
21	0,211	0,207	0,251	0,227	0,234
30	0,209	0,143	0,187	0,205	0,226
45	0,183	0,145	0,151	0,192	0,210
60	0,186	0,142	0,152	0,186	0,213
75	0,182	0,138	0,149	0,185	0,210
90	0,178	0,133	0,145	0,182	0,199

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

Foi observado pelos resultados obtidos da estabilidade acelerada do fitocosmético que o extrato contendo licopeno alterou a cor e a viscosidade quando exposto a temperaturas elevadas, como observado durante a estabilidade preliminar. A amostra também sofreu alteração de cor quando exposta à luz indireta. Desta maneira, é importante o armazenamento do fitocosmético na ausência de calor e de luz.

9.4.3. Doseamento do licopeno incorporado na emulsão por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O doseamento do licopeno na emulsão foi realizado com o objetivo de avaliar a estabilidade do fitoquímico, ou seja, quantificar sua concentração na formulação por CLAE, nos dias 1, 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias de análise quando submetido às condições de estresse. Foi observado que quando submetido à luz indireta e a 45 ± 2° C, a concentração de licopeno diminuiu significativamente, com variação maior que 10% depois do 15º dia de análise (Figura 46). A concentração de licopeno incorporado ao fitocosmético foi calculada utilizando a Equação V obtida através da curva analítica do padrão de licopeno apresentada no item 4.4.2.1 do Capítulo 1 deste trabalho.

Equação V: $y = 236602x + 2927,2$

É importante evidenciar que o licopeno pode sofrer oxidação na sua estrutura provocada pela luz e calor e, por isso, o fitocosmético deve ser armazenado em locais protegidos da luz e do calor para evitar a degradação do fitoquímico.

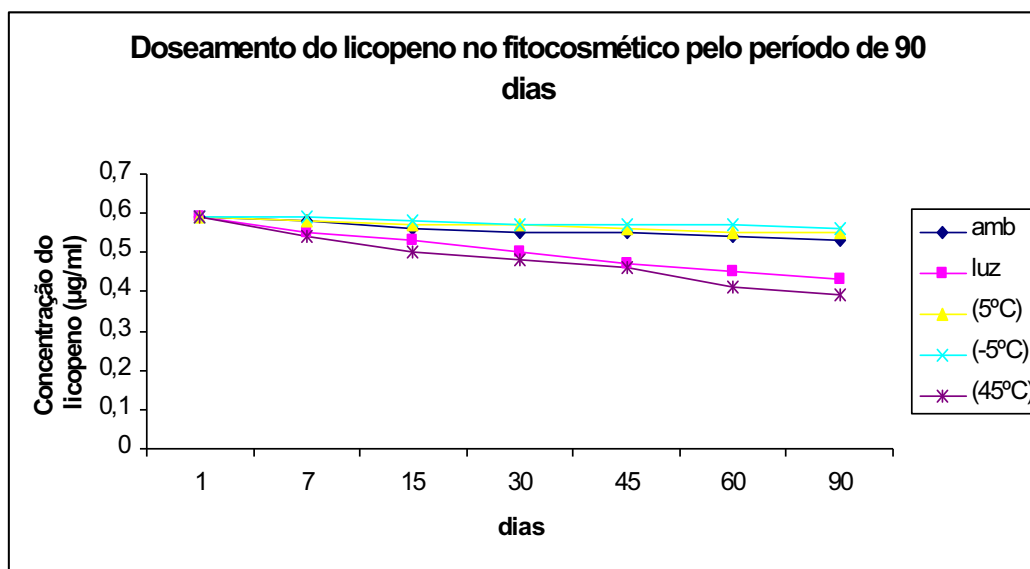


Figura 46. Gráfico do doseamento do fitocosmético realizado pelo período de 90 dias de análise

Tabela 31. Doseamento do licopeno no fitocosmético realizado pelo período de 90 dias de análise quando submetido às condições de estresse

Dias	Concentração de licopeno (µg/ml) no fitocosmético				
	Ambiente	Luz			
	(27 ± 2° C)*	indireta*	(5 ± 2° C)*	(-5 ± 2° C)*	(45 ± 2° C)*
1	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59
7	0,58	0,55	0,58	0,59	0,54
15	0,56	0,53	0,57	0,58	0,50
30	0,55	0,50	0,57	0,57	0,48
45	0,55	0,47	0,56	0,57	0,46
60	0,54	0,45	0,55	0,57	0,41
90	0,53	0,43	0,55	0,56	0,39

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

9.4.4. Determinação da espalhabilidade

A espalhabilidade foi avaliada ao submeter 1 g do fitocosmético a sucessivos acréscimos de pesos de 200 g cada e observada a distensão da amostra pelo cálculo do diâmetro apresentado. O fitocosmético apresentou valor de 2521,94 mm² quando submetido aos primeiros 200 g e este valor aumentou em função do peso adicionado, apresentando valor máximo de 4819,17 mm² (Figura 47). O teste foi realizado em triplicata.

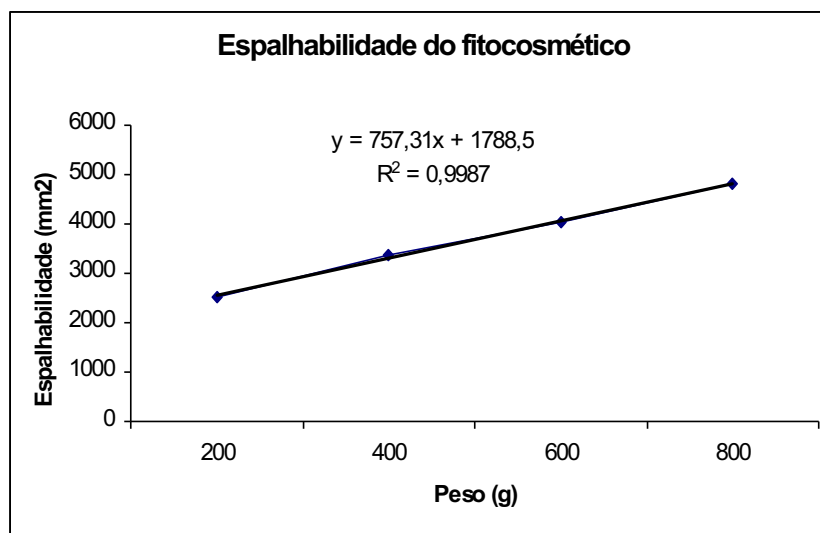


Figura 47. Gráfico da espalhabilidade do fitocosmético em função do peso adicionado

Foi possível obter linearidade entre os valores de espalhabilidade obtidos ($r = 0,99935$), e por isso podemos afirmar que o aumento do peso ou tensão aplicada à esta amostra é diretamente proporcional à sua capacidade de espalhamento.

O estudo da espalhabilidade também foi avaliado para 1 g da formulação F4 que apresentou valor de 2642,01 mm² quando submetido aos primeiros 200 g e este valor aumentou em função do peso adicionado, apresentando valor máximo de 4860,27 mm² (CEFALI *et al.*, 2009b). Estes valores são próximos dos apresentados pelo fitocosmético, ou seja, os valores não sofreram alteração significativa, evidenciando que a presença do extrato não modificou a espalhabilidade do cosmético.

9.4.5. Determinação do comportamento reológico completo

O comportamento reológico completo determina se a amostra tem comportamento Newtoniano ou não-Newtoniano, se o fluido é plástico, pseudoplástico ou dilatante, se apresenta tixotropia e se possui comportamento viscoelástico.

Foi possível observar através do teste de curva de fluxo, representado na Figura 48 que o fitocosmético apresenta característica não-Newtoniana, ou seja, a amostra sofre deformação quando submetida à tensão de cisalhamento, não apresentando, portanto, viscosidade constante. A emulsão também foi caracterizada como tixotrópica, pois apresentou diminuição da viscosidade com o cisalhamento e valor da área de histerese de 658,7 Pa/s.

A tixotropia está relacionada com a deformação da amostra durante a aplicação, ou seja, quando submetida a uma tensão. Assim, quanto mais tixotrópica a amostra, maior sua deformação, possibilitando maior espalhabilidade do produto quando aplicado na pele, e o inverso é verdadeiro. Após a aplicação, a emulsão com caráter tixotrópico, recupera sua viscosidade, o que evita que o produto escorra. Além disso, o produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento, apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (MARTIN, 1993).

