

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
INOVADORES PARA INCORPORAÇÃO DE CACAU ORGÂNICO: ESTUDO DA
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

ERICA EMI FUNAGOSHI

ARARAQUARA
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS
INOVADORES PARA INCORPORAÇÃO DE CACAU ORGÂNICO: ESTUDO DA
ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

ERICA EMI FUNAGOSHI

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

ORIENTADOR: PROF. DR. MARLUS CHORILLI

ARARAQUARA
2012

Dedico este trabalho aos meus pais,
à minha irmã e amigos
por tudo.

Agradecimentos

Agradeço a todos que colaboraram direta e indiretamente para a concretização deste trabalho.

Primeiramente, ao Prof. Dr. Marlus Chorilli pela grande oportunidade que me deu, por acreditar, apoiar, pelas palavras sábias.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento e ao Laboratório da Botânica pela ajuda e colaboração na análise da amostra de cacau.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pelo auxílio no preparo e nas análises do extrato, pela contribuição de seus conhecimentos e pela disposição em ajudar.

Ao técnico Dudu pela ajuda no preparo do extrato e pela paciência e a todos do Laboratório de Farmacognosia por serem prestativos.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Oliveira Soares pela imensa ajuda nos experimentos, pela paciência e por estar sempre disposto a ajudar.

À Márcia Oyafuso pela ajuda no diagrama de fases, nos ensaios de reologia e pela paciência.

À Giovana Calixto pela ajuda no ensaio de bioadesão e por estar sempre disposta a ajudar.

À Prof.^a Dr.^a Vera Lucia Borges Isaac por possibilitar o uso do reômetro do Laboratório de Cosmetologia.

A todos do Laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica.

As minhas amigas Barbara, Ingrid, Marcela, Natalia, Fernanda e Lívia, pela amizade e por todos os momentos que fizeram toda a diferença durante todos os anos da faculdade.

À Fapesp, pelo auxílio financeiro.

“De tudo ficarão três coisas: a certeza de estar sempre começando, a certeza de que é preciso continuar, e a certeza de ser interrompido antes de terminar”.

Fernando Sabino

SUMÁRIO

Resumo	07
Lista de tabelas	09
Lista de figuras	10
Introdução	11
Objetivos	19
2.1 Objetivos gerais	20
2.2 Objetivos específicos	20
Desenvolvimento	21
3. Materiais e métodos.....	22
3.1 Materiais	22
3.2 Equipamentos	22
3.3 Metodologia	22
3.3.1 Avaliação da amostra de cacau alcalino em pó	22
3.3.1.1 Caracterização tecidual	22
3.3.1.2 Caracterização dos extratos	23
3.3.1.2.1 Preparação dos extratos	23
3.3.1.2.2 Doseamento dos compostos fenólicos totais	23
3.3.1.2.3 Atividade Antioxidante do extrato.....	24
3.3.2 Desenvolvimento das formulações	24
3.3.2.1 Preparação dos extratos.....	24
3.3.2.2 Desenvolvimento dos sistemas.....	24
3.3.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas	25
3.3.2.4 Seleção das formulações.....	25
3.3.2.5 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	26
3.3.2.6 Determinação do comportamento reológico	26
3.3.2.7 Ensaios de bioadesão.....	26
3.3.3 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos.	26
3.3.3.1 Avaliação visual.	27
3.3.3.2 Teste de centrifuga	27
3.3.3.3 Determinação do pH das formulações envolvidas	27
3.3.3.4 Densidade das formulações.....	27
3.3.3.5 Atividade antioxidante das formulações.....	28
Resultados e Discussão	29
4.1 Avaliação da amostra de cacau alcalino em pó	30
4.1.1 Caracterização tecidual	30

4.1.2 Caracterização dos extratos	31
4.1.2.1 Preparação dos extratos	31
4.1.2.2 Doseamento dos compostos fenólicos totais	32
4.1.2.3 Atividade Antioxidante do extrato.....	35
4.2 Desenvolvimento das formulações	39
4.2.1 Preparação dos extratos	39
4.2.2 Desenvolvimento dos sistemas.....	39
4.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas	41
4.2.4 Seleção das formulações.....	42
4.2.5 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS).....	44
4.2.6 Determinação do comportamento reológico	45
4.2.6.1 Ensaio de escoamento	45
4.2.6.2 Ensaio mecânico-dinâmico ou de oscilação	47
4.2.7 Ensaio de bioadesão.....	49
4.3 Ensaio de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos....	52
4.3.1 Avaliação visual.	52
4.3.2 Teste de centrifuga	52
4.3.3 Determinação do pH das formulações envolvidas	52
4.3.4 Determinação da densidade relativa.....	53
4.3.5 Atividade antioxidante das formulações.....	53
Conclusões.....	57
Referências bibliográficas	59

RESUMO

Ultimamente várias áreas da ciência vêm se unindo a fim de compreender, elucidar, retardar e reverter o processo do envelhecimento da pele. Tal processo deve ser estudado, pois as mudanças no aspecto exterior podem revelar disfunções que ocorrem internamente, além de trazer conseqüências psíquicas sobre o comportamento da pessoa, tanto diante de si mesma como diante das outras. A utilização de matérias-primas naturais orgânicas em formulações farmacêuticas e cosméticas segue uma tendência de mercado, haja vista o grande impulso que o mercado orgânico tem ocasionado na economia. Dentre estas matérias-primas, destaca-se a utilização do cacau orgânico que, pelo fato de ser rico em compostos polifenólicos e taninos condensados, acredita-se apresentar potencial ação antioxidante. Associados a sistemas nanoestruturados inovadores, como os sistemas líquido-cristalinos constituídos por silicones formadores de filme, a ação antioxidante do cacau orgânico pode, dessa forma, ser potencializada. Este trabalho tem como objetivos desenvolver e caracterizar sistemas líquido-cristalinos acrescidos de extrato de semente de cacau orgânico, avaliar a estabilidade físico-química e a atividade antioxidante das formulações obtidas. Realizou-se a caracterização do pó de cacau por microscopia óptica. A partir do pó do cacau, obteve-se extratos hidroalcóolicos do pó, a partir do qual foram quantificados compostos fenólicos utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e determinada a atividade antioxidante com base na ação seqüestrante do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH). Posteriormente, o extrato foi incorporado em um sistema constituído por ácido oléico e polioxietileno 20 cetil éter, o qual foi caracterizado estruturalmente empregando análises de microscopia de luz polarizada, espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS) e comportamento reológico. Após a caracterização do sistema, foi verificada a estabilidade físico-química do sistema, bem como a atividade antioxidante das formulações acrescidas ou não do extrato de cacau. Os resultados evidenciaram que a amostra de cacau orgânico em pó contém cerca de 200 mg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico; 21,225 µg/mL de IC₅₀ do DPPH para os extratos etanólicos. Para um segundo lote de cacau orgânico, o extrato aquoso apresentou IC₅₀ do DPPH 15,823 µg/mL. O sistema desenvolvido apresentou fases líquido-cristalinas do tipo hexagonal e cúbica e comportamento de fluido pseudoplástico tixotrópico. De acordo com as análises de estabilidade físico-química, as formulações apresentaram-se estáveis durante o período de tempo analisado. A incorporação de 0,6% de extrato de cacau orgânico na formulação atingiu a IC₅₀ do DPPH. Segundo os resultados da atividade antioxidante das

formulações, observou-se que a atividade antioxidante do extrato foi mantida em todas as fases do sistema estudado (cúbica, hexagonal e microemulsão), sendo observado inclusive um ligeiro aumento na atividade antioxidante das formulações de fase cúbica. Os resultados sugerem que o sistema empregado pode ser promissor para a incorporação do extrato de cacau orgânico, visando a sua atuação na prevenção do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: sistemas nanoestruturados; caracterização estrutural; cacau orgânico; compostos fenólicos; atividade antioxidante.

Lista de tabelas

Tabela 1.	Quantidade de extrato seco de semente de cacau obtido a partir dos solventes hidroalcoólicos	31
Tabela 2.	Valores de absorvância (em 765 nm) obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu ($\mu\text{g/mL}$)	32
Tabela 3.	Quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato equivalentes à ácido gálico (mg/mL)	33
Tabela 4	Valores de absorvância (em 765 nm) obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de quercetina com o reagente de Folin-Ciocalteu ($\mu\text{g/mL}$)	34
Tabela 5.	Quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato equivalentes à quercetina (mg/mL)	35
Tabela 6.	Porcentagens dos componentes das formulações	43
Tabela 7.	Parâmetros para determinação estrutural dos sistemas, obtidos por SAXS.	44
Tabela 8	Força bioadesiva das formulações sem a incorporação de cacau orgânico	49
Tabela 9.	Força bioadesiva das formulações com a incorporação de cacau orgânico	50
Tabela 10.	pH das formulações	52
Tabela 11.	Densidade das formulações	53
Tabela 12.	Porcentagem de inibição do DPPH das formulações não acrescidas de cacau	54
Tabela 13.	Porcentagem de inibição do DPPH das formulações incorporadas de cacau	54

Lista de figuras

Figura 1.	Grãos de amido visualizados em microscopia óptica (esquerda) e em microscópio de luz polarizada (direita)	30
Figura 2.	Compostos fenólicos (esquerda) e mucilagem (direita)	30
Figura 3.	Curva analítica do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu	32
Figura 4.	Curva analítica da quercetina com o reagente de Folin-Ciocalteu	34
Figura 5.	Gráfico da % de inibição do DPPH x concentração do extrato (mg/mL) para os extratos E1, E2, E3, E4, S1 E S2	36
Figura 6.	Gráfico da % de inibição do DPPH x concentração do extrato (mg/ml) para o extrato S3.	37
Figura 7.	Inibição do DPPH (A) extrato solubilizado em água, (B) e (C) extrato solubilizado em álcool etílico 70%.	38
Figura 8.	Diagrama de fases de pontos. SBVT: sistema de baixa viscosidade transparente, SAVT: sistema de alta viscosidade transparente, SLT: sistema líquido transparente, SO: sistema opaco, SF: separação de fases, H/L: fase de transição hexagonal/lamelar	40
Figura 9.	Diagrama de fases de linhas. SBVT: sistema de baixa viscosidade transparente, SAVT: sistema de alta viscosidade transparente, SLT: sistema líquido transparente, SO: sistema opaco, SF: separação de fases.	41
Figura 10.	Estruturas semelhantes a cruz-de-malta (esquerda) e estrias (direita)	42
Figura 11.	Diagrama de fases e as formulações selecionadas	43
Figura 12	Curva de fluxo: velocidade de cisalhamento X tensão de cisalhamento. Formulação 22 (esquerda) e formulação 23 (direita).	46
Figura 13.	Varredura de tensão: Tensão de cisalhamento (Pa) x G' (Pa), G" (Pa) para a formulação 22 (esquerda) e 23 (direita)	48
Figura 14.	Varredura de frequência: Frequência (Hz) x G' (Pa), G" (Pa) para a formulação 22 (esquerda) e 23 (direita)	48
Figura 15.	Gráfico de Barras dos resultados da Força bioadesiva (N) para cada formulação	52
Figura 16.	Gráfico de Barras dos resultados da Área (N. sec) para cada formulação	51
Figura 17.	Avaliação da porcentagem inibição do radical DPPH das formulações durante um período de 21 dias.	55

O processo de envelhecimento altera a estrutura e a função dos órgãos. No caso da pele, que é um órgão externo, também ocasiona modificação do seu aspecto. O envelhecimento cutâneo é multifatorial, decorrente de um processo degenerativo complexo, que afeta e irá atingir inevitavelmente a todos. É muito importante estudar estas alterações na pele que ocorrem com o envelhecimento, principalmente quando ocorrem precocemente, não somente porque as mudanças no aspecto exterior revelam, frequentemente, as disfunções que ocorrem, mas porque a aparência traz conseqüências psíquicas sobre o comportamento da pessoa, tanto diante de si mesma como diante das outras (RIEGER, 1996; LÉVÈQUE, 1997; MAKRANTONAKI, 2007).

Sendo assim, o estudo do rejuvenescimento da face vem merecendo mais e mais esforços no sentido de retardar e reverter o processo natural de envelhecimento da pele. Existe, inclusive, um grande esforço empreendido por diversas áreas como geriatria, cosmiatria, fisioterapia, cirurgia plástica e até mesmo áreas da economia, no sentido de compreender, elucidar, prevenir, retardar e mesmo reverter o processo de involução natural do envelhecimento (ARAÚJO *et al.*, 1995, MCCULLOUGH, 2006).

São utilizados hoje inúmeros princípios ativos nas formulações com o objetivo de obter rejuvenescimento da face, colo e dorso das mãos. São alternativas não cirúrgicas que permitem tratar rugas e manchas resultantes do envelhecimento intrínseco e do fotoenvelhecimento da pele. A aplicação tópica de substâncias eficazes é muito importante para manter a textura saudável da pele, até mesmo como tratamento pós-cirúrgico complementar, pois a cirurgia plástica não tem atuação a nível histológico e por isso dificilmente melhora a qualidade da pele do paciente (ARAÚJO *et al.*, 1995, LINTNER, 2009).

Dentre as substâncias empregadas no mercado com o objetivo de combater o envelhecimento cutâneo têm-se os antioxidantes (SANTOS, 2011).

O processo de oxidação está relacionado à formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Radical livre é qualquer espécie capaz de existir independentemente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Segundo Harris (2006), dentre as fontes de radicais livres existentes, tem-se:

- ✓ Fontes biológicas como flavinas (FADHs), hemoglobina, catecolaminas, tetra-hidropteridinas, nitro-compostos aromáticos e melanina;
- ✓ Venenos como paraquat, adriamicina, antamicina;
- ✓ Complexos de cobre e ferro, hidroquinonas, tióis, glutatona;
- ✓ Radiação ionizante e luz ultravioleta (UV).

A reatividade depende do radical em estudo e do substrato presente. De acordo com Harris (2006), a peroxidação lipídica pode ocasionar:

- ✓ Comprometimento das membranas celulares e do manto hidrolipídico;
- ✓ Desativação de sítios ativos de enzimas e receptores celulares, decorrente da oxidação de resíduos de aminoácidos;
- ✓ Lesões em DNA, levando ao comprometimento da codificação para as sínteses protéicas (inviabilidade celular);
- ✓ Lesões mutagênicas (tumores);
- ✓ Surto oxidativo, degradação de catecolaminas, da cadeia respiratória da mitocôndria e do sistema P450 retículo endoplasmático.