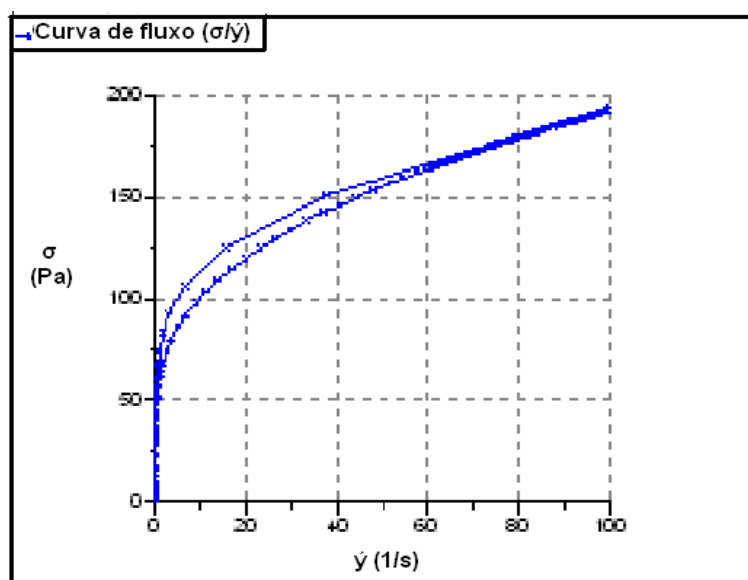


Figura 48. Reograma da curva de fluxo do fitocosmético

O ensaio de limite de escoamento é um teste que determina a tensão necessária para que a amostra comece a fluir. O fitocosmético desenvolvido apresentou deformação quando a tensão de cisalhamento apresentou valor de 0,04919 Pa após 5,91 segundos do início do teste (Figura 49). Assim, podemos avaliar que o fitocosmético deforma rapidamente após ser submetida à tensão.

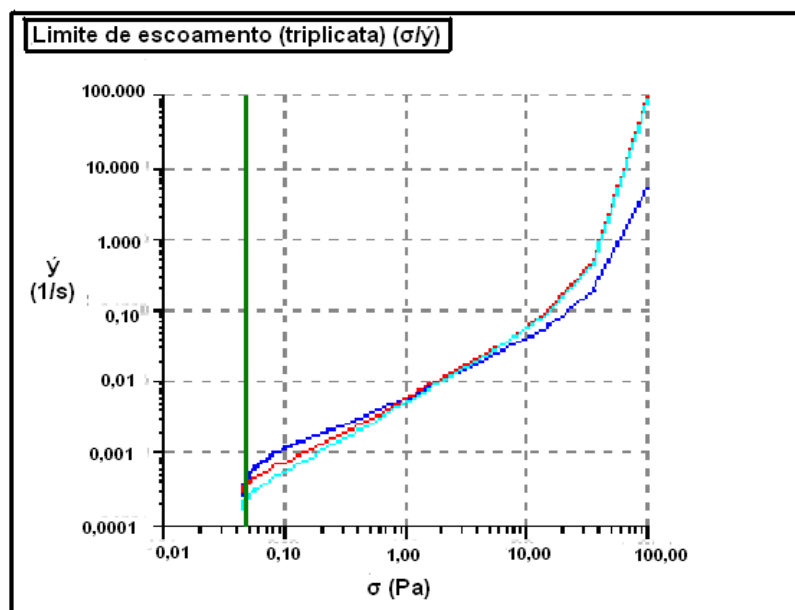


Figura 49. Reograma do limite de escoamento do fitocosmético

Foram avaliados também os comportamentos elástico e viscoso da amostra, e com isso foi possível determinar se a amostra é mais viscosa ou mais elástica, e o quanto recupera de sua forma elástica depois de ser submetida à tensão de cisalhamento (RIBEIRO, 2004).

Outro teste realizado foi o da Varredura de tensão que é preliminar para a realização dos testes de viscoelasticidade, sendo possível determinar a que valores de tensão de cisalhamento, dentro de uma faixa de linearidade, a amostra não sofre deformação. Foi observado que na faixa de 0 a 5 Pa, a amostra não deforma, ou seja, os valores de G' (verde), G'' (azul) e Viscosidade η^* (rosa) mantiveram-se lineares nesta faixa de tensão de cisalhamento, podendo assim ser utilizado nos testes de varredura de frequência e fluência e relaxação (Figura 50).

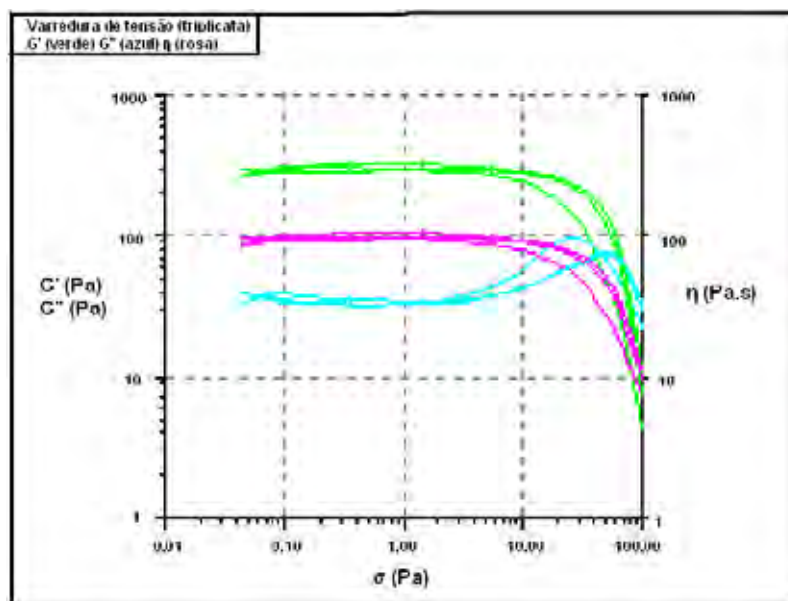


Figura 50. Reograma da varredura de tensão do fitocosmético (G' verde, G'' azul, η^* rosa)

Estudos realizados por CHIARI *et al.* (2009) e ZAMBON *et al.* (2009) evidenciaram que emulsões que contêm em sua composição dispersão a 2% do agente espessante Carbomer (polímero carboxivinílico) em uma concentração acima de 20%, apresentam linearidade dos valores de G' , G'' e viscosidade em torno de 1 Pa, de forma semelhante ao fitocosmético analisado.

A varredura de frequência determina os valores de G' (módulo de estocagem) e G'' (módulo de perda) das formulações. Foi observado pelo reograma da Figura 51 que o fitocosmético apresentou valor de G' (verde) maior que G'' (azul) e diminuição do valor da viscosidade (rosa) com o aumento da tensão de cisalhamento, comportamento típico de amostras viscoelásticas.

Quando o material viscoelástico apresenta módulo de armazenamento ou elástico maior que o módulo viscoso ou de perda, a energia de tensão é temporariamente armazenada durante o teste e pode ser recuperada mais tarde, como ocorre em geral em sistemas emulsionados O/A. No reograma, também é possível observar a faixa de frequência em que os valores de G' e G'' se cruzam, chamado de *crossover*, que neste caso apresentou dois pontos, conforme a Tabela 32. Este ponto determina a mudança de comportamento da formulação, evidenciando que durante o cisalhamento houve alteração do comportamento.

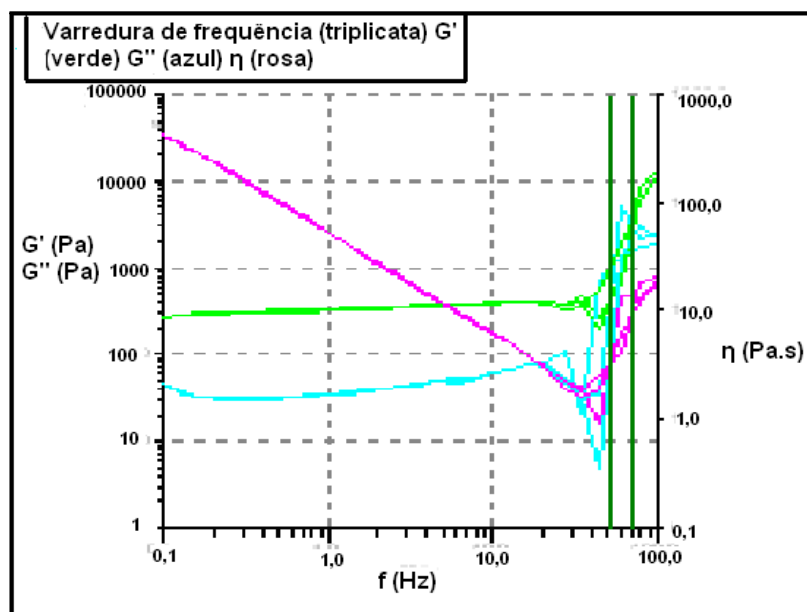


Figura 51. Reograma da varredura de frequência com os pontos de *crossover* para o fitocosmético

Tabela 32. Valores dos dois pontos de *Crossover*, juntamente com os valores das frequências e os tempos em que estes pontos ocorreram

<i>Crossover</i> (Pa)*	Frequência (Hz)*	Tempo (s)*
484,5	53,18	215,30
3901,0	70,28	216,30

* Média de três leituras. Desvio padrão menor que 5%

O último teste realizado foi o de fluência e relaxação que determina a viscoelasticidade da amostra. O comportamento viscoelástico é caracterizado pela deformação quando o sistema é submetido a uma determinada tensão, e recuperação de sua estrutura elástica quando esta tensão cessa, facilitando, assim, o espalhamento durante a aplicação tópica. Isso é observado no reograma representado pela Figura 52 que nos primeiros segundos do teste, o fitocosmético resistiu à tensão para começar a fluir, mas quando a tensão de cisalhamento foi cessada, ocorreu a recuperação da parte elástica, comum em sistemas poliméricos.

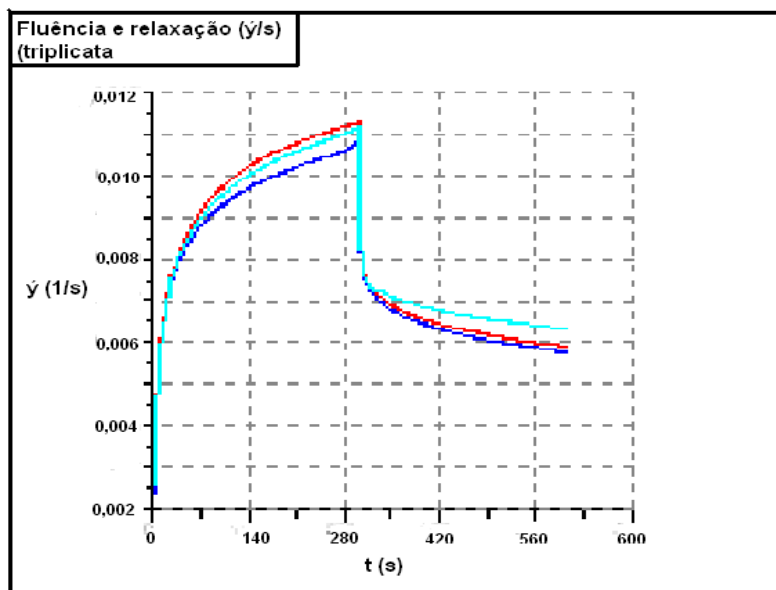


Figura 52. Reograma da curva de fluência e relaxação do fitocosmético

Foi avaliado o comportamento reológico completo da emulsão F4 da mesma maneira que do fitocosmético (CEFALI *et al.*, 2009b) e os resultados apresentaram-se semelhantes, constatando que a presença do extrato de licopeno não alterou o comportamento reológico da formulação. Os reogramas apresentam três curvas, mostrando o resultado dos ensaios realizados em triplicata.

9.4.6. Análise térmica

Foram realizados os testes de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) que é uma técnica de análise térmica que registra o fluxo de energia calorífera associado aos estudos transitórios dos materiais em função da temperatura, e o teste de Termogravimetria (TG), que mede a variação de massa durante o aquecimento da amostra (CASIMIRO *et al.*, 2005).

Os ensaios de análise térmica foram realizados, pois os métodos calorimétricos, juntamente com uma gama de técnicas analíticas permitem medir alterações das propriedades químicas e/ou físicas de uma amostra em função da temperatura (CASIMIRO *et al.*, 2005).

Foi observado no termograma de DSC, representada pela Figura 53, um pico endotérmico a 109° C, atribuído à evaporação dos componentes da formulação. Este resultado foi semelhante ao realizado em creme de dexametasona em que a fusão dos constituintes da emulsão ocorreu próxima a 100° C (SCHNITZLER *et al.*, 2001).

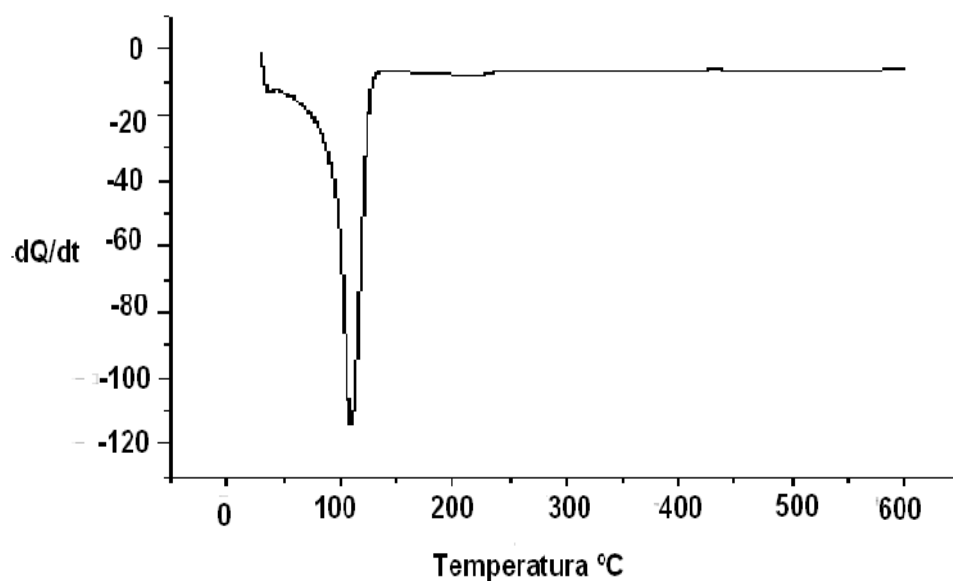


Figura 53. Termograma de DSC do fitocosmético obtido em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de 10° C/min

O fitocosmético submetido ao teste de TG sofreu uma decomposição térmica em três etapas, sendo a primeira a 95,5° C, a segunda a 536° C e a terceira a 804° C, ocorrendo perda da amostra de 85,55%, 97,78% e 98,16% respectivamente (Figura 54).

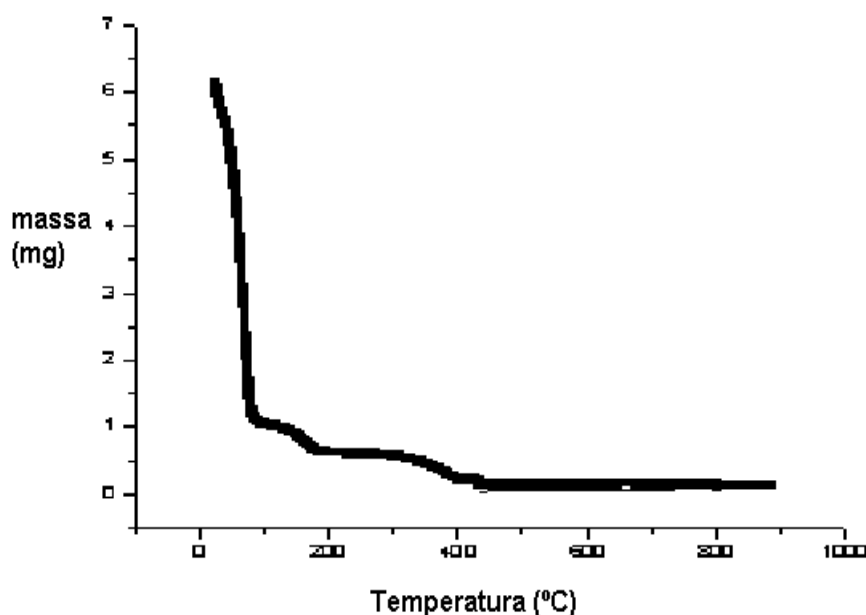


Figura 54. Termograma de TG do fitocosmético obtido em atmosfera de nitrogênio com razão de aquecimento de 10° C/min

A realização dos testes de análise térmica permitiu observar que tanto os constituintes da emulsão são estáveis até a temperatura de 109° C. Também é importante ressaltar que para o preparo desta e de outras emulsões deve ser realizado em temperaturas inferiores a 100° C, para evitar a evaporação e consequente degradação dos compostos.

9.4.7. Controle microbiológico

O controle microbiológico é um teste de extrema importância a ser realizado em cosméticos como os aspectos físico-químicos, garantindo a qualidade e, assim, a estabilidade dos produtos.

O fitocosmético desenvolvido foi submetido ao controle microbiológico, observando a ausência de crescimento de micro-organismos patogênicos específicos como *Salmonella* sp, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL,1999; F. Bras. IV, 1988; USP 31, 2008; PINTO *et al.*,2003).

A contagem do número total destes micro-organismos no fitocosmético está descrita na Tabela 33, sendo possível observar que a amostra apresentou valores abaixo do permitido para cosméticos do tipo II (BRASIL, 1999; F. Bras. IV, 1988; USP 31, 2008), sendo assim aprovado pelo teste de controle microbiológico.

Tabela 33. Contagem microbiológica do fitocosmético

Microrganismos	Recomendação (BRASIL, 1999)	Resultado*
Bactérias aeróbias	10 ³ a 5x10 ³ UFC/g	Inferior a 10 UFC/g
Fungos e leveduras	10 ³ a 5x10 ³ UFC/g	Inferior a 10 UFC/g
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente

* Média de três leituras

Com os resultados obtidos neste capítulo, foi possível constatar que a formulação base F4 foi considerada estável, de acordo com os ensaios realizados, e o por isso foi utilizada para o desenvolvimento do fitocosmético.