Sabe-se que o organismo humano possui eficientes mecanismos de defesa contra os radicais livres, caracterizados por um conjunto de enzimas e compostos antioxidantes que mantém essas espécies altamente reativas em concentrações subtóxicas (CADENAS, 1989). Quando ocorre um desequilíbrio entre os processos de produção e destruição das espécies reativas de oxigênio induzido, por exemplo, pela ação da radiação UV, estabelece-se uma condição em que o ataque oxidativo das biomoléculas é favorecido, o que pode propiciar diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o envelhecimento cutâneo (HARMAN, 1992).

A relação causal observada entre estresse oxidativo, diversas patologias e processos degenerativos em humanos despertou o interesse para a exploração de moléculas com atividade antioxidante, capazes de interferir com a geração dos radicais livres de oxigênio ou com as reações por eles desencadeadas (PYTEL et al., 2005).

Para a determinação da atividade antioxidante dos diversos compostos, podem ser utilizadas metodologias tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Dentre os diversos métodos *in vitro* existentes, tem-se o método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-

picril-hidrazil (DPPH), baseado na transferência do átomo de hidrogênio e elétrons. Na presença de compostos antioxidantes, há o sequestro deste radical, reduzindo-o. O DPPH é um radical estável e ao sofrer redução, perde sua coloração (de violeta a amarelo-pálido), cuja mudança é medida espectrometricamente a 517 nm, permitindo a mensuração da capacidade antioxidante de uma determinada substância.

Seguindo a tendência de utilização de substâncias inovadoras em formulações tópicas, foram lançadas no mercado matérias-primas naturais orgânicas. De modo geral, "natural" sinaliza que os ingredientes não foram significativamente modificados em sua forma original na natureza. Já o termo "orgânico" é regulamentado e somente pode ser utilizado por empresas que receberam aval de uma organização certificadora reconhecida e independente, ou seja, existe a garantia de que o produto realmente é orgânico. Para ser "orgânico", além de ser natural, o produto e a sua produção não podem prejudicar a vida animal e o meio ambiente. Tais produtos também dão importância aos ingredientes que vêm de origem animal. A preocupação é que eles não devem ser obtidos a partir da morte ou maus tratos do animal e sim da produção natural do ser, como o mel das abelhas, flores, folhas e frutas (RIBEIRO, 2010).

Embora esta linha já tenha seus públicos fiéis na Europa e Estados Unidos, o Brasil vem crescendo neste setor e algumas marcas fortes já apelam para o marketing verde. Algumas delas, inclusive, têm criado tabelas com informações sobre a origem e o descarte da matéria-prima das embalagens e seus produtos, com a intenção de reduzir à zero sua emissão de gás carbono (RIBEIRO, 2010).

Dentre as matérias-primas orgânicas que vêm sendo utilizadas com destaque no mercado em formulações antienvhecimento destaca-se o cacau – *Theobroma cacao* L. – planta arbórea de pequeno porte da família *Sterculiaceae*, originária da América tropical (COSTA, 2002; SIMÕES, 2007).

Seu cultivo é feito no sudeste asiático, África e América do Sul, principalmente no Brasil e Equador. A cultura firmou-se, de início, no continente americano em toda zona tropical como México, Equador, Venezuela, etc., e em particular no Brasil, que no final do século passado, acabou por ser o primeiro produtor mundial. Posteriormente, a cultura espalhou-se pela África Ocidental que hoje é responsável

por dois terços da colheita mundial, a qual ultrapassa 1,5 milhões de toneladas (COSTA, 2002).

O vegetal é caracterizado pela inserção direta dos frutos no tronco e ramos; e pelos frutos indeiscentes e volumosos. As flores aparecem no tronco e ramos principais. Os frutos são curtamente pedunculados, grandes, de 12 a 20 cm por 6 a 10 cm, alongados e indeiscentes, drupáceos e vagamente pentagonais. Colhidos os frutos, estes são partidos e suas sementes são privadas. As sementes são ovóides, achatadas, com tamanho de 10 a 20 mm de comprimento por 7 a 8 mm de largura, com a extremidade hilar mais grossa e deprimida (COSTA, 2002).

Quanto à caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de cacau, foram observados que o citoplasma contém vários elementos estruturais de difícil identificação ao microscópio óptico. As células que formam a epiderme dos cotilédones apresentam um grande vacúolo suavemente positivo ao Naphthol Blue Black (NBB) e ao Azul de Toluidina (AT) pH 4. No mesófilo, a maior parte do parênquima cotiledonar é constituída por células de reserva, como o tipo de reserva predominante em *T. cacao* é lipídeo, as células do parênquima apresentaram diversos glóbulos lipídicos circundando o vacúolo protéico (LENCI, 2002).

Há grandes quantidades de células fenólicas que se encontram em regiões próximas aos vasos condutores ou estão dispersas pelo parênquima, sendo identificadas pela cor magenta translúcida (em cortes a fresco) ou pela ortocromasia ao AT pH 4, corando-se em verde brilhante. Grupos de células perpendiculares à epiderme podem acompanhar os vasos e seus conteúdos vacuolares assumem aspecto vesiculados em algumas preparações. Além disso, nessas células distinguem-se pequenos grãos de amido birrefringentes sob luz polarizada. Os compostos pécticos das paredes de células cotiledonares de *T. cacao* apresentaram metacromasia ao AT, proporcionando coloração arroxeadada, as paredes do xilema foram destacadas pelo AT, corando-se em verde e células da epiderme dos cotilédones apresentaram reação acentuada de radicais aniônicos que preenchem o citoplasma. Na periferia destas células, detectou-se a presença de glóbulos mais corados pelo AT (LENCI, 2002).

Biehl *et al* (1977) descreveram dois tipos celulares compondo o mesófilo cotiledonar de sementes de *T. cacao*: células de estoques de proteínas e lipídeos em maior número e células de polifenóis dispersas entre as anteriores, ocupando regiões próximas aos vasos.

O cacau é constituído de triglicerídios e ácidos graxos (50%), compostos polifenólicos, dentre os quais taninos condensados (5 a 10%) e bases púricas representadas particularmente pela teobromina (1 a 2%) e cafeína (0,5%) (SIMÕES, 2007).

Visando aplicação tópica, a principal ação do cacau está relacionada ao efeito antioxidante. A literatura relaciona a presença de compostos fenólicos ao potencial efeito antioxidante (SOUSA *et al.*, 2007).

Tal efeito antioxidante do cacau orgânico possivelmente pode ser potencializado pela sua incorporação em sistemas líquido-cristalinos. Os cristais líquidos (CLs) são conhecidos desde 1889, quando Lehmann descreveu um estado intermediário na transformação térmica a partir do estado sólido para o líquido. Em 1922, G. Friedel usou o termo “estado mesomórfico” (*mesos* – intermediário e *morphé* – forma) para definir este quarto estado da matéria; com isso, os cristais líquidos passaram a ser denominados como fases mesomórficas ou mesomórficas cristalinas. Apresentam, portanto propriedades e características de sólidos e líquidos (FERRARI, 1998; FERRARI *et al.*, 2004; MORAIS, 2006).

Esta fase intermediária apresenta propriedades características tanto de sólidos quanto de líquidos. Possui ordem estrutural, rigidez e ligações definidas como os sólidos e mobilidade, regiões desordenadas e fluidas como os líquidos, ou seja, esta mesofase tem propriedades mecânicas típicas do estado líquido, como fluidez e tensão superficial, mas certa ordem molecular; dessa forma, constitui uma fase fluida ordenada. A mesofase líquido-cristalina exhibe ainda propriedades ópticas típicas do estado cristalino, como anisotropia (direção óptica), birrefringência e dicromismo (FERRARI, 1998; FERRARI *et al.*, 2004; MORAIS, 2006).

Um sistema é anisotrópico quando todas as direções de propagação da luz não são equivalentes no seu interior e se a mesma propriedade é observada com intensidade variável em função da direção pela qual é avaliada (FERRARI, 1998).

A birrefringência, também conhecida como refração dupla, é encontrada em cristais, CLs ou em qualquer sistema anisotrópico. Ela é ocasionada pela variação da velocidade de uma onda de luz em diferentes direções. Um feixe individual de luz branca penetrando em um material separa-se em dois feixes, os quais são polarizados e vibram à ângulos retos, um em relação ao outro (FERRARI et al., 2004).

O dicromismo ocorre quando um componente de luz polarizada é absorvido mais fortemente que o outro. Em parte, ele irradia para o CL quando este é iluminado com luz natural. A coloração que apresenta, ao microscópio polarizado, é resultado da estrutura ordenada das moléculas, que por sua vez é semelhante àquela dos cristais verdadeiros. Quando a luz é branca, uma mistura de todas as cores reluz sobre um cristal líquido, a maioria das cores consegue atravessá-lo e uma pequena faixa de comprimento de onda é refletida e o cristal parece com a cor desses comprimentos de onda (FERRARI et al., 2004).

A fase líquida cristalina é termodinamicamente estável e representa o estado de fusão incompleto. A maioria dos compostos que apresentam este comportamento tem moléculas alongadas e possuem um ou mais grupos polares. Tais moléculas tendem a arranjar-se paralelamente, mantendo-se próximas por forças de Van der Waals (FERRARI et al., 2004; MORAIS, 2006).

Podem-se dividir os CLs em duas principais classes: os termotrópicos e os liotrópicos. Os termotrópicos são formados pela influência da temperatura, são pouco estáveis e são substâncias orgânicas com estrutura molecular simbolizada pelos ésteres colestéricos (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

As primeiras observações de cristais líquidos liotrópicos foram feitas em 1950 por Elliott e Ambrose. Eles observaram a formação de uma fase líquida birrefringente dissolvendo-se polibenzil-L-glutamato (PBLG) em clorofórmio. Estes cristais líquidos são misturas de compostos anfifílicos em um solvente, em geral a água. Os compostos anfifílicos são caracterizados por possuírem na mesma molécula dois grupos que diferem grandemente em suas propriedades de solubilidade. Uma parte da molécula é hidrofílica, altamente solúvel em água ou outros solventes polares, enquanto a outra parte é hidrofóbica, altamente solúvel em

hidrocarbonetos ou solventes não-polares. Usualmente, pode-se dizer que estas moléculas são formadas por uma cabeça polar e uma cauda carbônica (BECHTOLD, 2005).

Dentre as mesofases liotrópicas, as mais importantes e comumente observadas são: lamelar (“neat phase”), hexagonal (“middle phase”) e cúbica (“cubic phase”) (URBAN, 2004; MORAIS, 2006).

Uma das maneiras de classificar as fases líquido-cristalinas é determinando a isotropia óptica da mesofase. Sob um plano de luz polarizada, a amostra é anisotrópica se for capaz de desviar o plano de luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Mesofases lamelares e hexagonais são anisotrópicas, enquanto as cúbicas são isotrópicas (URBAN, 2004; MORAIS, 2006).

Dentre os tipos de cristais líquidos encontrados nos produtos cosméticos, os liotrópicos são os mais predominantes e formam-se espontaneamente em muitos tipos de sistemas emulsionados. Quando presentes, por exemplo, na interface de uma emulsão A/O, aumentam a estabilidade da emulsão, pois promovem aumento na rigidez da membrana interfacial (FERRARI, 1998; MORAIS, 2006).

A utilização de cristais líquidos em cosméticos apresenta vantagens funcionais relacionadas ao fato de: promoverem liberação controlada de substâncias ativas; incorporarem princípios ativos em matrizes líquido-cristalinas ou mesmo em formulações que os contenham, pois os cristais líquidos protegem as substâncias ativas sensíveis à degradação térmica ou fotodegradação; promoverem aumento da retenção de água no estrato córneo proporcionando aumento na hidratação cutânea (MORAIS, 2006).

Embora veículos como os sistemas líquido-cristalinos possam aumentar a estabilidade das substâncias veiculadas, o emprego progressivamente maior de princípios ativos nas indústrias cosmética e farmacêutica com finalidade de prevenir e tratar alterações cutâneas carece não somente de estudos biológicos que avaliem os seus possíveis efeitos benéficos na pele, mas também de estudos que avaliem a estabilidade química dessas substâncias no produto final (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 1997).

OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo desta pesquisa foi desenvolver um sistema nanoestruturado para incorporação do extrato de semente de cacau orgânico que para a utilização desta matéria-prima vegetal no tratamento do envelhecimento cutâneo, mediante aumento de sua atividade antioxidante.

2.2 Específicos

- Desenvolver e caracterizar sistemas líquido-cristalinos acrescidos de extrato de semente de cacau orgânico;
- Padronizar quantidade de extrato de cacau orgânico;
- Avaliar a estabilidade físico-química dos sistemas líquido-cristalinos;
- Analisar a atividade antioxidante das formulações obtidas.

3. Material e Métodos

3.1 Reagentes e Matérias-primas

Água destilada, água Milli-Q, ácido oleico (Synth[®], Brasil), ácido gálico, cacau orgânico alcalino em pó Via Farma[®] lote 031214 e 034221 (Fabricante Barry Callebaut[®]), carbonato de sódio, corante azul de toluidina, etanol (Synth[®], Brasil), Hexano (Synth[®], Brasil), hipoclorito de sódio, metanol (Synth[®], Brasil), polioxietileno 20 cetil éter (Brij 58[®]), quecertina, reagente Folin-Ciocalteu, 1,1-difenil-2-picrilhidrazila – DPPH (Fluka[®], Buchs, Suíça).

3.2 Equipamentos

Analisador de textura TA.XTplus –Stable Micro Systems[®], balança Mettler[®] modelo H10, balança semi-analítica Micronal[®] B160, banho termostaticado Fanem[®] – Mod.100, banho ultrassônico Unique[®], centrífuga Fanem[®] 204N, centrífuga Sorvall TC6 Du Pont[®], espectrofotômetro U-2000 Hitachi[®], espectrofotômetro U-2001 Hitachi[®], evaporador rotativo Marconi[®] MA120, microscópio óptico Primo Star Ziess[®], microscópio de luz polarizada Jenamed 2, Carl Zeiss, peagômetro digital PG1800 Gehaka[®], reômetro de tensão controlada Carri Med[®] CSL 100.

3.3 Metodologia

3.3.1 Avaliação da amostra de cacau alcalino em pó

3.3.1.1 Caracterização tecidual

Foi utilizada uma pequena quantidade da amostra de cacau que foi previamente intumescida e descolorida com hipoclorito de sódio. Para a montagem da lamina, foi usado corante Azul de Toluidina (AT) e tampão pH 4,0.