A formulação cosmética incorporada do extrato contendo licopeno, obtido através do tomate salada, apresentou escurecimento e degradação do licopeno quando submetido à luz indireta e ao calor. Desta maneira, o fitocosmético deve ser conservado ao abrigo da luz e temperaturas elevadas.

O fitocosmético apresentou comportamento reológico e espalhabilidade desejáveis para uma formulação de uso tópico, estabilidade térmica referente à evaporação dos componentes da fórmula até uma temperatura de 109 °C e ausência de micro-organismos patógenos.

10. CONCLUSÃO PARCIAL

Foi possível concluir através deste estudo que a formulação F4 apresentou estabilidade nos ensaios realizados e foi utilizada no desenvolvimento do fitocosmético e em ensaios de permeação cutânea e atividade antioxidante *in vitro*, para combater à aceleração do envelhecimento cutâneo.

CAPÍTULO 3 – ESTUDO DA PERMEAÇÃO CUTÂNEA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DO FITOCOSMÉTICO CONTENDO LICOPENO PARA O COMBATE À ACELERAÇÃO DO ENVELHECIMENTO CUTÂNEO

11. REVISÃO DA LITERATURA

11.1. Permeação cutânea

A pele é um órgão responsável por 16% do peso do corpo humano e é constituída por uma camada de origem ectodérmica, que é a epiderme e outra endotérmica, a derme. Possui múltiplas funções, dentre elas o controle da perda de água por evaporação. Isso acontece graças à camada córnea que reveste a epiderme e fornece à pele proteção contra o atrito (HIRATA *et al.*, 2004; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990).

Trata-se de um órgão que apresenta função de barreira natural, protegendo o organismo da entrada de substâncias nocivas, e para que substâncias ativas contidas em formulações de uso tópico entrem em contato com camadas mais profundas da pele, essas substâncias devem atravessar o estrato córneo, o que traz grandes limitações, dependendo das suas características lipofílicas ou hidrofílicas, podendo ficar retidas nas camadas lipídicas (RIEGER, 1993). Neste processo, o estrato córneo constitui a principal barreira, enquanto a epiderme e a derme apresentam um efeito de reservatório (BONNABRY, 1999; LE HIR, 1997).

Os testes de permeação cutânea podem ser realizados por técnicas *in vitro*. Entre os métodos mais empregados destaca-se o que utiliza as células do tipo Franz, que está demonstrada na Figura 55.

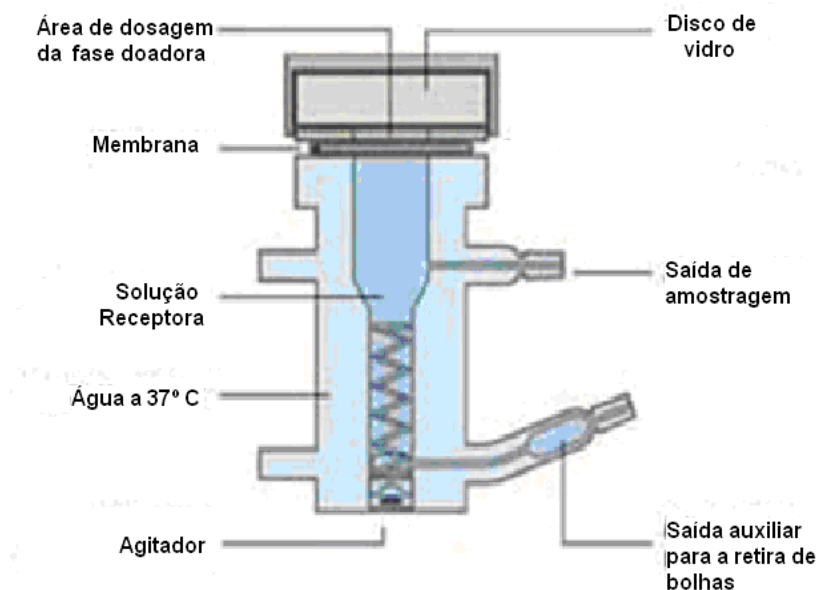


Figura 55. Célula de difusão do tipo Franz empregada nos estudos de permeação cutânea *in vitro* (BARRY, 1983; SASSON, 2006)

O sistema de difusão utilizando as células do tipo Franz pode ser formado por 6 células compostas basicamente de compartimento doador, onde o produto testado é depositado, compartimento receptor, contendo solução na qual o ativo será difundido e a membrana que tem papel de barreira na absorção (FRANZ, 1975), como o equipamento utilizado para a realização deste trabalho (HANSON RESEARCH FLOWSCIENCE-POLYSCIENCE), conforme pode ser visualizado na Figura 56.



Figura 56. Fotografia do sistema de difusão composto de seis células do tipo Franz, conforme o equipamento utilizado (HANSON RESEARCH FLOWSCIENCE-POLYSCIENCE)

Este equipamento permite que seja realizado um estudo para avaliar a permeação de compostos ativos em formulações e um controle negativo, com o objetivo de determinar se a permeação ou retenção será apenas do ativo ou dos componentes da formulação.

A membrana empregada na avaliação da permeação de substâncias através da pele é um fator crítico. As membranas sintéticas não possuem as propriedades anatômicas e fisiológicas da pele. Sendo assim o ideal é realizar estes estudos com membranas naturais, ou seja, de origem humana ou animal (BRONAUGH, STEWART, 1986). Peles de diversos animais como cobra, rato, camundongo, coelho e porco têm sido utilizadas nestes estudos, mas a pele da orelha de porco tem sido a mais empregada nos experimentos *in vitro* e tem-se mostrado um bom modelo animal para simular a pele humana, de acordo com SATO *et al.* (1991).

Para identificar e quantificar substâncias retidas no estrato córneo é utilizada uma técnica chamada de *Tape stripping* e outra técnica muito empregada para o estudo de produtos cosméticos é a identificação e quantificação de substâncias retidas no tecido (epiderme/derme) (ALENCASTRE *et al.*, 2006; WEIGMANN *et al.*, 2005).

O interesse em identificar a permeação de substâncias ativas pela pele é grande e tem sido utilizada em muitos estudos científicos, mas é de extrema importância que sejam realizados ensaios que avaliem a atividade do princípio ativo.

Substâncias que possuem atividade antioxidante podem ser avaliadas por ensaios *in vitro* ou *in vivo* e estão fundamentados pelo sequestro ou inativação de radicais livres. Muitos estudos realizam testes de atividade antioxidante com uma grande variedade de substâncias, principalmente de origem vegetal.

A ação sequestrante de radicais é proporcional ao número de ligações duplas conjugadas presentes em algumas moléculas, como por exemplo, em carotenóides como o licopeno. O mecanismo pelos quais os carotenóides protegem os sistemas biológicos dos radicais depende da transferência de energia do oxigênio excitado para a molécula do carotenóide (STAHL, SIES, 1999). Eles reagem principalmente com os radicais peróxidos e com o oxigênio molecular, sendo a base de sua ação antioxidante. Carotenóides como o beta-caroteno, licopeno, zeaxantina e luteína, exercem funções antioxidantes em fases lipídicas, bloqueando os radicais livres que danificam as membranas lipoprotéicas (SIES, STAHL, 1995).

O teste mais utilizado para avaliar a atividade antioxidante é o método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), bastante conveniente para o *screening* antioxidante de pequenas moléculas, uma vez que a reação pode ser observada visualmente utilizando um espectrofotômetro UV/VIS. Este método também é quantitativo e tornou-se uma ferramenta para determinar o valor de IC₅₀ dessa substância para a atividade antioxidante (SÁNCHEZ-MORENO, *et al.*, 1998).

Além de determinar a atividade antioxidante das substâncias ativas, é importante analisar também a sua atividade depois de incorporado em uma forma cosmética, como por exemplo, em emulsões utilizadas como antienvelhecimento, muito comuns no mercado e em pesquisas na área cosmética.

12. OBJETIVO

Avaliar a permeação cutânea e a atividade antioxidante *in vitro* do fitocosmético contendo licopeno.

13. MATERIAL E MÉTODOS

13.1. Material, acessórios e equipamentos

Material: Pele de orelha de porco dermatomizada 500 μm , tampão fosfato pH 7,4, polysorbato 80 (polysorbate 80), fita adesiva (3M), acetato de etila (grau HPLC), metanol (grau HPLC), acetonitrila (grau HPLC), licopeno padrão analítico (Sigma), radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), clorofórmio (PA), isopropanol (PA), metanol (PA).

Acessórios: bécker, bastão de vidro, espátulas, tubos de ensaio, estante para tubos de ensaio, pinça, pipeta de Pasteur, fita adesiva (3M, Scotch 550), papel de filtro qualitativo e quantitativo, balões de diluição, micropipetas, membrana filtrante (Millipore, 0,45 μm), *vials*.