A lâmina preparada foi visualizada em microscópio óptico Primo Star Ziess[®], buscando características descritas por Lenci (2002).

3.3.1.2 Caracterização dos extratos

3.3.1.2.1 Preparação dos extratos

As amostras de cacau em pó foram previamente desengorduradas com hexano. Para isso, utilizou-se 1 g da droga vegetal e 5 mL de hexano, foram levadas ao banho ultrassônico por 20 minutos. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm. Após a retirada do sobrenadante, a amostra desengordurada foi levada na capela de exaustão para remoção do hexano residual.

Foram avaliadas extrações com duas soluções hidroalcoólicas: (v/v) e etanol 70% (v/v).

Em triplicata, foram adicionadas 10 mL da solução de metanol 80% na amostra, deixando por 20 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi retirado e filtrado sob papel. Este procedimento da extração foi feito três vezes. O filtrado foi levado para secagem na capela de exaustão e no dessecador com sílica gel. O mesmo procedimento foi feito com a solução de etanol 70%.

3.3.1.2.2 Doseamento de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado segundo metodologia adaptada de Singleton e Rossi (1965), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e curva analítica de ácido gálico e quercetina.

Para isto, alíquotas de 20 μL de amostra (extrato ou padrão solubilizado nas soluções hidroalcoólicas nas seguintes concentrações: 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 0,50 $\mu\text{g/mL}$, 0,75 $\mu\text{g/mL}$, 1,00 $\mu\text{g/mL}$ e 1,25 $\mu\text{g/mL}$) foram adicionadas a 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu e 1,58 ml de água. Após 8 minutos, adicionou-se ao meio 300 μL de solução de carbonato de sódio 20% (Na_2CO_3) e agitou-se. Depois de 2h de repouso em temperatura ambiente, foram feitas as leituras da absorbância das amostras medidas em espectrofotômetro UV/Vis em 765 nm.

3.3.1.2.3 Atividade Antioxidante do extrato

A capacidade antioxidante dos extratos foi determinada segundo metodologia de Rufino et al (2007) através do teste com o radical livre DPPH, por meio do sequestro desses radicais livres. Foi preparada uma solução de DPPH a 0,06 mM em etanol absoluto. Para a leitura dos extratos, foram utilizadas as mesmas soluções e concentrações empregadas no teste de quantificação de fenólicos totais. Para tal, adicionou-se 3,9 mL de solução de DPPH em 100 µL das soluções do extrato e aguardou-se 30 minutos para iniciar a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda 517 nm. Além da solução com o extrato, foi realizada a leitura da solução controle (branco) contendo etanol 70% (v/v) e solução de DPPH.

3.3.2 Desenvolvimento das formulações

3.3.2.1 Preparação do extrato

Na preparação do extrato a ser incorporado na formulação, utilizou-se o etanol 70% (v/v) como solvente. Primeiramente, o cacau orgânico em pó foi desengordurado com hexano e filtrado. Foram utilizados 70 g do cacau orgânico em pó adicionado de 300 mL de hexano, e levados ao banho ultrassônico por 20 minutos. A torta foi levada para eliminação do hexano residual na capela de exaustão. Posteriormente, extraiu-se três vezes com a solução de etanol (700 mL da solução de etanol por 20 minutos em banho ultrassônico), filtrou-se e concentrou-se o extrato no rotaevaporador. Em seguida, o extrato foi levado para secagem na capela de exaustão e no dessecador.

3.3.2.2 Desenvolvimento dos sistemas

Para o desenvolvimento das formulações, os componentes (fase oleosa – ácido oléico e tensoativo – Brij 58[®]) foram pesados em balança semi-analítica e analítica e transferidos para um frasco transparente com tampa em quantidades adequadas de tensoativo e óleo (relações de T/O na faixa de 1:9 até 9:1.), sendo em seguida realizada a titulação com água (fase aquosa).

Os sistemas foram obtidos por mistura direta dos componentes aquecidos em banho termostaticado a 45° C visando melhor homogeneização principalmente daqueles com alta viscosidade, seguida de leve homogeneização. Durante o processo de titulação, os sistemas formados e suas consistências foram analisados visualmente, contra fundo escuro. Foram calculadas as concentrações de cada componente da formulação, obtendo-se misturas que foram utilizadas na delimitação das diferentes regiões existentes no diagrama de fases. Os sistemas foram classificados juntamente com os resultados obtidos na microscopia de luz polarizada como: fase de transição hexagonal/ lamelar (H/L), sistema de alta viscosidade transparente (SAVT) campo escuro, sistema de alta viscosidade transparente (SAVT) fase hexagonal, sistema de baixa viscosidade transparente (SBVT) campo escuro, sistema de baixa viscosidade transparente (SBVT) fase hexagonal, sistema líquido transparente (SLT) fase hexagonal, sistema opaco (SO) e separação de fases (SF).

3.3.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas

Através da microscopia de luz polarizada (MLP), foram analisadas as formulações colocando-se uma pequena quantidade das formulações sobre lâmina de vidro e coberta com lamínula. Foi avaliada a homogeneidade da dispersão e, com auxílio de polarização, observou-se a presença de área de anisotropia, indicativo da presença de cristais líquidos. A análise foi realizada a temperatura ambiente.

3.3.2.4 Seleção das formulações

A seleção das formulações foi realizada a partir da análise do diagrama de fases construído.

Para a incorporação do cacau nas formulações, solubilizou-se o extrato seco de cacau orgânico na fase aquosa do sistema a 0,06% de concentração, uma vez que foi a IC₅₀ do extrato.

3.3.2.4 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

O SAXS foi realizado na estação de medidas D11-A SAS do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas-SP. A linha é equipada com monocromador do tipo Si (111), com comprimento de onda de 1.408 Å.

3.3.2.5 Determinação do comportamento reológico

Os sistemas foram analisados por medidas reológicas utilizando reômetro de tensão controlada Carri Med CSL 100, modelo CLS 100, com dispositivo placa – placa de 20 mm de diâmetro, empregando ensaios de escoamento e mecânico-dinâmicos ou de oscilação. Foram analisadas as formulações H1 (10% de óleo, 40% de tensoativo e 50% de água) e H2 (20% de óleo, 40% de tensoativo e 40% de água). No ensaio de escoamento, realizou-se um estudo da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento na região de 0 a 100 s⁻¹. Nos ensaios reológicos por solicitação oscilatória, as medidas foram realizadas em função da frequência (0 a 100 Hz), aplicando uma tensão de 5 Pa.

3.3.2.6 Ensaios de bioadesão

A força bioadesiva cutânea foi avaliada, em termos da força necessária para separar as formulações da pele da orelha do porco. A força máxima de desprendimento foi analisada em um texturômetro *Stable Micro Systems TA-XTplus*. Antes do teste, a pele foi hidratada em solução fisiológica (NaCl 0,9%) por um tempo de 30 minutos. Após esse tempo, a pele era posicionada com auxílio de elástico na probe (prova analítica). As formulações foram aquecidas em banho termostaticado a temperatura de 32 °C e após a atingir a temperatura, as amostras foram colocadas abaixo da probe para o início do ensaio bioadesivo.

Estes ensaios foram avaliados sob as seguintes condições: força (Trigger force) de 0,002 N para amostras viscosas, 0,01N para as amostras semi-sólidas e 0N para amostras líquidas; e por tempo de contato de 60 s.

3.3.3 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos

3.3.3.1 Avaliação visual

As amostras foram observadas visualmente quanto às alterações do tipo: cor, separação de fases, homogeneidade, semanalmente no período de 1 mês, na temperatura ambiente.

3.3.3.2 Teste de centrifuga

A avaliação da estabilidade frente à centrifugação foi realizada, empregando-se 5 gramas de cada amostra em estudo, centrifugando-as a 3000 rpm, por 30 minutos.

3.3.3.3 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

A medida de pH foi realizada em peagômetro, utilizando-se amostras diluídas em água destilada (5%).

3.3.3.4 Densidade das formulações

A densidade relativa foi determinada pelo método do picnômetro. Primeiramente, pesou-se o picnômetro vazio; logo após, pesou-se o mesmo com água e depois com a amostra. A partir de então, realizou-se o cálculo da densidade da água e da densidade da amostra para, em seguida, fazer-se o cálculo da densidade relativa através da equação 1 (FARMACOPÉIA BRASILEIRA,2010):

$$\delta \text{ relativa} = \frac{\frac{\text{massa}_{\text{amostra}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}}{\frac{\text{massa}_{\text{água}} - \text{massa}_{\text{picnômetro}}}{V_{\text{picnômetro}}}} \quad (1)$$

3.3.3.5 Atividade antioxidante das formulações

A capacidade antioxidante das formulações foi determinada com a mesma metodologia que foi realizada nos extratos. Pesou-se 1g da formulação e solubilizou-se em 1 mL de álcool etílico 70%. Partindo desta solução, retirou-se uma alíquota de 100 μ L para a realização da reação com o radical livre DPPH. Através das leituras da absorbância realizadas a 517 nm foram feitos os cálculos das porcentagens de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da amostra de cacau alcalino em pó

4.1.1 Caracterização tecidual

Para a caracterização da amostra de cacau foi usada a mesma metodologia empregada por Lenci (2002), utilizando o corante AT. Devido ao pó estar finamente dividido, certas características estruturais presentes na semente do cacau descritas na literatura citada não puderam ser evidenciadas.

Na amostra de cacau orgânico em pó, foram observados compostos fenólicos, grãos de amido e mucilagem, conforme esperado em amostras de cacau (Figuras 1 e 2).

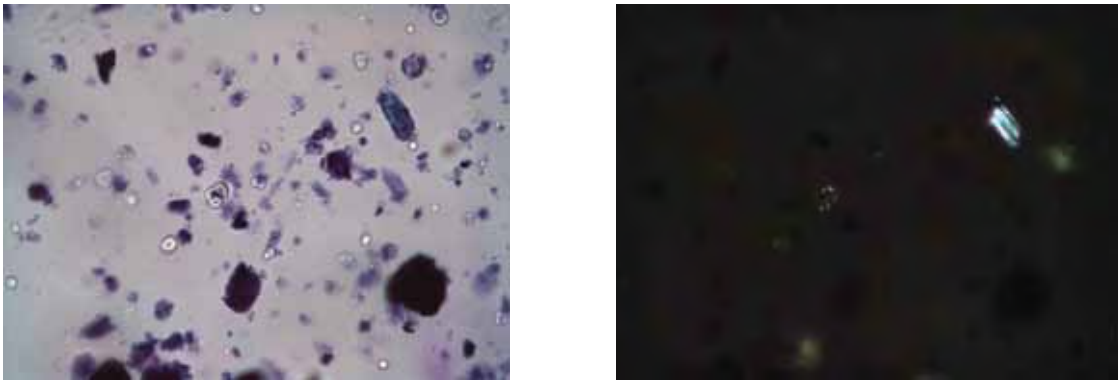


Figura 1. Grãos de amido visualizados em microscopia óptica (esquerda) e em microscópio de luz polarizada (direita)

Em sementes maduras é comum a presença de amido como material de reserva, armazenado como grânulos cristalinos no citoplasma (WERKER, 1997).

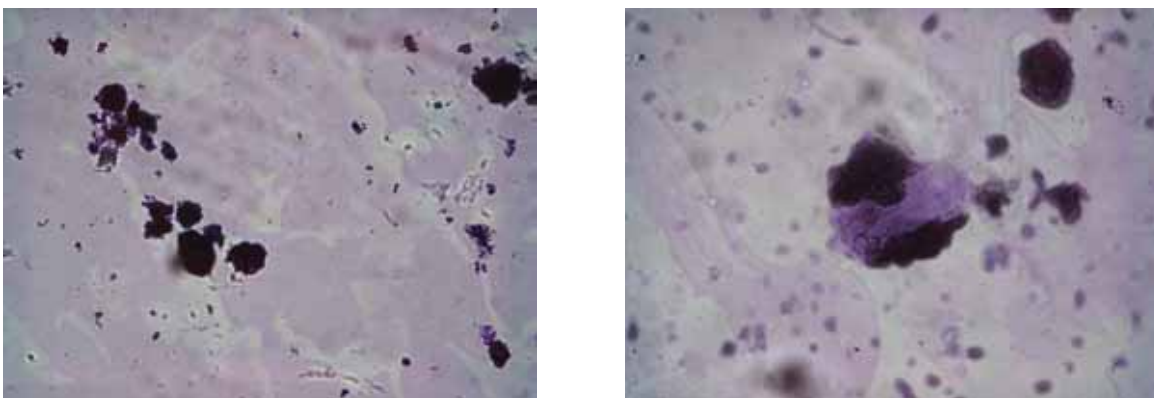


Figura 2. Compostos fenólicos (esquerda) e mucilagem (direita)

4.1.2 Caracterização dos extratos

4.1.2.1. Preparação dos extratos

Primeiramente foram preparados em triplicada extratos metanólicos (E1, E2 e E3) e um extrato etanólico (E4). Foram obtidos de 0,174 g a 0,236 g de extrato seco e desengordurado.

A partir dos resultados de fenólicos totais, verificou-se que o extrato etanólico apresentou maior quantidade de compostos antioxidantes. Por isso, posteriormente foram preparados extratos etanólicos em triplicata (S1, S2 e S3). Os resultados variaram de 0,083 g a 0,107 g de extrato seco e desengordurado.

Como foi utilizado 1g da droga vegetal (cacau orgânico em pó), do extrato metanólico foi obtido em média 20% de rendimento enquanto que para o extrato etanólico, obteve-se cerca de 10% de rendimento. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Quantidade de extrato seco de semente de cacau obtido com os solventes hidroalcoólicos.

Extrato	Solvente	Massa seca	Rendimento
E1	Metanol 80%	0,174 g	17,40%
E2	Metanol 80%	0,192 g	19,20%
E3	Metanol 80%	0,236 g	23,60%
E4	Etanol 70%	0,220g	22,0%
S1	Etanol 70%	0,083 g	8,30%
S2	Etanol 70%	0,103 g	10,30%
S3	Etanol 70%	0,107 g	10,70%

Os polifenóis são usualmente extraídos por solventes como água, metanol, etanol e acetona ou uma mistura desses solventes uma vez que as moléculas que contém um radical glicosídeo são solúveis em água e as agliconas (polifenóis sem a

molécula de açúcar) que são pouco polares, são mais solúveis em outros solventes. (ESCRIBANO-BAILÓN & SANTOS-BUELGA, 2003).

4.1.2.2. Doseamento de compostos fenólicos totais

Os valores de absorvância obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu encontram-se na Tabela 2. A curva analítica obtida para esta substância encontra-se na Figura 3.

Tabela 2. Valores de absorvância (em 765 nm) obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu ($\mu\text{g/mL}$)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (765 nm)
0,25	0,060
0,50	0,077
0,75	0,102
1,00	0,108
1,25	0,111

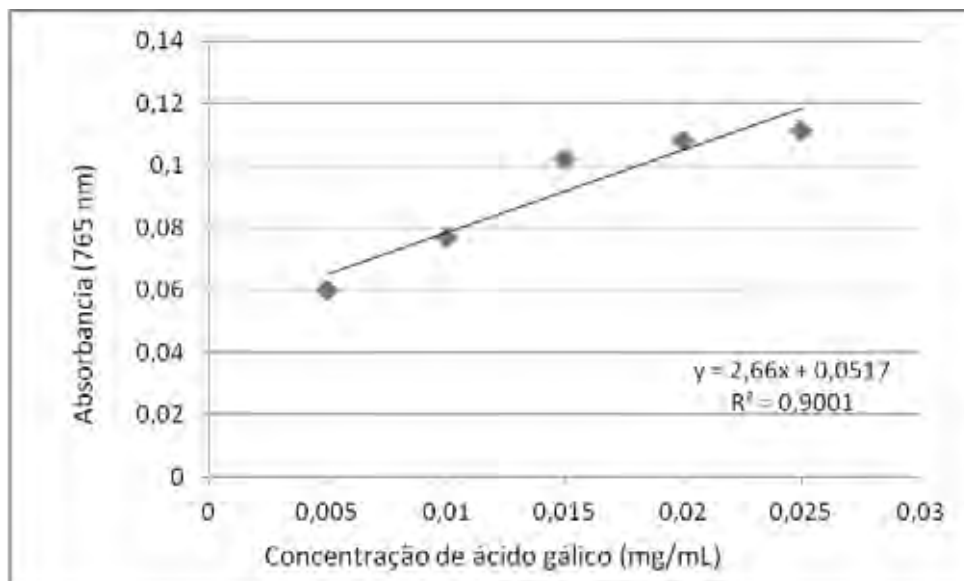


Figura 3. Curva analítica do ácido gálico com o reagente de Folin-Ciocalteu

A quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato

equivalentes a ácido gálico foi obtida a partir da equação da reta ($y = 2,66x + 0,0517$). A Tabela 3 apresenta as médias e desvio padrão dos resultados calculados para cada extrato.

Para o extrato metanólico, os valores variaram de 140,03 a 153,95 mg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico. Já para o extrato etanólico, de 196,39 a 215,63 mg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico.

Waterhouse *et al.* (1996) encontraram 20 mg/g de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico quando extraídos em metanol 95%.

Desta forma, os resultados obtidos para o presente extrato estão abaixo do que os encontrados na literatura. É importante frisar que estes conteúdos podem variar dependendo da região onde é cultivado, da diversidade de cultivo e das práticas após a colheita (SANCHEZ-RABANEDA *et al.*, 2003; BRITO, 2002; SANBONGI *et al.*, 1998; SALDANHA, MOHAMED & MAZZAFERA, 2002).

Tabela 3. Quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato equivalentes à ácido gálico (mg/mL).

Extrato	Quantidade equivalente à ácido gálico (mg/mL)
E1 MetOH	140,03
E2 MetOH	153,95
E3 MetOH	145,02
E4 EtOH	202,39
S1 EtOH	196,39
S2 EtOH	215,63
S3 EtOH	210,56

Os valores de absorvância obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de quercetina encontram-se na Tabela 4. A curva analítica obtida para esta substância encontra-se na Figura 4.

Tabela 4. Valores de absorvância (em 765 nm) obtidos por espectrofotometria para as diferentes concentrações de quercetina com o reagente de Folin-Ciocalteu ($\mu\text{g/mL}$)

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (765 nm)
0,25	0,102
0,50	0,165
0,75	0,180
1,00	0,200
1,25	0,218

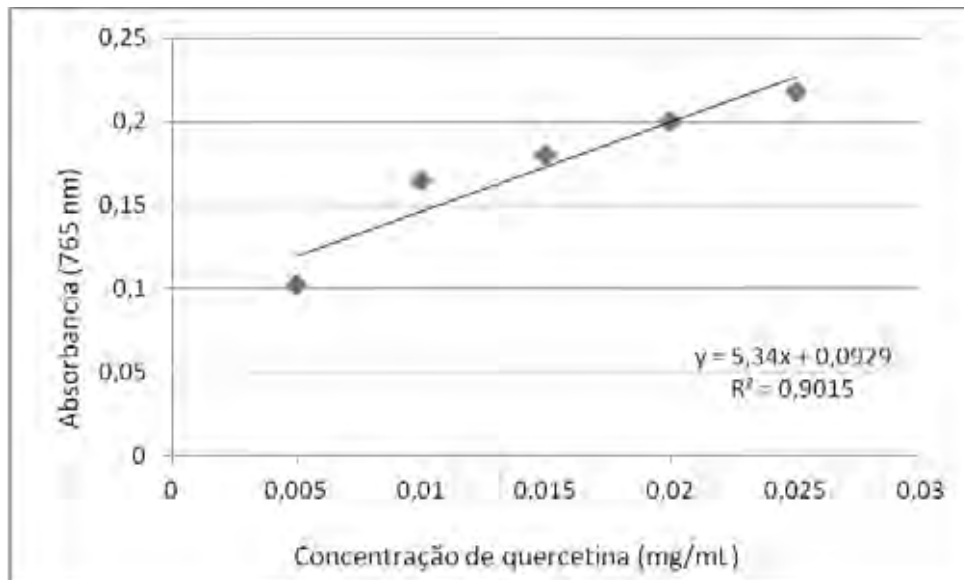


Figura 4. Curva analítica da quercetina com o reagente de Folin-Ciocalteu

A quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato equivalentes à quercetina foi obtida a partir da equação da reta ($y = 106,8x + 0,0929$). A Tabela 5 apresenta as médias e desvio padrão dos resultados calculados para cada extrato.

Para o extrato metanólico, os valores variaram de 47,81 a 57,61 mg de compostos fenólicos equivalentes à quercetina. Já para o extrato etanólico, de 77,67 a 99,21 mg de compostos fenólicos equivalentes à quercetina.

Não foram encontrados na literatura valores de compostos fenólicos equivalentes a quercetina para *T. cacao*.

Tabela 5. Quantidade de compostos fenólicos contida em 100g de extrato equivalentes à quercetina (mg/mL)

Extrato	Quantidade equivalente à quercetina (mg/mL)
E1 MetOH	56,79
E2 MetOH	47,81
E3 MetOH	57,61
E4 EtOH	77,67
S1 EtOH	86,79
S2 EtOH	99,21
S3 EtOH	90,82

A partir destes resultados é possível observar que no extrato etanólico houve maior extração de compostos polifenólicos do que no extrato metanólico.

4.1.2.3 Atividade Antioxidante do extrato

Para avaliação da atividade captadora de radical livre calculou-se a porcentagem de inibição do DPPH pela equação 2:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = [(A_0 - A_1) / A_0 \times 100] \text{ (equação 2)}$$

onde: A_0 = absorvância do controle; A_1 = absorvância da amostra.

A absorvância do controle foi de 0,625. Para cada extrato, foi construída a curva analítica a partir do cálculo da porcentagem de inibição do DPPH e das diferentes concentrações do extrato (Fig. 5-8). A concentração de inibição de 50% (IC_{50}) de DPPH pelo extrato foi calculada através da equação da reta encontrada a partir dos gráficos da porcentagem de inibição do DPPH.

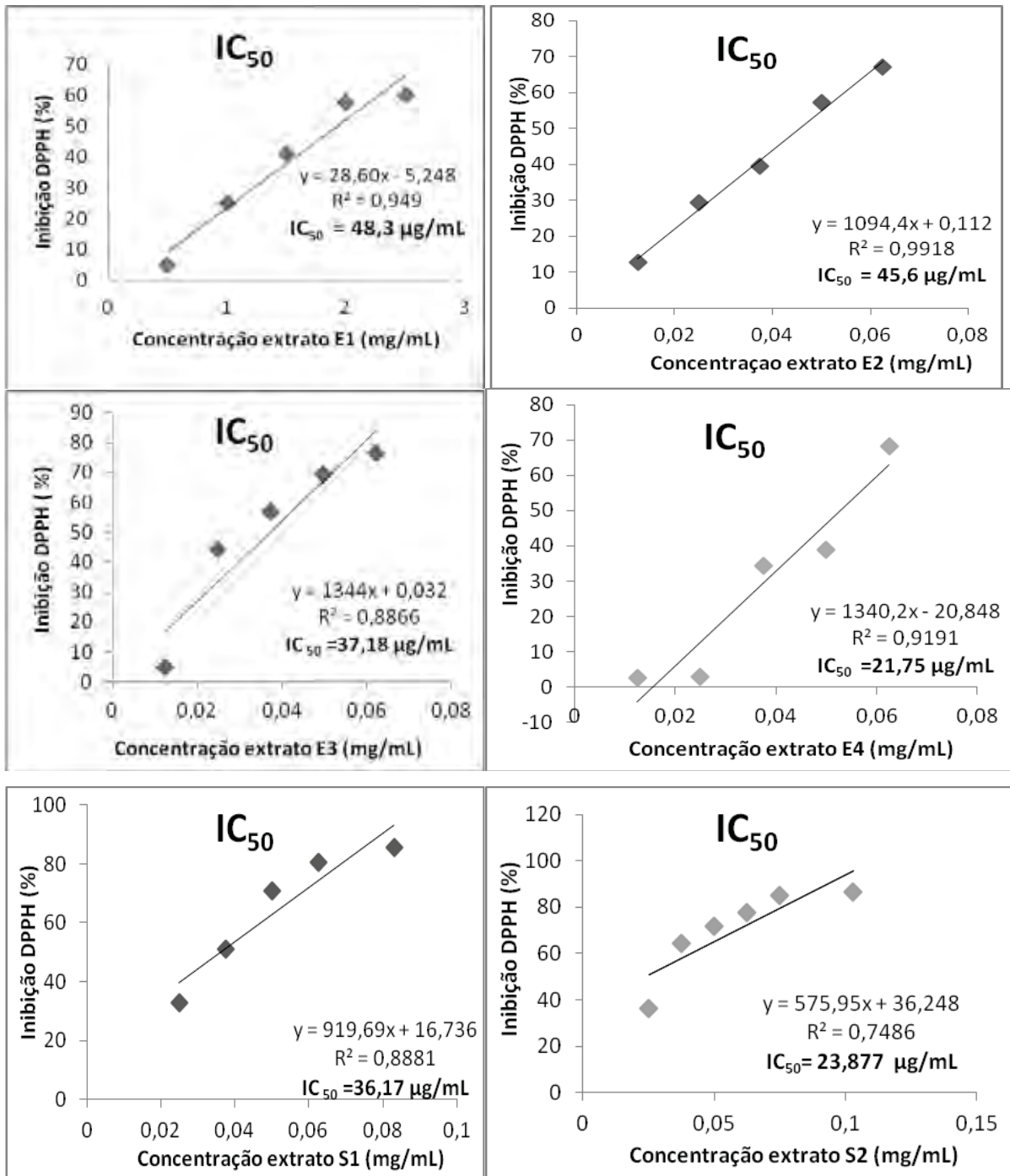


Figura 5. Gráfico da % de inibição do DPPH x concentração do extrato (mg/mL) para os extratos E1, E2, E3, E4, S1 E S2.

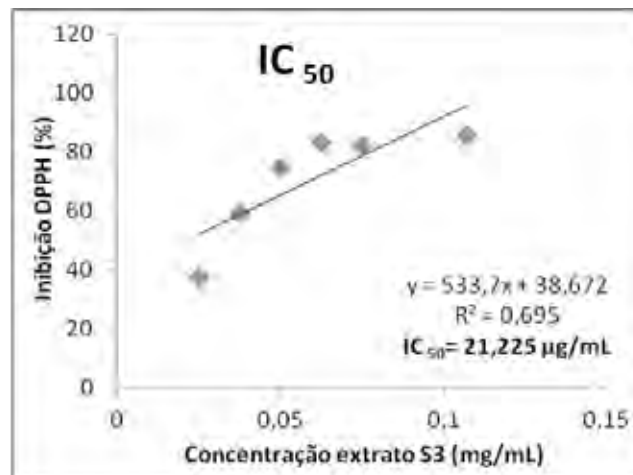


Figura 6. Gráfico da % de inibição do DPPH x concentração do extrato (mg/mL) para o extrato S3.

Para os extratos metanólicos (E1 a E3), a IC_{50} variou de 37,18 $\mu\text{g/mL}$ a 48,3 $\mu\text{g/mL}$. Já nos extratos etanólicos (E4, S1 a S3), a variação foi de 21,225 $\mu\text{g/mL}$ a 36,17 $\mu\text{g/mL}$. Na literatura, foram encontrados valores de 13,23 a 7,11 $\mu\text{g/mL}$ para a IC_{50} para pó de cacau comercial (Hill *et al.*, 2009). Como o DPPH é um radical, quanto menor a absorvância e menor a concentração que inibe o DPPH, maior o poder antioxidante. Logo, a partir dos resultados obtidos, o extrato etanólico é o que possui maior poder antioxidante. Isto confirma com os resultados obtidos no doseamento de polifenóis totais, já que no extrato etanólico, observou-se maior quantidade destes compostos antioxidantes.

Devido à quantidade inicialmente fornecida da matéria-prima, foram utilizados dois lotes diferentes. Dessa forma, foi necessário avaliar a atividade antioxidante do lote de cacau orgânico a ser utilizado nas formulações.

Como o cacau a ser incorporado na formulação seria solubilizado primeiramente na fase aquosa do sistema, foi analisada a atividade antioxidante do extrato solubilizado em água assim como o extrato solubilizado em álcool 70%.

Os resultados obtidos estão representados nos gráficos da Figura 9.