Equipamentos: balança analítica (Gehaka, BG 2000), Célula de difusão de Franz (Hanson Research Flowscience-Polyscience), agitador (Minishaker JK, MS1), banho de ultrassom (QUIMIS, Q-335D), espectrofotômetro no UV/VIS (Hitachi, U 2001), cromatógrafo líquido de alta eficiência (Waters, 1525), coluna de fase reversa (C_{18}) (Nova Pak 250 x 4,60 mm 5 μm), balança analítica (Bel, Mark).

13.2. Métodos

13.2.1. Permeação cutânea (ALENCASTRE *et al.*, 2006; SASSON, 2006)

Para a realização do teste de permeação cutânea é necessária a realização do teste de liberação, para determinar a capacidade da cedência do licopeno incorporado na emulsão O/A desenvolvida, o teste de permeação propriamente dito e os testes de retenção no estrato córneo e na epiderme/derme.

13.2.1.1. Teste de liberação

Membranas sintéticas de celulose foram colocadas sobre as células de difusão em contato com o meio receptor (7 ml de tampão fosfato pH = 7,2, contendo 2 mM de polisorbato 80 (polysorbate 80)). Sobre as membranas, foram adicionados 200 mg da emulsão contendo licopeno. Os experimentos foram conduzidos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e a solução receptora constantemente agitada a 300 rotações por minuto (rpm). O meio receptor foi coletado após 2, 4 e 8 horas e a concentração de licopeno foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. Este experimento foi realizado seis vezes utilizando a emulsão base como branco.

13.2.1.2. Teste de permeação cutânea

Para a realização do teste de permeação cutânea, foi utilizada pele de orelha de porco, obtida do Frigorífico Olho D'água da cidade de Ipuã no estado de São Paulo. As orelhas inteiras e com pêlo foram limpas e dermatomizadas imediatamente após a aquisição (Figura 57). As peles foram mantidas em temperatura a $-5 \pm 2^\circ \text{C}$ e após 24 horas foram utilizadas para a realização do teste.

A pele de orelha de porco dermatomizada foi colocada sobre as células de difusão com a derme em contato com o meio receptor (7 ml de tampão fosfato pH = 7,2, contendo 2 mM de polisorbato (polysorbate 80)). No estrato córneo foram adicionados 200 mg da emulsão contendo licopeno (1,18 μg de licopeno em 200 mg do fitocosmético). Os experimentos foram conduzidos a $37 \pm 0,2^\circ \text{C}$ e a solução receptora constantemente agitada a 300 rotações por minuto (rpm). O meio receptor foi coletado após 2, 4 e 8 horas respectivamente e a concentração de licopeno foi determinada através da cromatografia líquida de alta eficiência. Este experimento foi realizado seis vezes e foi utilizada como branco, a emulsão base.



Figura 57. Pele de porco sendo dermatomizada para a utilização nos testes de permeação cutânea

13.2.1.3. Teste de retenção no estrato córneo

No final de cada experimento, as peles foram removidas das células de difusão e o excesso de formulação presente nas peles foi removido com água destilada e secas com papel absorvente. As peles foram fixadas em superfície plana, a área de retenção para a remoção do estrato córneo foi delimitada e o estrato córneo foi removido através do método de *tape stripping*, que consiste em 12 batidas com fitas adesivas sobre a pele fixada. A primeira fita foi descartada para retirar o excesso da formulação sobre a pele e as 11 fitas restantes foram transferidas para tubos de ensaio contendo 4 ml de metanol e agitados em agitador por 1 minuto. Em seguida, os tubos foram sonicados por 15 minutos em banho de ultrassom. O sobrenadante foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (Waters 1525- Binary HPLC Pump), acoplado ao detector de absorvância (Waters 2487). O software utilizado foi o Empower. A identificação do licopeno foi realizada em coluna de fase reversa (C_{18}) utilizando a fase móvel acetonitrila/metanol/acetato de etila nas proporções de 48:26:26 (v/v/v) durante 5 minutos e com vazão de 1,0 ml/min. O comprimento de onda utilizado foi 472 nm, adaptando a metodologia descrita por NUNES e MERCADANTE, 2004.

13.2.1.4. Teste de retenção na epiderme/derme

Para a realização deste teste, as peles sem o estrato córneo foram cortadas com tesoura e transferidas para tubos cônicos contendo 4 ml de metanol, que foram sonicados durante 30 minutos. A solução final foi analisada para quantificação do licopeno retido nas camadas de epiderme e derme por cromatografia líquida de alta eficiência.

13.2.2. Atividade antioxidante *in vitro* do licopeno incorporado no fitocosmético

Em tubos de ensaio, foram adicionadas diferentes concentrações da emulsão contendo licopeno seguida pela adição de solução de DPPH (concentração 0,004%). O ensaio foi realizado com o fitocosmético (0,5 g) dissolvido em 5 ml de solução solvente composta de clorofórmio/isopropanol (1:1) (ISAAC, 1998). As absorbâncias foram medidas utilizando solução de metanol e DPPH como controle negativo, solução de metanol e emulsão sem licopeno como brancos, a 531 nm, em espectrofotômetro no UV/VIS. Na presença de licopeno a intensidade da absorvância em 531 nm diminuiu e a porcentagem de inibição (%INIBIÇÃO) foi calculada como a Equação IV (adaptação CUENDET *et al.*, 1997).

$$\text{Equação IV: \% inibição} = \frac{A_{\text{Max}} - A_{\text{Teste}}}{A_{\text{Max}}} \cdot 100$$

14. RESULTADOS E DISCUSSÃO

14.1. Teste de liberação

Depois de realizado o teste de liberação, o líquido receptor coletado foi analisado por CLAE para determinar e quantificar a presença do licopeno liberado da formulação.

Foi observado que em todos os tempos em que foram coletadas as alíquotas (2, 4 e 8 horas) não foi identificada a presença de licopeno.

Algumas substâncias podem ser impedidas de serem liberadas de uma formulação devido à incompatibilidade ou à baixa solubilidade com o líquido receptor (tampão 7,2), mas o licopeno

apresentou resultado positivo nos testes de retenção cutânea, podendo assim, ser constatado que o licopeno foi liberado, pois quando em contato com a pele de porco, o tampão solubilizou o ativo.

As membranas sintéticas são utilizadas no teste de liberação, pois é possível detectar apenas a liberação do ativo e não a sua retenção, o que iria ocorrer se usasse qualquer tipo de pele, humana ou animal (GARCIA, 2009). Desta maneira, mesmo apresentando resultado de liberação negativo, foram realizados os testes de permeação cutânea e retenção do estrato córneo e epiderme/derme.

14.2. Teste de permeação cutânea, retenção no estrato córneo e retenção na epiderme/derme

O ensaio de permeação cutânea realizado neste estudo apresentou três etapas de avaliação: o teste de permeação cutânea, que avaliou e quantificou a concentração de licopeno permeado, podendo ser absorvido pela corrente sanguínea; o teste de retenção no estrato córneo, verificando a retenção do fitoquímico na região mais externa da pele, protegendo-a assim apenas superficialmente; e o teste de retenção epiderme/derme, avaliando se o licopeno ficou retido nesta região e com isso, podendo agir nas camadas mais profundas da pele.

De acordo com SCHUELLER e ROMANOWSKI (2000), a emulsão é a forma farmacêutica mais utilizada em sistemas de liberação de produtos de uso tópico, pois por meio destas, é possível veicular uma gama de substâncias que são liberadas de maneira rápida e conveniente. O tipo de emulsão (O/A e A/O) também é um fator a ser considerado, pois pode influenciar na promoção da liberação, permeação e/ou retenção de substâncias ativas na pele. Um estudo realizado por ALENCASTRE *et al.* (2006) foi observado que a emulsão do tipo A/O proporcionou maior permeação de vitamina E tanto na forma livre, como na encapsulada, na pele de porco.

TRABER *et al.* (1998) estudaram a penetração e retenção do alfa-tocoferol na pele de ratos e observaram que a maior fração do ativo estava presente nas camadas mais profundas da pele, e não na superfície. Este resultado condiz com o obtido no estudo realizado por SASSON (2006), que avaliou a permeação cutânea *in vitro* do acetato de tocoferol quando presente em uma emulsão O/A.

Um estudo realizado por LIRA (2003), avaliou o desempenho de liberação e permeação *in vitro* do anti-inflamatório lapachol incorporado em gel, utilizando pele de orelha de porco. Foi observado que esta forma farmacêutica permitiu a liberação e permeação do ativo, e foi quantificado lapachol retido nas camadas da pele.

Neste estudo, as alíquotas da solução receptora e do sobrenadante obtido dos testes de retenção do estrato córneo e epiderme/derme foram coletadas automaticamente após a coleta nos tempos de 2, 4 e 8 horas e analisadas por CLAE.

Para determinar a concentração de licopeno permeado e/ou retido na pele da orelha de porco realizado no teste de permeação *in vitro*, foi utilizada a curva analítica de licopeno desenvolvida através da técnica por CLAE representada na Figura 5, no item 4.4.2.1. do Capítulo 1 deste trabalho.