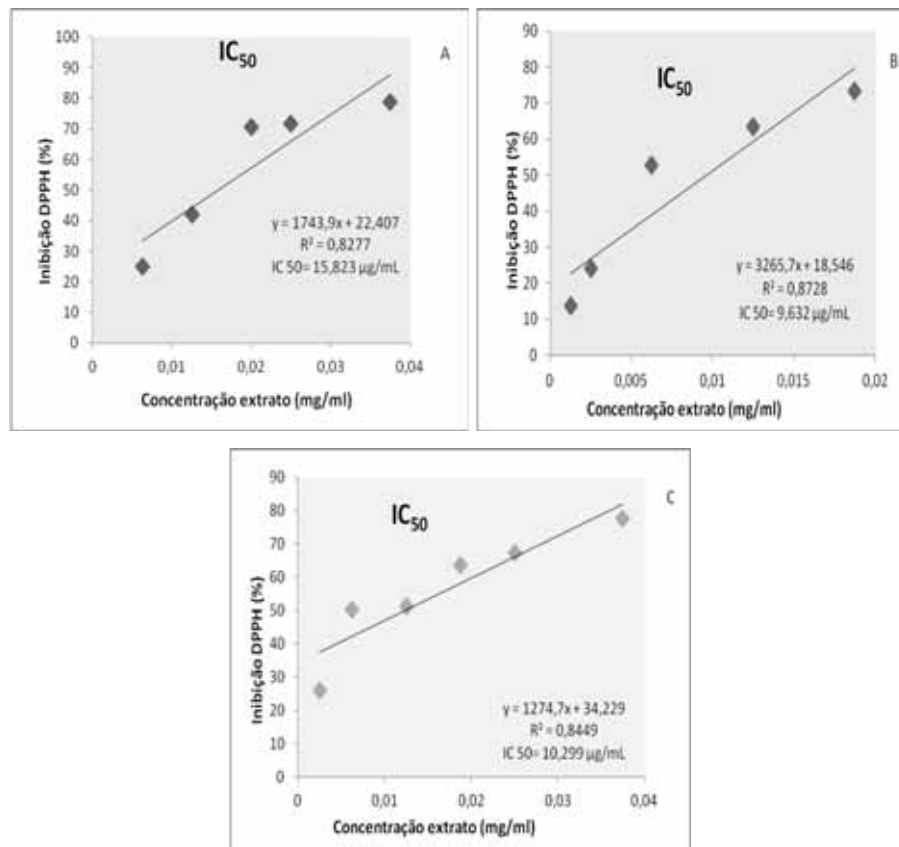


Figura 7. Inibição do DPPH (A) extrato solubilizado em água, (B) e (C) extrato solubilizado em álcool etílico 70%.

Para o lote a ser utilizado nas formulações, o extrato solubilizado em água apresentou IC_{50} de $15,823 \mu\text{g/mL}$ enquanto que solubilizado em álcool etílico 70% (v/v), apresentou média do IC_{50} de $9,96 \mu\text{g/mL}$.

Um dos motivos para as variações entre a atividade antioxidante entre os dois lotes avaliados pode ser atribuído a sazonalidade nas colheitas, pois a época da colheita da planta vegetal pode interferir na produção de compostos antioxidantes (GOBBO-NETO, L.; LOPES, N; 2007).

Já a diferença entre o solvente utilizado, provavelmente se deve a afinidade de compostos antioxidantes com o solvente alcoólico.

A quantidade de extrato de cacau orgânico a ser incorporado nas formulações foi calculada conforme o IC_{50} encontrado, usando um fator de conversão de 40 vezes devido as diluições que são feitas durante a reação com o radical livre ($100 \mu\text{L}$ da amostra em $4,0 \text{ mL}$ da solução). Portanto, para cada 1 g de formulação:

$$15 \mu\text{g} \times 40 = 600 \mu\text{g} = 0,6 \text{ mg de extrato de cacau orgânico}$$

4.2 Desenvolvimento das formulações

4.2.1 Preparação do extrato

De acordo com os resultados obtidos na quantificação de polifenóis totais e no teste de DPPH, verificou-se que o melhor solvente é o etanólico, devido à maior extração de polifenóis e menor IC_{50} indicando maior poder antioxidante do que o extrato metanólico.

Portanto, este foi o solvente de escolha na extração do cacau em pó para a incorporação na formulação.

4.2.2 Desenvolvimento dos sistemas

O diagrama de fases utilizado para o desenvolvimento dos sistemas encontra-se na Figura 10. Foram delimitadas as áreas de anisotropia, para melhor visualização dos resultados (Figura 11). De acordo com o diagrama de fases, verificou-se que em regiões com concentrações menores de tensoativo (até 30%) e em altas concentrações de tensoativo ocorre formação de sistemas opacos (emulsões). Em regiões intermediárias de tensoativo (30 a 75%) até 45% de concentração de óleo há formação de sistemas de alta viscosidade transparentes (SAVT), enquanto que em regiões de altas concentrações de óleo ocorre predominância de sistemas de baixa viscosidade transparentes (SBVT).

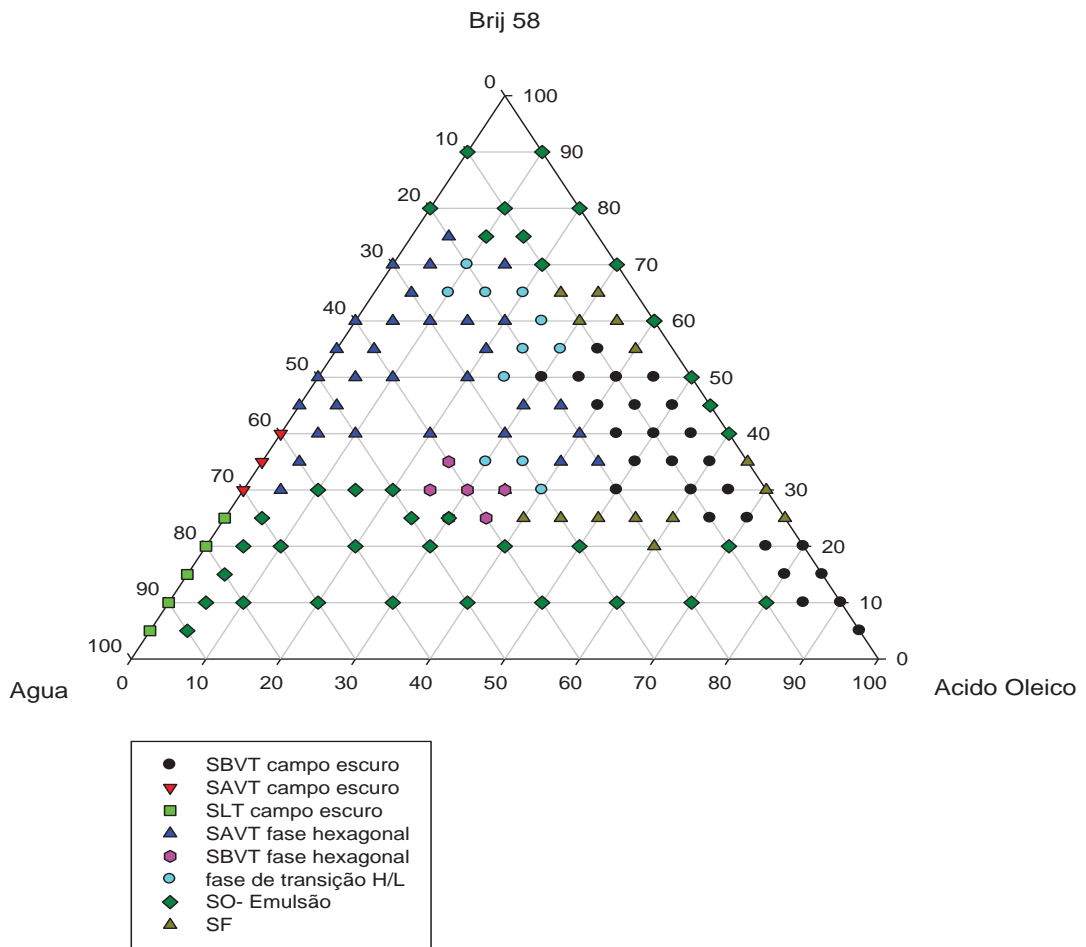


Figura 8: Diagrama de fases de pontos. SBVT: sistema de baixa viscosidade transparente, SAVT: sistema de alta viscosidade transparente, SLT: sistema líquido transparente, SO: sistema opaco, SF: separação de fases, H/L: fase de transição hexagonal/lamelar.

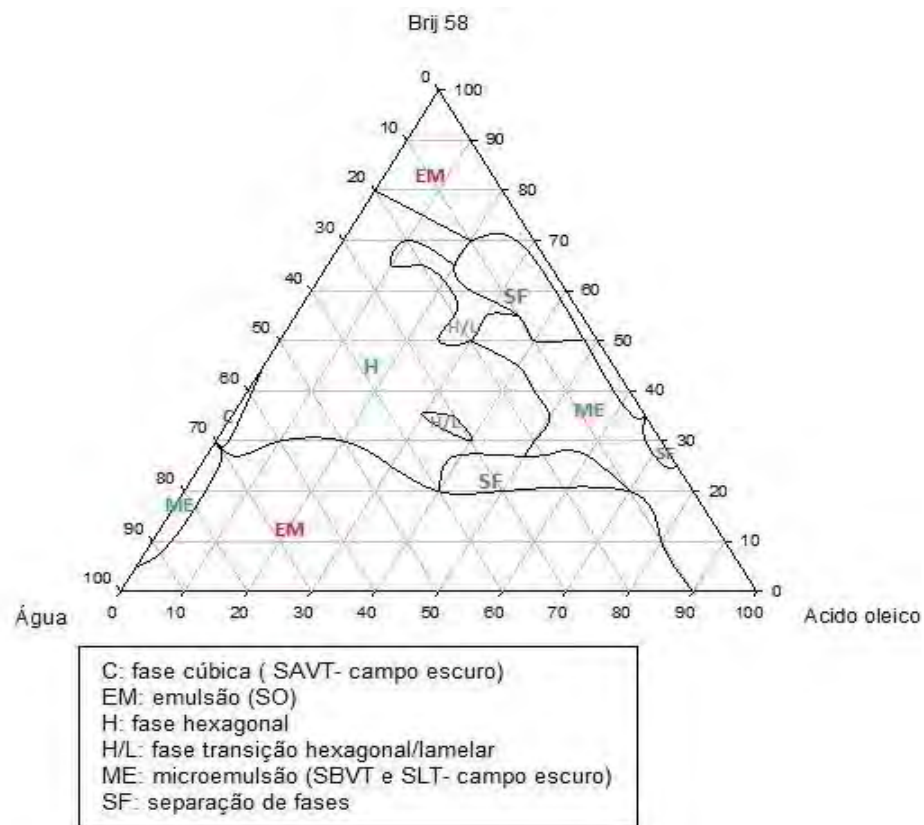


Figura 9. Diagrama de fases de linhas. SBVT: sistema de baixa viscosidade transparente, SAVT: sistema de alta viscosidade transparente, SLT: sistema líquido transparente, SO: sistema opaco, SF: separação de fases.

4.2.3 Caracterização estrutural dos sistemas

As análises de MLP indicaram a presença de fases hexagonais evidenciadas por estruturas semelhantes a “estrias”. Também foram observadas fases de transição hexagonal/ lamelar, evidenciadas por estruturas semelhantes a “cruzes de malta” típico de fase lamelar (Figura 12).

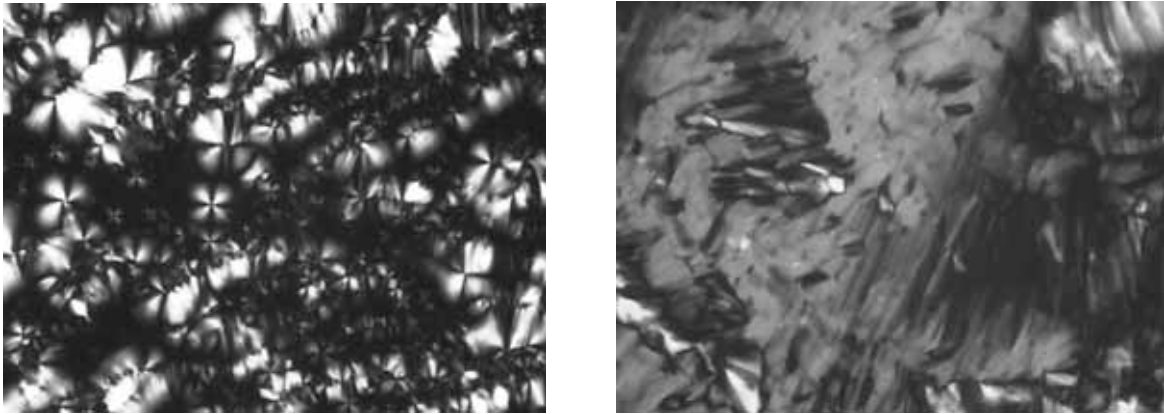


Figura 10. Estruturas semelhantes à cruz-de-malta (esquerda) e estrias (direita)

Ao se formar, a fase lamelar assume um estado intumescido, pois a água é adsorvida entre as camadas de tensoativo, formando o domínio hidrofílico do CL. A água situada entre as lamelas apresenta características de água ligada, devido às fortes interações entre suas moléculas e os grupos polares dos tensoativo. Dessa forma não permite a perda por evaporação, necessitando de maior energia que a disponível à temperatura da superfície cutânea para evaporar (SANTOS, 2006).

A organização interna da fase hexagonal pode estar relacionada com o arranjo ocorrido principalmente entre a água e o tensoativo. Aumentando a quantidade da água e conseqüente diminuição do tensoativo, a disposição da água em torno das cabeças polares do tensoativo pode se rearranjar para outras formas. As cabeças polares do tensoativo, na presença de aumento de fase aquosa estariam sendo hidratadas pela água devido à alta hidrofília desses grupos, promovendo organizações mais rígidas e mais complexas, típicas de fase hexagonal (SOTIRO, 2007; FORMARIZ *et al.*, 2005).

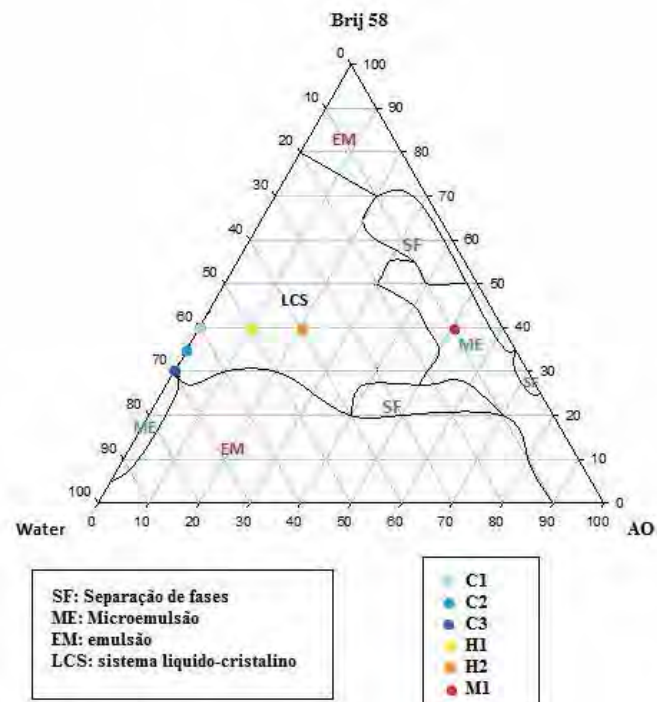
4.2.4. Seleção das formulações

Foram selecionados seis pontos do diagrama de fases desenvolvido para a incorporação do cacau orgânico. Sendo estes: três de fase cúbica (C1, C2, C3), dois de fase hexagonal (H1, H2) e um microemulsão (M1). Estes pontos estão destacados no diagrama apresentado na Figura 13. A Tabela 6 indica as porcentagens dos componentes da formulação para cada ponto selecionado.

Tabela 6. Porcentagens dos componentes das formulações

Formulação	Acido Oléico (%)	Brij 58 (%)	Água
C1	0	40	60
C2	0	35	65
C3	0	30	70
H1	10	40	50
H2	20	40	40
M1	50	40	10

A quantidade de extrato do cacau orgânico a ser incorporada na formulação foi determinada conforme o IC_{50} do extrato analisado, sendo incorporado na fase aquosa do sistema. As formulações contendo o extrato passam a ser designadas C1E, C2E, C3E, H1E, H2E e M1E.

**Figura 11.** Diagrama de fases e as formulações seleccionadas

4.2.5 Espalhamento de raios X a baixo ângulo (SAXS)

A técnica de SAXS é usada para confirmar os tipos de estrutura e arranjo sugeridos por microscopia óptica de luz polarizada, além de identificar onde diferentes tipos de estruturas podem coexistir (MEZZENGA *et al.*, 2005). As curvas de SAXS para sistemas líquido-cristalinos exibem picos, cujo número e razão entre as distâncias de correlação permitem determinar o tipo de arranjo que os átomos formam na matriz. Assim, para que, apenas pela análise da curva de SAXS um tipo de arranjo líquido-cristalino seja identificado, pelo menos três picos devem ser bem definidos (CHORILLI *et al.*, 2011).

Por meio da razão entre as distâncias é que se pode definir o tipo de arranjo; logo, pode-se observar a existência de mesofases ordenadas como fase lamelar, a qual é composta por micelas planares ou lamelas com solvente entre elas, representada por três ou mais picos, cuja razão entre as distâncias deve ser 2, 3, e 4, respectivamente, enquanto que a fase composta por organização hexagonal de agregados cilíndricos observada pela existência de três ou mais picos deve apresentar valores de distância média entre partículas de 1,73, 2 e 3, respectivamente.

A Tabela 7 apresenta os parâmetros para determinação estrutural dos sistemas, obtidos por SAXS.

Tabela 7. Parâmetros para determinação estrutural dos sistemas, obtidos por SAXS.

Formulação	d_1/d_2	d_1/d_3	Estrutura
C1	1,41	1,73	Cúbica
C1E	1,41	1,73	Cúbica
C2	1,42	1,73	Cúbica
C2E	1,41	1,73	Cúbica
C3	1,42	1,73	Cúbica
C3E	1,42	1,73	Cúbica
H1	1,73	2,00	Hexagonal
H1E	1,73	2,02	Hexagonal
H2	1,73	2,01	Hexagonal
H2E	1,73	2,00	Hexagonal
M1	-	-	Microemulsão
M1E	-	-	Microemulsão

Os resultados obtidos confirmam as informações das análises de microscopia de luz polarizada. Observou-se também que a incorporação do extrato nas formulações não alterou o tipo de estrutura observada.

4.2.6 Determinação do comportamento reológico

As medidas reológicas podem fornecer idéias relacionadas ao arranjo das moléculas de tensoativo num sistema tensoativo/água/óleo. A fase lamelar geralmente apresenta-se como líquido viscoso e a fase hexagonal tem a viscosidade semelhante à de um gel, enquanto que a viscosidade da fase cúbica é extremamente elevada (GABBOUN *et al.*, 2001; HYDE, 2001). Deve-se ressaltar, todavia, que o tipo de arranjo estrutural de sistemas líquido cristalinos só pode ser determinado com precisão pela associação de medidas de SAXS, reologia e microscopia de luz polarizada. As medidas de reologia são utilizadas a fim de se determinar a viscosidade dinâmica, obtendo-se como resultado a curva de viscosidade em relação ao fluxo e à visco-elasticidade, por meio dos parâmetros módulo de armazenagem (G') e módulo de perda (G''), obtendo-se, neste caso, informação sobre o comportamento viscoelástico das amostras (SCHRAMM, 2002).

4.2.6.1 Ensaio de escoamento

A Figura 14 mostra a variação da tensão de cisalhamento em função da velocidade de cisalhamento para as formulações H1 (10% de óleo, 40% de tensoativo e 50% de água) e H2 (20% de óleo, 40% de tensoativo e 40% de água). As curvas evidenciaram que as formulações comportam-se como sistemas não-newtonianos, pois não apresentam linearidade entre a tensão e a velocidade de cisalhamento.

A formulação H1 apresentou características de fluidos pseudoplásticos e tixotrópico em virtude da diminuição da viscosidade. Tal comportamento é devido à desestruturação interna do sistema com o cisalhamento aplicado. Estes resultados revelam a presença de uma rede estruturada formada pela interação entre os componentes da formulação e que é gradualmente quebrada com o aumento da

velocidade de cisalhamento, reduzindo a resistência interna do sistema, e com isso, diminuindo a viscosidade (CHORILLI *et al.*, 2011).

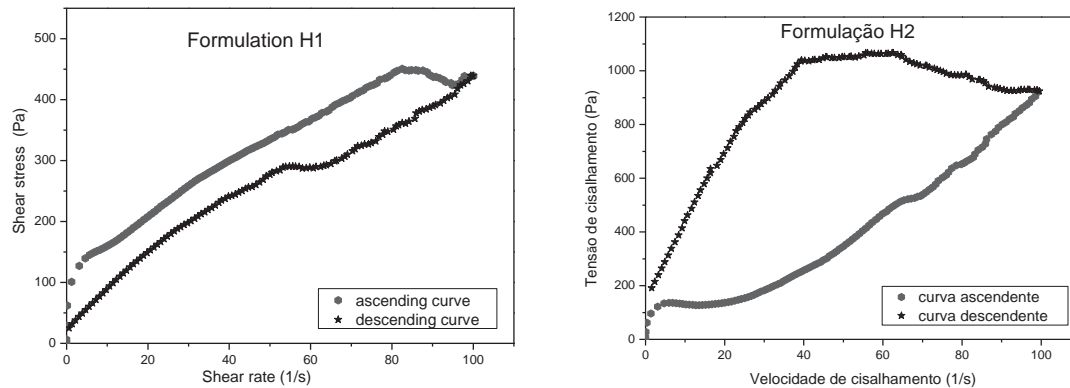


Figura 12. Curva de fluxo: velocidade de cisalhamento X tensão de cisalhamento. Formulação H1 (esquerda) e formulação H2 (direita)

A pseudoplasticidade é adequada para produtos indicados para uso tópico, pois após a aplicação da tensão a formulação apresenta facilidade para fluir, levando a um bom espalhamento durante a aplicação e formação de filme uniforme na superfície cutânea (BOODTS, 2003; GAO *et al.*, 2003).

Os materiais pseudoplásticos, além de apresentarem a propriedade de “afinar-se” com a aplicação de velocidades de cisalhamento crescentes, podem apresentar o fenômeno de tixotropia, isto é, quando a velocidade de cisalhamento é removida, as tensões de cisalhamento são relaxadas e o sistema tende a readquirir a estrutura inicial, de tal forma que as curvas ascendentes e descendentes do reograma ficam deslocadas, resultando em uma área de histerese. Assim, a tixotropia é diretamente proporcional à área de histerese. Quanto maior a área de histerese, maior a tixotropia do sistema. As propriedades tixotrópicas estão diretamente relacionadas com a interação entre os componentes da formulação (MORAIS, 2006).

Já para a formulação H2, observou-se fenômeno oposto. Esta formulação apresentou características de fluidos dilatantes e reopéticos, devido ao aumento da viscosidade conforme aumento da tensão de cisalhamento. Este comportamento pode ser explicado pelo preenchimento do espaço entre as partículas com o aumento da tensão de cisalhamento aplicado, a ordenação das partículas promove

um aumento no volume, provocando elevação da resistência de fluidez, ou seja, da viscosidade (AULTON, 2008; LAHOUD, 2010).

SANTOS (2006) verificou que formulações constituídas por cristais líquidos possuem como característica o aumento da viscosidade em função do tempo. Segundo FERRARI e colaboradores (2004), o aumento geral na viscosidade juntamente com o aumento na concentração de tensoativo é facilmente explicado pela presença de estrutura líquido cristalina, uma vez que também se relaciona com o aumento na microestrutura das redes líquido-cristalinas.

Tal diferença entre o comportamento das formulações pode estar relacionado com o aumento da fase oleosa, já que ambos possuem a mesma concentração de tensoativo.

4.2.6.2. Ensaios mecânico-dinâmicos ou de oscilação

As análises de visco-elasticidade foram realizadas em uma seqüência definida. Primeiramente, realizou-se varredura de tensão a fim de se encontrar a faixa de viscoelasticidade linear, ou seja, a faixa na qual os módulos, elástico e viscoso, independem da tensão aplicada. Em seguida, realizou-se a varredura de freqüência, aplicando-se uma tensão definida pelo teste anterior. A tensão de cisalhamento fixada foi de 5 Pa para todas as condições ao longo de todo o estudo e foi determinada através dos testes de varredura de tensão realizados para as freqüências de 0 a 100 Hz com amplitude de 1 a 100 Pa. As Figuras 15 e 16 mostram, respectivamente, os reogramas de varredura de tensão e varredura de freqüência para as formulações H1 e H2.

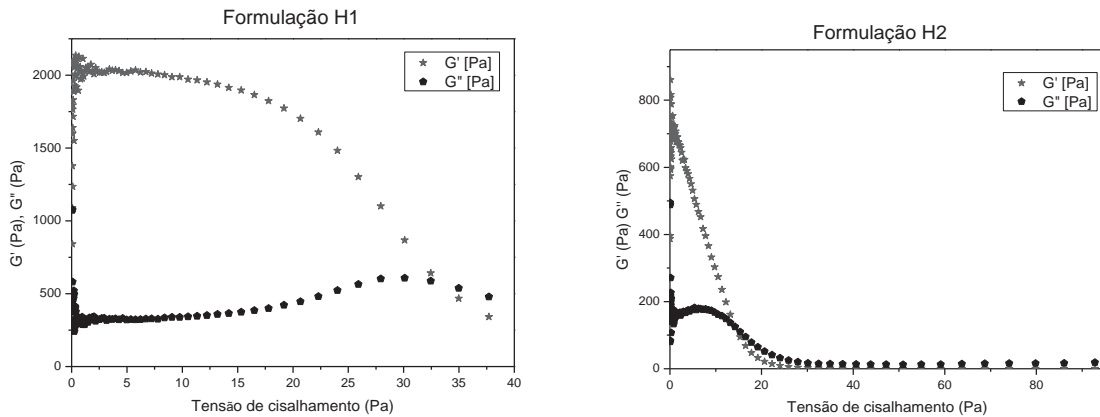


Figura 13. Varredura de tensão: Tensão de cisalhamento (Pa) x G' (Pa), G'' (Pa) para a formulação H1(esquerda) e H2 (direita)

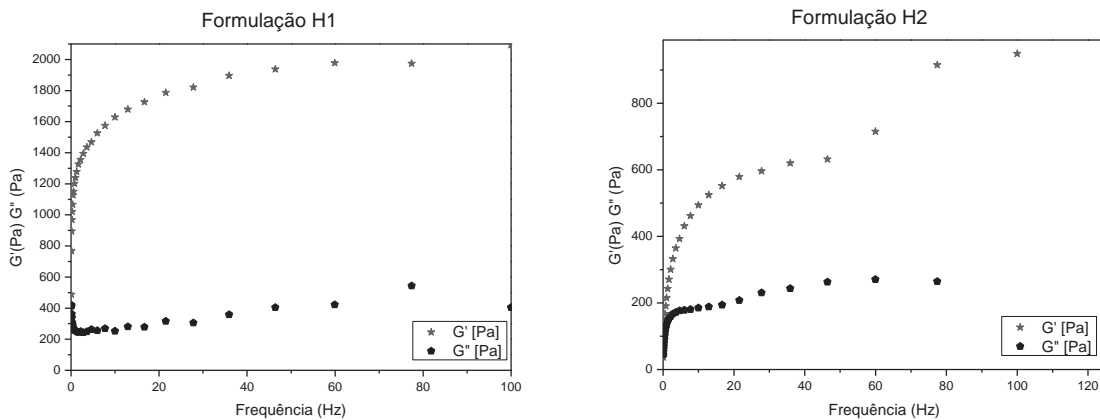


Figura 14. Varredura de frequência: Frequência (Hz) x G' (Pa), G'' (Pa) para a formulação H1 (esquerda) e H2 (direita)

Na reologia oscilatória é possível analisar o caráter sólido da amostra através do módulo de armazenamento (G'). Quanto maior for o valor de G' , maior é o caráter sólido do gel e as deformações serão elásticas ou recuperáveis (RAO, 1992). Além disso, pode-se avaliar o módulo de cisalhamento dinâmico viscoso ou de perda (G''), que indica o caráter líquido do material. (KORHONEN, 2001).