Foi observado pelos resultados obtidos (Tabela 32) que o licopeno incorporado na emulsão O/A não permeou a pele de porco, porém ficou retido na epiderme/derme, depois de 4 e 8 horas. Este resultado é desejável, pois a maior parte das reações oxidativas ocasionadas pela radiação UV ocorrem na epiderme viável e na derme, e é nesta região que o licopeno poderia agir no sequestro de radicais livres.

Tabela 34. Valores das concentrações em µg/ml de licopeno permeado, retido na epiderme/derme e retido no estrato córneo

Período (h) da análise	Permeado (µg/ml)*	Retido na epiderme/derme (µg/ml)*	% de licopeno retido da epiderme/derme referente a 200 mg do fitocosmético	Retido no estrato córneo (µg/ml)*
2	0	0	0	0
4	0	0,0131	1,11%	0
8	0	0,0373	3,16%	0

* Média de seis leituras. Desvio padrão menor que 5%

Na Figura 58 é possível observar que a concentração de licopeno aumentou à medida que o tempo de exposição do licopeno na pele de porco duplicava.

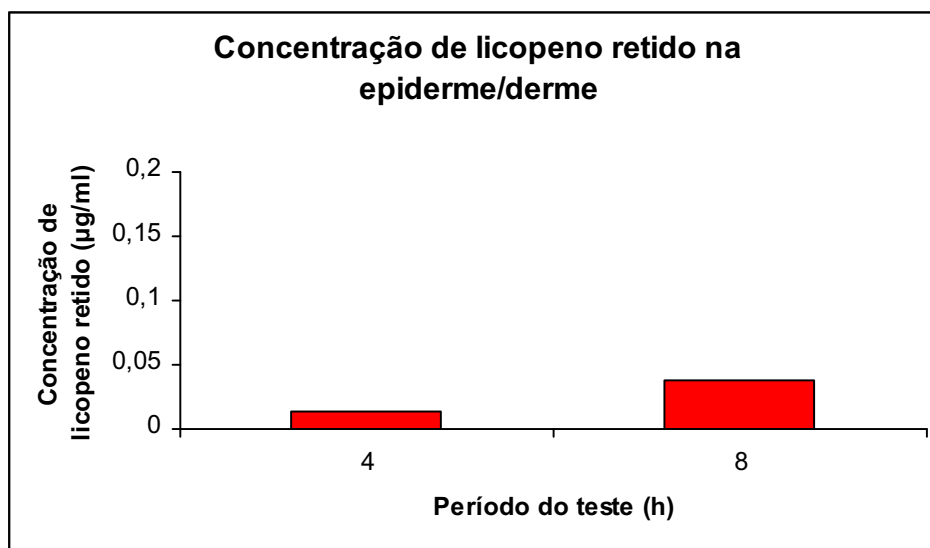


Figura 58. Concentração de licopeno retido na epiderme/derme após a exposição do fitocosmético na pele de porco por 4 e 8 horas

Este estudo mostrou que a aplicação frequente do fitocosmético pode aumentar a concentração do licopeno na pele, proporcionando assim, o efeito antievelhecimento desejado.

A contribuição do estudo de permeação *in vitro* na avaliação de propriedades farmacocinéticas de formulações e no desenvolvimento farmacotécnico é inquestionável, pois representa um procedimento prático, rápido e de baixo custo. Entretanto, deve-se ter a cautela quanto à extrapolação dos resultados obtidos para situações *in vivo*. Com a metodologia *in vitro* pode-se fazer uma seleção prévia das formulações antes da realização de testes clínicos (SATO *et al.*, 2007).

14.3. Atividade antioxidante *in vitro* do licopeno incorporado no cosmético

O potencial antioxidante do extrato etanólico foi determinado baseado na avaliação da atividade sequestrante de radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). O DPPH é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes, que apresenta máximo de absorção em 531 nm, sendo este o comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras.

O teste não foi realizado com o radical ABTS, pois, de acordo com os resultados apresentados pelos extratos contendo licopeno a partir dos quatro tipos de tomate analisados no

item 4.5. do Capítulo 1 deste trabalho, foi observado que os valores de IC_{50} frente a este radical foram inferiores aos apresentados quando submetidos à avaliação frente ao radical DPPH.

O teste de atividade antioxidante foi realizado também no fitocosmético para comprovar a atividade do licopeno incorporado na formulação e para verificar uma possível interferência dos componentes da fórmula na ação do ativo. Para isso, foi preparada a emulsão F4 com ausência do antioxidante BHT, para não provocar resultados falso-positivos.

A solução de DPPH (0,004%) foi adicionada à solução do fitocosmético em sistema solvente (0,1 mg/ml) e, após 30 minutos, em local protegido da luz, foram lidas as absorvâncias em espectrofotômetro na região do visível para a verificação da atividade antioxidante do licopeno. Foi observado que nesta diluição o fitocosmético apresentou atividade seqüestrante ao radical DPPH, pois a emulsão sem licopeno em contato com DPPH apresentou uma absorvância de $0,755 \pm 0,005$ e o radical em contato com o fitocosmético a absorvância foi de $0,607 \pm 0,02$, apresentando uma porcentagem de inibição de 19,51%.

A inibição do radical livre provocada pelo fitocosmético é pequena, mas comprova a ação *in vitro* do licopeno incorporado em uma formulação cosmética, e à medida que o uso do cosmético torna-se frequente, o teor de licopeno pode aumentar, ao permanecer retido na pele, e atingir uma concentração suficiente para inibir ou evitar a ação dos radicais livres presentes na pele. Assim, o fitocosmético passa a ser promissor para a realização de estudos futuros no combate ao envelhecimento cutâneo.

Não foram encontrados na literatura dados que pudessem ser comparados ou não aos resultados obtidos neste trabalho com atividade antioxidante *in vitro* de substâncias incorporadas em emulsões.

Desta maneira, foi possível constatar, através dos resultados obtidos neste Capítulo, que a formulação cosmética permitiu a liberação do licopeno que ficou retido na epiderme e na derme da pele de orelha de porco utilizada, e o licopeno incorporado na formulação, manteve atividade antioxidante referente ao radical DPPH.

15. CONCLUSÃO PARCIAL

Através dos resultados obtidos foi possível concluir que o fitocosmético apresenta atividade antioxidante e proporciona a retenção do ativo na pele.

16. CONCLUSÃO FINAL

A formulação cosmética contendo extrato de licopeno obtido através do tomate salada é estável, possui comportamento desejável para um cosmético e apresenta atividade antioxidante perante ao radical DPPH, podendo agir na epiderme/derme, sendo promissora para o combate ao envelhecimento da pele.

17. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCASTRE, J.B.; BENTLEY, M.V.L.B.; GARCIA, F.S.; MORAGAS, M.; VILADOT, J.L.; MARCHETTI, J.M. A study of the characteristics and *in vitro* permeation properties of CMC/chitosan microparticles as a skin delivery system for vitamin E. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v.42, n.1, p. 69-76, 2006.

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: Interesse e aplicações na área cosmético-farmacêutica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.

ANDREASSI, M.; STANGHELLINI, E.; ETTORE, A.; DI STEFANO, A.; ANDREASSI, L. Antioxidant activity of topically applied lycopene. **Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 18, p.52-55, 2004.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L.V. **Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos**. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000. 568 p.

BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorptions**. New York: Marcel Dekker, v.18, 1983. p.1-48.

BARRY, B.W. Rheology of dermatological vehicles. In: **Dermatological formulations**. New York: Marcel Dekker, p. 351-439, 1993.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Free radicals and the main dietary antioxidants. **Rev. Nutr.**, v. 12, n.2, p.123-130, 1999.

BONNABRY, C. Mise au point et validation de modeles d'étude *in vitro* du passage percutané, Université Dáuvergne – UFR de Pharmacie, 1999.

BORGUINI, R. G. 2006, 178f. Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate orgânico em comparação ao convencional. Tese (doutorado). Faculdade de Saúde Pública - São Paulo – USP.

BRACA, A.; FICO, G.; MORELLI, I.; DE SIMONE, F.; TOMÈ, F.; DE TOMMASI, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species. **J. Ethnopharmacol.**, v. 86, p. 63-67, 2003.

BRAMLEY, P.M. Is lycopene beneficial to human health? **Phytochemistry**, v.54, n.3, p.233-6, 2000.

BRASEQ, Noções básicas de reologia e viscosidade. Disponível em: <http://www.braseq.com.br/pdf/brookfield.pdf>. Acesso em: 13 de agosto de 2009.

BRASIL, Resolução RE nº 481. Brasília: Parâmetros de controle microbiológico para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, 1999.

BRASIL, Resolução RE nº 899. Brasília: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos conforme o anexo desta resolução. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. Poder Executivo, 2003.