Nas formulações, é possível observar predomínio do componente elástico do sistema, já que os valores de G' (módulo elástico) são superiores aos valores de G'' (módulo viscoso).

A formulação H2 apresentou uma região de viscoelasticidade linear mais baixa que a formulação H1, provavelmente devido à formação de um gel com características mais fracas pelo aumento na concentração da fase oleosa.

4.2.7 Ensaio de bioadesão

A bioadesão é usada para descrever a adesão de macromoléculas sintéticas ou biológicas a tecidos biológicos (CARVALHO et al., 2010). A incorporação de moléculas adesivas em formulações farmacêuticas com sistemas de liberação de fármaco favorece um contato íntimo da formulação com o tecido de absorção, levando a liberação do fármaco perto do local de ação, ocasionando aumento da biodisponibilidade, além de efeitos locais e sistêmicos (HÄGERSTRÖM, 2003; WOODLEY, 2001).

As Tabelas 8 e 9 mostram os resultados obtidos nos ensaios de bioadesão. A força obtida pelo gráfico representa a força máxima observada para o desprendimento da amostra da pele da formulação, enquanto que a área representa o trabalho da bioadesão.

Tabela 8. Força bioadesiva das formulações sem a incorporação de cacau orgânico

Formulação s/ cacau	Força (N)	Área (N.sec)
C1	0,567 ± 0,043	0,674±0,062
C2	0,378 ± 0,022	0,966± 0,212
C3	0,346 ± 0,034	0,699± 0,139
H1	0,076±0,014	0,158±0,043
H2	0,035±0,001	0,175±0,012
M1	0,005±0,000	0,0143±0,001

Tabela 9. Força bioadesiva das formulações com a incorporação de cacau orgânico

Formulação c/ cacau	Força (N)	Área (N.sec)
C1 E	0,693± 0,172	1,049±0,292
C2 E	0,547± 0,011	1,843±0,785
C3 E	0,351± 0,014	0,862± 0,034
H1 E	0,064±0,002	0,108±0,009
H2 E	0,031±0,002	0,091±0,004
M1 E	0,005±0,000	0,018±0,001

As figuras 15 e 16, representam os dados obtidos na forma de gráfico de barras, para melhor visualização e interpretação de resultados.

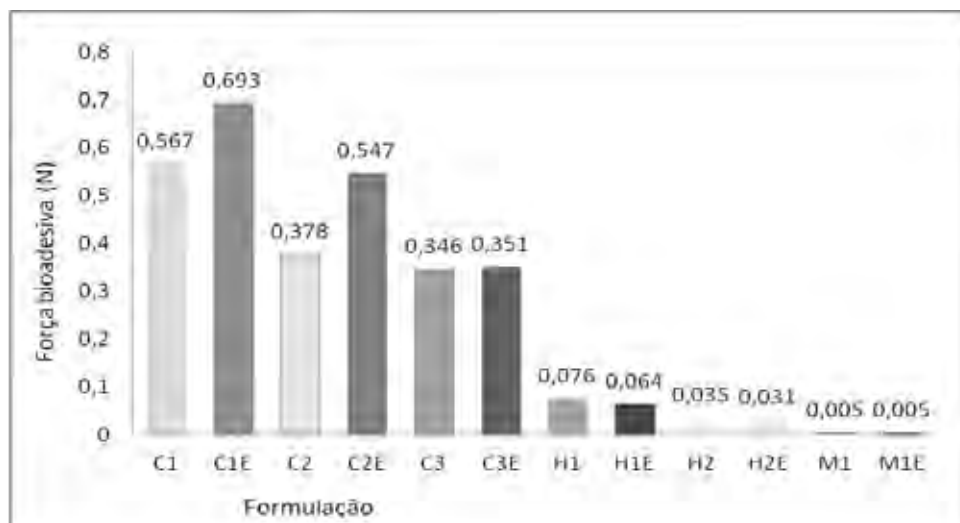


Figura 15. Gráfico de Barras dos resultados da Força bioadesiva (N) para cada formulação

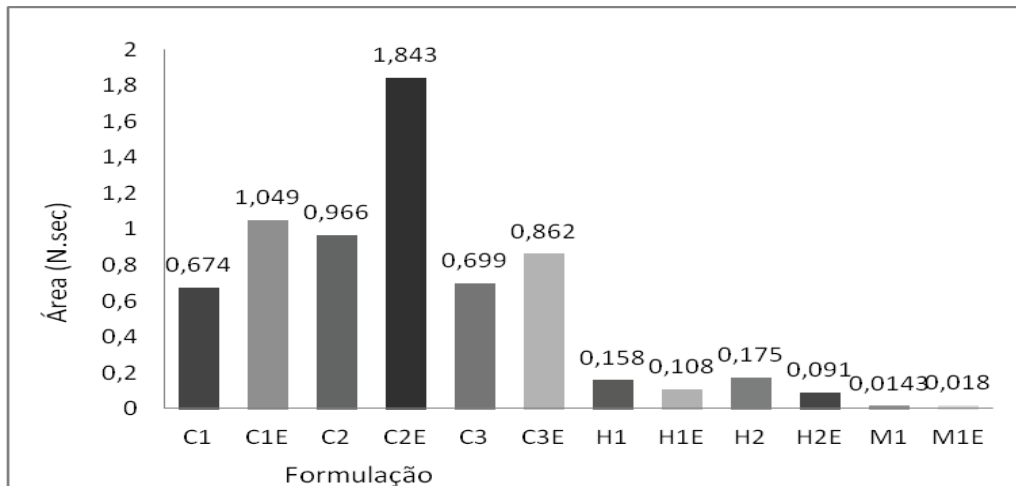


Figura 16. Gráfico de Barras dos resultados da Área (N. sec) para cada formulação

A partir destes resultados é possível observar que entre todas as formulações, as de fase cúbica apresentaram maior força bioadesiva do que as formulações de fase hexagonal, que por sua vez apresenta maior força bioadesiva que a microemulsão.

Observa-se que para as formulações de fase cúbica há um aumento na força bioadesiva e na força de trabalho exercido com a incorporação do cacau nas formulações. Porém, a mesma situação não foi observada para as outras formulações quando adicionadas de cacau.

As formulações de fase cúbica são muito estudadas devido ao seu potencial em sistemas de liberação de fármacos. É conhecida por possuir propriedades bioadesivas e sua efetiva adesão a pele. Devido a sua alta viscosidade, o uso tópico é o mais adequado (NIELSEN, 1998).

A formulação C1 foi a que apresentou maior força de bioadesão entre as cúbicas, provavelmente por apresentar maior concentração de tensoativo que as outras formulações de fase cúbica. Já para as formulações de fases hexagonais, a H1 apresentou maior poder bioadesivo que a H2, sendo que a diferença entre elas é que H1 é que possui menor quantidade de fase oleosa e maior quantidade de água que a H2.

Já a microemulsão foi a que apresentou menor poder bioadesivo, sendo que esta possui 50% de fase oleosa.

4.3 Ensaios de estabilidade físico-química para os sistemas obtidos

4.3.1 Avaliação visual

Para as formulações preparadas sem o cacau orgânico armazenadas em temperatura ambiente ($\pm 30^{\circ}\text{C}$), não houve separação de fases e não foram observadas alterações de cor e de homogeneidade no período de 1 mês.

Para evitar o aparecimento de fungos, uma vez que não havia conservante microbiológico nas formulações com extrato, decidiu-se armazená-las em refrigerador/geladeira ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). No período de 30 dias, não foram observadas separação de fases, alterações de cor e de homogeneidade.

4.3.2 Teste de centrífuga

As formulações foram avaliadas 24h após a sua preparação. Na avaliação da estabilidade frente à centrifugação, verificou-se que as formulações mantiveram o mesmo aspecto após sua preparação, não sendo observada separação de fases. Como não apresentaram instabilidade física, não há necessidade de reformulação ou escolha de outros pontos do diagrama de fases.

4.3.3 Determinação do pH das formulações envolvidas no estudo

A determinação do pH das amostras foi realizada após 24h da sua preparação. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 10.

Tabela 10. pH das formulações

Formulação	Sem cacau	Com cacau	Diferença
C1	4,97	4,35	0,62
C2	4,79	4,35	0,44
C3	4,60	4,40	0,2
H1	4,165	4,16	0,005
H2	4,225	4,15	0,075
M1	3,95	4,01	-0,06

A adição do cacau levou a pouca alteração no pH das formulações provocando em geral diminuição do pH.

Como as formulações são para o uso tópico, estas devem apresentar pH compatível com a região do corpo aonde se vai aplicar. A pele apresenta pH levemente ácido (4,2 – 5,6), sendo variável conforme a região do corpo (CLARK,1996; VAN SCOOT,1997).

4.3.4 Determinação da densidade relativa

A densidade das formulações foi determinada conforme a equação 1 (3.3.3.4). O peso do picnômetro vazio foi de 12,28 g e a massa da água foi de 19,70 g. O volume total do picnômetro é 5 mL. Os resultados calculados se encontram na Tabela 11.

Tabela 11. Densidade das formulações

Formulação	Densidade (g/cm ³)
C1	1,02
C2	1,024
C3	1,015
H1	0,985
H2	0,981
M1	0,973

Todas as formulações apresentaram densidades próximas a da água. As formulações de fase cúbica apresentaram densidade maior que as outras formulações e a microemulsão apresentou menor densidade dentre todas.

4.3.5 Atividade antioxidante das formulações

As formulações acrescidas ou não de extrato de cacau foram avaliadas em um período de 21 dias quanto à atividade antioxidante.

Para o cálculo das porcentagens foi utilizado um fator de correção, devido à diluição da formulação para a realização do ensaio de DPPH, sendo utilizada como base a densidade das formulações.

Os resultados obtidos estão apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12. % de inibição do DPPH das formulações não acrescidas de cacau

Formulação	1º dia (%)	7º dia (%)	14º dia (%)	21º dia (%)
C1	4,72	2,16	2,12	2,23
C2	3,54	2,78	2,11	2,45
C3	1,37	1,23	2,28	2,60
H1	5,31	5,15	5,05	5,35
H2	3,54	4,12	5,37	5,80
M1	5,51	5,56	5,53	6,77

Pela Tabela 12, é possível perceber que as formulações não acrescidas de cacau praticamente não apresentam atividade antioxidante. Sendo que as formulações que contêm componentes de fase oleosa (H1, H2 e M1) apresentaram maior atividade antioxidante que as outras.

Tabela 13. % de inibição do DPPH das formulações incorporadas de cacau

Formulação	1º dia (%)	7º dia (%)	14º dia (%)	21º dia (%)
C1 E	58,67 ± 4,03	52,26 ± 1,44	45,80 ± 3,10	42,53 ± 3,32
C2 E	57,39 ± 2,64	61,09 ± 3,26	50,89 ± 1,98	49,86 ± 1,97
C3 E	58,61 ± 2,78	63,39 ± 3,85	53,09 ± 2,89	51,622 ± 2,89
H1 E	58,71 ± 1,11	53,11 ± 4,09	53,22 ± 3,45	48,57 ± 3,45
H2 E	51,87 ± 1,25	56,88 ± 2,23	54,24 ± 2,041	44,44 ± 2,041
M1 E	56,45 ± 0,41	59,29 ± 5,95	47,15 ± 0,22	45,86 ± 0,22
Extrato	62,20 ± 1,39	55,31 ± 1,99	50,22 ± 0,55	45,98 ± 1,36

A partir da Tabela 13, foram construídos os gráficos apresentados na Figura 18 e 19 para análise dos resultados observados no período. Para a construção do gráfico, subtraíram-se os valores representados na Tabela 13 (formulações com extrato) pelos valores da tabela 12 (formulações sem extrato), para resultados mais fidedignos.

Para melhor visualização, as formulações foram divididas em 2 gráficos que estão representados na Figura 17.

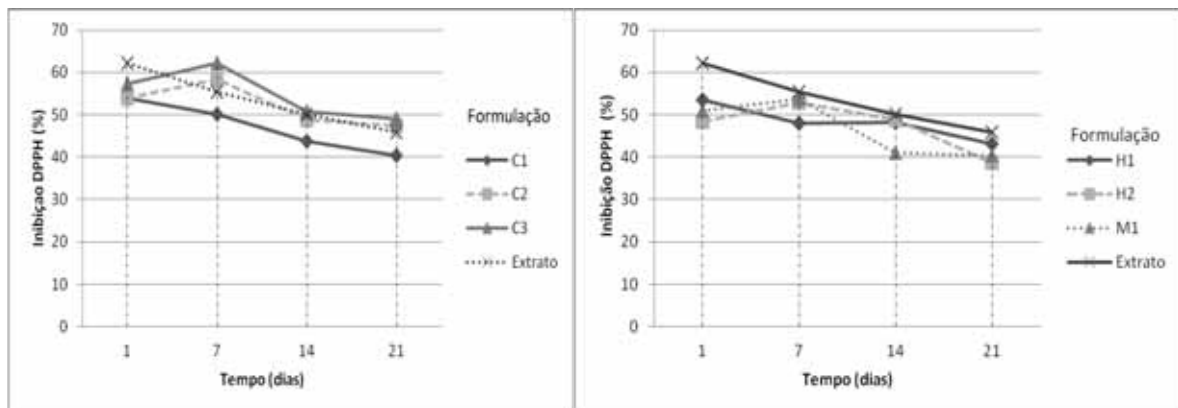


Figura 17. Avaliação da porcentagem inibição do radical DPPH das formulações durante um período de 21 dias.

Dessa forma, é possível observar que no extrato, ao longo do período de 21 dias, houve diminuição do poder antioxidante.

Quanto às formulações, inicialmente a atividade antioxidante foi menor quando comparado ao extrato, porém no 7º dia observa que houve uma aproximação das porcentagens de inibição do DPPH das formulações C2 e C3 com o do extrato. Isso provavelmente devido a uma maior estabilização da formulação. Para a formulação C1, não foi observada a mesma característica, sendo que as diferenças entre essas formulações é a concentração do tensoativo. A C1 apresenta maior concentração de tensoativo que as outras.

Para as outras formulações H1, H2 e M1, a inibição do radical DPPH não foi maior que a observada no extrato. Essas formulações apresentam fase oleosa, diferentemente das formulações C1, C2 e C3, que apresentam apenas componentes de fase aquosa e o tensoativo. A presença de fase oleosa, que foi constituída de

ácido oléico, pode ter interferido na atividade antioxidante, uma vez que óleos insaturados tendem a se oxidar (COSGROVE, 1987). Neste caso, o extrato de cacau adicionado pode ter se oxidado, como forma de proteger a oxidação da formulação.

Os resultados obtidos demonstraram que:

- O cacau orgânico em pó apresentou cerca de 200 mg de compostos fenólicos equivalentes a ácido gálico e 21,225 $\mu\text{g/mL}$ de IC_{50} do DPPH para os extratos etanólicos. Para um segundo lote de cacau orgânico, o extrato aquoso apresentou IC_{50} do DPPH 15,823 $\mu\text{g/mL}$;
- O sistema desenvolvido apresentou fases líquido-cristalinas do tipo hexagonal e cúbica e comportamento de fluido pseudoplástico tixotrópico e de fluido dilatante reopético;
- De acordo com as análises de estabilidade físico-química, as formulações apresentaram-se estáveis durante o período de tempo analisado;
- A incorporação de 0,06% de extrato de semente de cacau orgânico na formulação atingiu a IC_{50} do extrato;
- A atividade antioxidante do extrato foi mantida em todas as fases do sistema estudado (cúbica, hexagonal e microemulsão), sendo observado inclusive um ligeiro aumento na atividade antioxidante das formulações de fase cúbica;
- Os resultados sugerem que o sistema empregado pode ser promissor para a incorporação do extrato de cacau orgânico, visando a sua atuação na prevenção do envelhecimento cutâneo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, I.F.; BAHIA, M.F. Reologia: interesse e aplicação na área cosmético-farmacêutica. **Cosmet. Toiletr.**, v.15, n.3, p.96-100, 2003.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. Ed. Porto Alegre: Artmed,2008, 677 p.

ARAÚJO, A.L.N.; PINTO, S.F.M.; SOBRINHO, O.A.P.; SODRÉ, R.L.; NOGUEIRA, M.E. Peeling químico: avaliação de ácido glicólico, ácido retinóico e ATA. **Rev. Cosmiatr. Med Est.**, v.3, n.3, p.41-4, 1995.

BECHTOLD, I.H. Cristais líquidos: um sistema complexo de simples aplicação. **Rev. Bras. Ens. Fis.**, v.27, n.3, p.333-342, 2005

BIEHL,B.; PASSARN,U.; PASSARN, D. Subcellular structures in fermenting coca beans, effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 28, p. 41-52, 1977.

BLICHMANN, C.W.; SERUP, J. Assessment of skin moisture. **Acta Dermatol. Venereol.**, v.68, p 284–90, 1988

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

BRITO, E. S. et al. Effect of Polyphenol Oxidase (PPO) and air treatments on total phenol and tannin content of cocoa nibs. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 22; n.1; p. 45-48, 2002.

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

CARVALHO F.C.; HATAKEYAMA, I.; CALIXTO,G.; LUZ,G.M.; CHORILLI, M.; GREMIÃO, M.P.D. Mucoadhesive drug delivery systems. **Braz. J. Pharm. Sci.**, vol. 46, n. 1, jan./mar., 2010.

CHORILLI, M.; PRESTES, P.S.; RIGON, R.B.; LEONARDI, G.R.; CHIAVACCI, L.A.; SARMENTO, V.H.V.; SCARPA, M.V. Structural characterization and in vivo evaluation of retynil palmitate in non-ionic lamellar liquid crystalline system. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.85, p.182-188, 2011.

CLARK, C. P. Alpha hydroxy acids in skin care. **Clin. Plast. Surg.**, v. 23, p 49-56,1996.

COLEMAN III, W. P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. Cirurgia Cosmética: Princípios e técnicas. 2.ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, 2000

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A.; **Lipids** v.22, p 299, 1987.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5ª edição, volume II. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2002. pg. 742, 743, 744, 745, 746, 747.

DZUBOW, L. Envelhecimento Facial. In: COLEMAN III W. P.; HANKE, C.W.; ALT, T.H.; ASKEN, S. Cirurgia Cosmética: Princípios e técnicas. 2.ed. Rio de Janeiro: **Revinter**, p.7-17, 2000.

ESCRÍBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Methods in polyphenol analysis. Polyphenol Extraction from Foods. **The Royal Society of chemistry**, p. 1-15, 2003.

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

FERRARI, C.; SILVEIRA, F.R.X.; BELTRAMI-JUNIOR, L.M. **Uso de cristais líquidos em cosméticos**. 2004. 94p. Monografia (Especialização). Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Metodista de Piracicaba, Piracicaba, 2004.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.** p. 41, 301, 2005.

GABBOUN, N.H.; NAJIB, N.M.; IBRAHIM, H.G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactant systems across rat skin. **Int. J. Pharm.**, v.212, n.1, p.73-80, 2001.

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

GLOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Revisão: Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GU, L. et al. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. **J. Nutr.**, v.134, p. 613-617, 2004.

HÄGERSTRÖM, H. Polymer **Gels as Pharmaceutical Dosage Forms: Rheological performance and physicochemical interactions at the gel-mucus interface for**

formulations intended for mucosal drug delivery. Upsala: Acta Universitatis Upsaliensis, 2003. n. 293, 76p. (Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy), 2003.

HARMAN, D. Free radical theory of aging. **Mut. Res.**, v.275, p.257-266, 1992.

HARRIS, M.I.N.C. Envelhecimento: alterações cutâneas e tratamentos dermatológicos e cosméticos. São Paulo: **Racine**, 2006.

HII,C.L. et al. Polyphenols in cocoa (Theobroma cacao L.) **As. J. Food Ag-Ind.** v. 2(04), p 702-722, 2009.

HYDE, S.T. Identification of lyotropic liquid crystalline mesophases. In: HOLMBERG, K. **Handbook of applied surface and colloid chemistry.** New York: John Wiley & Sons, 2001. p.299-332.

IBRAHIM, H.G.; SALLAM, E.; TAKIEDDIN, M.; HABBOUB, M. Effects of solutes characteristics and concentration on a lyotropic liquid crystal: solute-induced phase change. **Pharm. Res.**, Arlington, v.10, p.737-742, 1993.

KLEIN, K. Liquid crystals and emulsions: a wonderful marriage. **Cosmet. Toiletr.**, v.117, n.5, p.30-34, 2002.

KORHONEN, M., HELLEN, L., HIRVONEN, J., YLIRUUSI, J. Rheological properties of creams with four different surfactant combinations – effect of storage time and conditions. **Int. J. Pharm.**, v. 221, 187-196, 2001.

KUMASAKA, K.H.; TAKAHASHI, K.; TAGAMI, H. Electrical measurement of the water content of the stratum corneum in vivo and in vitro under various conditions: comparasion between skin surface hygrometer and corneometer in evaluation of the skin surface hydratrion state. **Acta. Dermatol. Venereol.**, v.73, p. 335-9, 1993.

LAHOUD, Mateus Humber; CAMPOS, Ranieri. **ASPECTOS TEÓRICOS RELACIONADOS À REOLOGIA FARMACÊUTICA** Visão Acadêmica, Curitiba, v.11, n.1, 2010.

LEBEL, C.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. Evaluation of probe 2',7'-Dichlorofluorescin as na indicator of reactive oxigen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v.5, p.227-231, 1992.

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Substâncias ativas em dermatologia. **Racine**, v.1, n.36, p.11-3, 1997.

LENCI, C.G. **Caracterização extrutural e química do tecido de reserva das sementes de Theobroma cacao, Theobroma obovatum e Theobroma microcarpum.** 2002. 72 p. Tese de mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos- UNICAMP, 2002.

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

LINTNER, K. et al. Cosmeceuticals and active ingredients. **Clinics in Dermatology**, vol 27, p 461–468, 2009.

MAKRANTONAKI, E., ZOUBOULIS, C.C. Molecular mechanisms of skin aging: state of the art. In: COSTA A, D. et al . Fitoestrógenos na pele envelhecida. **Surg Cosmet Dermatol**;4(2):137-49, 2012.

McCULLOUGH, J. L., KRISTEN M. K. Prevention and Treatment of Skin Aging. Understanding and Modulating Aging. In: SANTOS, J.L.M. **Novas Abordagens terapêuticas no Combate ao Envelhecimento cutâneo.** Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, 2011 Porto, 2011.

MEZZENGA, R.; MEYER, C.; SERVAIS, C.; ROSMOCANU, A.I.; SAGALOWICZ, L.; HAYWARD, R.C. Shear rheology of lyotropic liquid crystals: a case study. **Langmuir**, v.21,n.8, p.3322-3333, 2005.

MILLER, K.B. et al. Antioxidant Activity and Polyphenol and Procyanidin Contents of Selected Commercially Available Cocoa-Containing and Chocolate Products in the United States. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 4062-4068, 2006.

MORAIS, G.G. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidos de xantina para o tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite).** 2006. 158p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORLIERE, P. Ultraviolet A et peau: implications d'espèces activées de l'oxygène, tendances actuelles et résultats récents. **Phatol. Biol.**, v.40, p.160-168, 1992.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n.2, p.343–356, 2004.

NIELSEN, L.S.; SCHUBERT, L.; HANSENA, J. Bioadhesive drug delivery systems I. Characterisation of mucoadhesive properties of systems based on glyceryl monooleate and glyceryl monolinoleate. **Eur. J. Pharm. Sci.**, 6, 231–239, 1998.

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

PINTO, P.; GALEGO, N.; SILVA, N.; FITAS, M.; QUARESMA, P.; MAGALHÃES, C.; HENRIQUES, A.; RIBEIRO, H.M.; PEREIRA, L.M.; RODRIGUES, L. Definição de critérios de avaliação dos efeitos sobre a superfície cutânea de cremes hidratantes: I – análise após uma aplicação. **Rev. Port. Farm.**, v.47, n.1, p.23-34, 1997.

RAO, M.A. Measurement of viscoelastic properties of fluid and semisolid food. In: RAO, M.A.; STEFFE, J.F. Viscoelastic properties of foods. New York: **Elsevier Applied Science**, 1992. p. 207-231.

RESENDE, K.X. **Obtenção e caracterização de sistemas microemulsionados não-iônicos e estudo da atividade antibiótica in vitro de eritromicina base nesse sistema.** 2004. 103p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

RIBEIRO, C. Comportamento consumidor de produtos personal care e naturais. In: **Cosmetic Show.** Disponível em: www.medicatriz.com.br/cosmeticosetnicos. Acesso em: 01 abr. 2010.

RIEGER, M. O envelhecimento intrínseco. **Cosmet. Toiletr.**, v.8, n.4, p.34-50, 1996.

RODRIGUES, L.; PINTO, P.; SILVA, N.; GALEGO, N.; QUARESMA, P.; FITAS, M.; PEREIRA, L.M. Caracterização da eficácia biológica de hidratantes por análise dinâmica do conteúdo hídrico epidérmico e profilometria de transmissão luminosa. **Cosmet. Toiletr.**, v.9, n.2, p. 44-9, 1997.

RUFINO, M. S. M; et al. Comunicado técnico - metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre. DPPH. Fortaleza: **Embrapa**, 4 p., 2007.

SALDAÑA, M. D. A.; MOHAMED, R. S.; MAZZAFERA, P. Extraction of cocoa butter from Brazilian cocoa beans using supercritical CO₂ and ethane. **Fluid Phase Equilibria**, n. 194-197, p. 885-894, 2002.

SANBONGI, Chiaki, et al. Antioxidative Polyphenols Isolated from Theobroma cacao. **J. Agric. Food Chem.**, n. 46, p.454-457, 1998.

SANCHEZ-RABANEDA, O. et al. Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). **J. Mass Spectrometry**, n. 38; p. 35–42, 2003.

SANTOS, O. D. H. **Desenvolvimento e avaliação das propriedades físico-químicas e atividade cosmética in vivo de emulsões de óleo de Calendula officinalis com cristal líquido**. 2006. 130f. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

SAUERBRONN, A.V.D.; FONSECA, A.M.; BAGNOLE, V.R.; ASSIS, J.S.; PINOTTI, J.A.; Efeitos do hipoestrogenismo e do envelhecimento sobre a pele. **Rev. Ginec. e Obstet.**, 9(4):246-251, 1998.

SCHRAMM, G. A practical approach to rheology and rheometry. 3rd.ed. Karlsruhe: **ThermoHaake**, 2002. 291p.

SERUP, J. A double-blind comparison of two creams containing urea as the active ingredient. **Acta. Dermatol. Venereol.**, Suppl.177, p.34-8, 1992.

SIMÕES, C. M. O. et al; **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Editora da UFSC, Porto Alegre, 2007. pg 895, 896.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **Am. J. Enol Vitic**, v 16 (3): 144-6, 1965.

SOUSA, C.M.M.;et al. Fenóis totais e a atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOTIRO, K. R.; **Estudo da estabilidade química, física e permeação cutânea da eritromicina veiculada em sistemas líquido-cristalinos para tratamento da Acne vulgaris**. 2007. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Brasil, 2007.

TABERNERO, M., SERRANO, J. and SAURA-CALIXTO, F. The antioxidant capacity of cocoa products: contribution to the Spanish diet. **Int. J. Food Sci Tech.**, v. 41, p. 28-32, 2006.

TAGAMI, H.; OHI, M.; IWATSUKI, K.; KANAMARU, Y.; YAMADA, M.; ICHIJO, B. Evaluation of the skin surface hydration in vivo by electrical measurement. **J. Invest. Dermatol.**, v. 75, n. 6, p. 500 – 7, 1980.

URBAN, M.C.C. **Desenvolvimento de sistemas de liberação micro e nanoestruturados para administração cutânea do acetato de dexametasona.** 2004. 136p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2004.

VAN SCOTT, E. J.; YU, R. J. Biodisponibilidade de alfa-hidroxiácidos em Formulações Tópicas. **Cosméticos On Line**, n. 104, p. 38-44, 1997.

WATANABE, M.; TAGAMI, H.; HORRI, I.; TAKAHASHI, M.; KLIGMAN, A.M. Functional analyses of the superficial stratum corneum in atopic xerosis. **Arch. Dermatol.**, v.127, n.9, p.1689-92, 1991.

WATERHOUSE, A. L. et al. Antioxidants in chocolate. **The Lancet**, vol 348, September 21, p. 834 ,1996.

WERKER, E. **Seed anatomy**: encyclopedia of plant anatomy. Stuttgart:Borntraeger, 424p, 1997.

WOODLEY, J. Bioadhesion, new possibilities for drug administration? **Clin.Pharmacokinet**, v.40(2), p. 77-84, 2001.