BRASIL, **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Brasília: Núcleo de Assessoramento em Comunicação Social e Institucional, v.1, p.12-19, 26,27, 2004.

BRASIL, **Guia para a avaliação da segurança de produtos cosméticos, 2003**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia/index.htm>. Acesso em: 7 de junho de 2008.

BRASIL. **Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos.**

Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf. Acesso em: 21 de julho de 2009a.

BRASIL. **Quantidade de agrotóxicos em alimentos é menor que em 2002.** Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias> > Acesso em: 10 de junho de 2009b.

BRASIL. **Índice monográfico.** MO3 - mancozebe. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>

Acesso em: 17 de março de 2009c.

BRASIL. **Divulgado monitoramento de agrotóxicos em alimentos.** Disponível em:

<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2009/150409_1.htm>. Acesso em: 21 de julho de 2009d.

BRONAUGH, R.L.; STEWART, R.F. Methods for *in vitro* percutaneous absorption studies IV: preparation of the barrier layer. **J. Pharm. Sci.**, v. 75, n. 5, p. 487-491, 1986.

CABRAL, M.F.P.; QUEIROZ, A.J.M.; FIGUEIREDO, R.M.F. Comportamento reológico da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum.) peneirada. **Revista Brasileira de Produto Agroindustriais**. v.4, n.1, p.37-40, 2002.

CARTURAN, G.F. **Guia ABC de Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: ABC, 1999.

CASIMIRO, M.H.; LEAL, J.P.; GIL, M.H.; CASTRO, C.A.N. Análise calorimétrica aplicada a polímeros biológicos. Parte I: Fundamentos teóricos. **Química - Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v.98, p.29-35, 2005.

CAZEDEY, E.C.L. Análise químico-farmacêutica de cloridrato de ciprofloxacino em solução oftálmica. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2009. 179f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CEFALI, L.C.; CHIARI, B. G.; RORIZ, M.A.L.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Influência da concentração de bentonita no comportamento reológico de emulsões. **22º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo, 2008.

CEFALI, L.C., CHIARI, B.G.; MORAES, J.D.D.; ZAMBON, A.P.L.B.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Estabilidade preliminar de emulsões contendo fase oleosa a base de karité, verificação da formação de cristais líquidos com a adição de behenyl alcohol, poliglyceryl-10 pentastearate, sodium stearyl lactylate e avaliação da sua influência na estabilidade da formulação. **23º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo, 2009a.

CEFALI, L.C.; CORRÊA, M.A.; SALGADO, H.R.N.; ISAAC, V.L.B. Estudo do comportamento reológico e da espalhabilidade de emulsão contendo fase oleosa constituída de karité. **56º Jornada Farmacêutica**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2009b.

CHIARI, B.G.; CEFALI, L.C.; RORIZ, M.A.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Influência da concentração de C12-25 acid PEG-8 éster no comportamento reológico de emulsões O/A contendo hidroxyetilcelulose. **55ª Jornada Farmacêutica**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara, 2008.

CHIARI, B.G.; CEFALI, L.C.; ZAMBON, A.P.L.B.; MORAES, J.D.D.; CORRÊA, M.A.; ISAAC, V.L.B. Formação de cristais líquidos e caracterização reológica de formulações cosméticas. **23º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo, 2009.

CORRÊA, M.A. **Cosmetologia teórico e prática**. Apostila do curso de atualização de Cosmetologia. 2009.

CORRÊA, N.M.; CAMARGO Jr, F.B.; IGNÁCIO, R.F.; LEONARDI, G.R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrófilos. **Rev. Bras. Ciên. Farm.**, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helv. Chim. Acta.**, v. 80, p. 1144-1152. 1997.

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

ECCLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, n.123-124, p. 161-82, 1997.

EMBRAPA. **Cultivo de tomate para industrialização**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/>>. Acesso em: 17 de março de 2008.

EREL, O. A novel autometed direct measurement for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin. Biochem.**, v.37, p.277-285, 2004.

FACHIN, D. Temperature and pressure inactivation of tomato pectinases: a kinetic study. 2003. 133f. Tese (Doutorado). Toegepaste Biologische Wetenschappen - Katholieke Universiteit Leuven.

FARIA, E.A.; LELES, M.I.G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T.O. Estudos da estabilidade térmica de óleo e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclet. Quim.** v. 27, p.111-119, 2002.

FARINATTI, P.T.V. Teorias biológicas do envelhecimento: do genético ao estocástico. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v.8, n.4, p.129-138, 2002.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FEAGRI. **Consumidor - Dicas de como melhor comprar e conservar o tomate**. Disponível em: <<http://www.feagri.unicamp.br/tomates/consumidordicas1.htm>>. Acesso em: 17 de Março de 2008.

FERRARI, M. Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxinamato de etilexila e óleo de andiroba (*Carapa guyanensis*) Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2002, 142f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

FERREIRA, S.M.R. Características de qualidade do tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivado nos sistemas convencional e orgânico comercializado na região metropolitana de Curitiba. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004. 249f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FRANZ, T.J. Percutaneous absorption on relevance of *in vitro* data. **J. Invest. Dermatol.**, v. 64, p. 190, 1975.

GALHARDO, N.C.W.; MOREIRA, R.R.D.; PIZZOLITTO, A.C.; ISAAC, V.L.B. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. **I Simpósio Paulista de Farmacognosia**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2007.

GIACOMONI, P. U. Understanding reactive oxygen species. **Cosmetics & Toiletries**, v.122, n. 5, p.36-40, 2007.

GUARATINI, T.; GIANETI, M.D.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Stability of cosmetic formulations containing esters of vitamins E and A: chemical and physical aspects. **Int. J. Pharm.**, v.327, n.1, p.12-16, 2006.

GUILLEN, J.S.Q.; IASA, B.; MATOS, J.R. Contribuição da análise térmica na avaliação do DMAE e seus sais correspondentes e do ácido ascórbico e derivados. Associação Brasileira de Análise Térmica e Calorimetria (ABRATEC). 2006.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farm. Bonaerense**, v.23, n.3, p. 418-24, 2004.

HOWITT, C.A.; POGSON, B.J. Carotenoid accumulatio and function in seeds and non-green tissues. **Plant Cell Environ**, v.29, n.3, p.435-45, 2006.

HUBINGER, S.Z. Estudo farmacognóstico e desenvolvimento de fitocosmético de ação antioxidante dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae – Caesalpinioideae). Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2009. 150f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

IDSON, B. Stability testing of emulsions, I. **Drug & Cosmetics Industry**, v. 151, n.1, p.27, 28, 30, 1993a.

IDSON, B. Stability testing of emulsions, II. **Drug & Cosmetics Industry**, v. 151, n.2, p.38, 40, 42-43, 72, 1993b.

INMETRO, INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO INDUSTRIAL. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos: DOQ-CGCRE 008, 2007. Rio de Janeiro: 2007. 25p.

ISAAC, V.L.B. Desenvolvimento, estabilidade e liberação *in vitro* de preparações lipolíticas. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998. 138f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.81-96, 2008a.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI, L.C.; CHIARI, B.G.; RORIZ, M.A.; CORRÊA, M.A. Concentration influence of bentonite and kaolin in the emulsion rheological behavior. **25th IFSCC Congress**, Barcelona, 2008b.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. **Mech. Ag. Develop.**, v.123, n.7, p. 801-810, 2002.

JEONG, N.H.; SONG, E.S.; LEE, J.M.; LEE, K.B.; KIM, M.K.; YUN, Y.M.; LEE, J.K.; SON, S.K.; LEE, J.P.; KIM, J.H.; HUR, S.Y.; KWON, Y. Preoperative levels of plasma micronutrients are related to endometrial cancer risk. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.88, n.4, p.434-439, 2009a.

JEONG, N.H.; SONG, E.S.; LEE, J.M.; LEE, K.B.; KIM, M.K.; CHEON, J.E.; LEE, J.K.; SON, S.K.; LEE, J.P.; KIM, J.H.; HUR, S.Y.; KWON, Y. Plasma carotenoids, retinol and tocopherol levels and the risk of ovarian cancer. **Acta Obstet. Gynecol. Scand.**, v.88, n.4, p.457-462, 2009b.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. p. 272-280.

KARAKAYA, S.; YILMAZ, N. Lycopene content and antioxidant activity of fresh and processed tomatoes and in vitro bioavailability of lycopene. **J. Sci. Food Agric.**, v. 87, p. 2342-2347, 2007.

KNORST, M. T. Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides*. Lam. DC. Compositae. (Marcela). Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1991. 228f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KIMURA, M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. A Scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leaf vegetable carotenoids. **Food Chem.**, v.78, n.3, p.389-398, 2002.

LE HIR, A. **Noções de farmácia Galênica**. 6. ed. Andrei, 1997.

LEONARDI, G.R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo, Medfarma, 2004. p. 50-52.

LIN, C.H.; CHEN, B.H. Determination of carotenoids in tomato juice by liquid-chromatography. **J. Chromatogr.**, v.1012, p.103-109, 2003.

LIRA, A.M.M. **Estudo da permeação *in vitro* e avaliação térmica de emulgel tópico a base de lapachol**. Recife: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2003. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

MA, W.; WLASCHEK, I.; TANTCHEVA-POOR, L.A.; SCHNEIDER, L.; NADERI, Z.; RAZIWOLF, J.; SCHULLER, K. Chronological ageing and photoageing of the fibroblasts and the dermal connective tissue. **Clin. Exp. Dermatol.**, v.26, n.7, p.592-599, 2001.

MAGALHÃES, J. **Cosmetologia**. Rio de Janeiro, Rubio, 2000. p. 115-118.

MARANZ, S.; WIESMAN, Z.; BISGAARD, J.; BIANCHI, G. Germplasm resources of *Vitellaria paradoxa* based on variations in fat composition across the species distribution range. **Agroforestry Systems**, v.60, p.71–76, 2004.

MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 153-476.

MASSON, D.S. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade físico-química de emulsão O/A quanto à variação de umectantes e à adição de ativos despigmentantes**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2005. 164f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

MERCADANTE, A.Z.; RODRIGUEZ-AWAYA, D. Confirmação da identidade da α -criptoxantina e da incidência de carotenóides minoritários e pró-vitâmnicos A em verduras folhosas verdes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.21, n.2, p.216-222, 2001.

MERCK INDEX, Merck & Co. Inc. 14th. ed. New York: Rohway, 2006. p. 974-975.

MOURA, M.L.; MOURA, M.A.; PINTO, C.M.F.; FINGER, F.L. Amadurecimento de frutos do tomateiro cv. *Santa Clara* e de seu mutante natural *firme*. **Rev. Bras. Armazenamento**, v. 27, n. 2, p. 3-8, 2002.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A.Z. Production of lycopene crystals from tomato paste. **Cienc. Technol. Aliment.**, v.24, n.3, p.440-447, 2004.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochemistry**, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

OHNO, Y.; MIYAJIMA, A.; SUNOUCHI, M. Alternative methods for mechanistic studies in toxicology. Screening of hepatotoxicity of pesticides using freshly isolated and primary cultured hepatocytes and non-liver-derived cells, SIRC cells. **Toxicology Letters**, v. 102, p. 569-573, 1998.

OLIVEIRA, F.F.; PAOLA, M.V.R.; MATOS, J.R. Análise térmica de diferentes amostras comerciais de batons. **Congresso Latinoamericano e Ibérico de Químicos Cosméticos**, Associação Argentina de Químicos Cosméticos, Buenos Aires, 2001.

OLIVER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **J. Chromatogr. A.**, v.881, n.1-2, p.543-555, 2000.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, Biologia Geral, Biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. p 421-424.

PIANOVSKI, A.R.; VILELA, A.F.G.; SILVA, A.A.S.; LIMA, C.G.; SILVA, K.K.; CARVALHO, V.F.M.; MUSIS, C.R.; MACHADO, S.R.P.; FERRARI, M. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) em emulsões cosméticas: desenvolvimento e avaliação da estabilidade física. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v.44, n.2, p.249-259, 2008.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PINTO, J.T. Efeito da estocagem da goiabada a diversas temperaturas sobre os teores de carotenóides e de ácido ascórbico. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

PRIMAVERA, G.; BERARDESCA, E. Clinical and instrumental evaluation of a food supplement in improving skin hydration. **Int. J. Cosm. Sci.**, v.27, n.4, p. 199-204, 2005.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. **Tecnologia Farmacêutica**. 4. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996, v.1, p.600.

PROENÇA da CUNHA, A.; SILVA, A.P.; ROQUE, O.R.; CUNHA, E. **Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2004. p.178.

RAFFO, A.; LA MALFA, G.; FOGLIANO, V.; MAIANI, G.; QUAGLIA, G. Seasonal variations in antioxidant components of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1). **J. Food Comp. Anal.**, v.19, p.11-19, 2006.

RAO, L.G.; RAO, A.V. Carotenoids and human health. **Pharmacol. Res.**, v.55, n. 3, p.207-216, 2007.

RIBEIRO, H.M.; MORAIS, J.A.; ECCLESTON, G.M. Structure and rheology of semisolid O/W creams containing cetyl alcohol/ non-ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 26, n.2, p. 47-59, 2004.

RIEGER, M. Factors affecting absorption of topically applied substances, **Skin permeation: fundamentals and application**, J.L. ZATZ, Wheaton, Allured Publishing Corporation, 1993. p. 33-72.

RODRIGUES, R.S.; GOZZO, A.M.; MORETTI, R.H. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**. v.21, n.2, p.367-378, 2003.

RODRIGUEZ-AWAYA, D.B. **A guide to carotenoid analysis in food**. Washington: ILSI Press, 1999. 64p.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SAURA-CALIXTO, F. A Procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **J. Sci. Food. Agric.**, v.76, p.270-276, 1998.

SASSON, C. S. **Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol**. Curitiba: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná – Curitiba.

SATO, K.; SUGIBAYASHI, K.; MORIMOTO, Y. Species differences in percutaneous absorption of nicorandil. **J. Pharm. Sci.**, v. 80, p. 104-107, 1991.

SCOTTI, L.; VELASCO, M.V.R. **Envelhecimento cutâneo à luz da Cosmetologia: estudo do envelhecimento cutâneo e da eficácia das substâncias ativas empregadas na prevenção**. São Paulo: Tecnopress, 2003. p.22-29, 45-55.

SCHNITZLER, E.; CARVALHO-FILHO, M.A.S.; STADLER, C.C.; VOLPATO, A.M.; IONASHIRO, M. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial (DSC) na caracterização térmica do acetato de dexametazona, excipientes e do creme de dexametazona. **Eclet.Quím.**, v. 26, 2001.

SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. Emulsões. **Cosmet.Toilet.**, v. 12, p. 71-74, 2000.

SENTANIN, M.A.; AMAYA, D.B.R. Teores de carotenóides em mamão e pêsego determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n.1, p.13-19, 2007.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M.. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.

SHAO, A.; HATHCOCK, J.N. Risk assessment for the carotenoids luten and lycopene. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.45, n.3, p.289-298, 2006.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.6, p.1315-21, 1995.

SIES, H.; STAHL, W. Lycopene: A biologically important carotenoid for humans? **Biochemistry and Biophysics**, v.336, n.1, p.1-9, 1996.

SILVA, E.C.; VELASCO, M.V.R.; MATOS, J.R. Análise térmica aplicada à cosmetologia. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** v. 43, n. 3, p. 347-356, 2007.

SILVA, E.C.; SOARES, I.C. Tecnologia de emulsões. **Cosmetics & Toiletries**, v. 8, n.5, p.37-46, 1996.

SILVA, F.C. Reologia do suco de acerola:efeito da concentração e temperatura. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids: Occurrence, biochemical activities, and bioavailability. *In*: PACKER, L.; HIRAMATSU, M.; YOSHIKAWA, T. **Antioxidant food supplements in human health**. San Diego: Academic Press, 1999. p. 183-198.

TAKAHASHI, Y.; KOIKE, M.; HONDA, H.; ITO, Y.; SAKAGUCHI, H.; SUZUKI, H.; NISHIYAMA, N. Development of the short time exposure (STE) test: An *in vitro* eye irritation test using SIRC cells. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 760–770, 2008.

TAVAREZ, C.A.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. **Lebensm-Wiss Technol**, v.27, p.219-224, 1994.

TRABER, M.G.; RALLIS, M.; PODDA, M.; WEBER, C.; MAIBACH, H.I.; PACKER, L. Penetration and distribution of α -tocopherol, α - or γ -tocotrienols applied individually onto murine skin. **Lipids**, v. 33, n.1, p. 87-91, 1998.

USP 31. The United States Pharmacopeia. 31th.ed. Rockville, The United States Pharmacopeial Convention, 2008.

VELLOSA, J.C.R. Avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais de plantas brasileiras e sua contribuição ao estudo da inibição da enzima mieloperoxidase. Araraquara: Universidade Estadual Paulista, 2005. 129f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

WEIGAMANN, H.J.; ULRICH, J.; SCHANZER, S.; JACOBI, U.; SCHAEFER, H.; STERR, Y, W.; LADEMANN, J. Comparison of transepidermal water loss and spectroscopic absorbance to quantify changes of the stratum corneum after tape stripping. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.18, n.4, p.180-185, 2005.

WILLCOX, J.K. Tomatoes and cardiovascular health. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.43, n.1, p.1-18, 2003.

ZAMBON, A. P. L. B.; CHIARI, B. G.; MORAES, J. D. D.; CEFALI, L. C.; CORREA, M.A.; ISAAC, V.L.B.; PECCININI, R. G. Influência do alpha lipoic acid na estabilidade de emulsões O/A contendo filtros solares. **23º Congresso Brasileiro de Cosmetologia, Associação Brasileira de Cosmetologia**, São Paulo, 2009.