

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE CAJÁ-MANGA (*Spondias
dulcis* PARKINSON) POTENCIALMENTE ATIVOS E SEGUROS PARA
OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE**

JOSÉ RICARDO SOARES DE OLIVEIRA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE CAJÁ-MANGA (*Spondias
dulcis* PARKINSON) POTENCIALMENTE ATIVOS E SEGUROS PARA
OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE**

JOSÉ RICARDO SOARES DE OLIVEIRA

Tese 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 obtenção
do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

ARARAQUARA - SP

2011

Ficha Catalográfica

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

Oliveira, José Ricardo Soares de

O48c Caracterização de extratos de cajá-manga (*Spondias dulcis* Parkinson)
potencialmente ativos e seguros para obtenção de fitocosmético
antioxidante / José Ricardo Soares de Oliveira. – Araraquara, 2011
210 f. : il.

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

Orientador: Vera Lucia Borges Isaac

. 1.Cajá-manga. 2. Spondias dulcis. 3. Compostos fenólicos. 4. Radicais
livres. 5. Antioxidantes. 6. Toxicidade. 7. Fitocosméticos. I. Isaac, Vera
Lucia Borges,orient. II.Título.

CAPES: 40300005

CANDIDATO: JOSÉ RICARDO SOARES DE OLIVEIRA

TÍTULO DA TESE:

CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE CAJÁ-MANGA (*Spondias dulcis* PARKINSON) POTENCIALMENTE ATIVOS E SEGUROS PARA OBTENÇÃO DE FITOCOSMÉTICO ANTIOXIDANTE

A comissão Julgadora dos trabalhos de defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 01 de setembro de 2011, considera o candidato:

☒ (X) APROVADO

☐ () REPROVADO

1) Presidente: (Profª. Dra. Vera Lucia Borges Isaac)_____

2) Examinador: (Prof. Dr. Pedro Alves da Rocha Filho)_____

3) Examinador: (Prof. Dr. Roni Antonio Mendes)_____

4) Examinadora: (Profª. Dra. Adélia Emília de Almeida)_____

5) Examinador: (Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos) _____

Eu não amo o homem menos, mas a natureza mais!

Falta ao homem humanidade.

***O que eu quero, eu vou conseguir, pois quando eu quero todos querem, e
todo aquele que é nascido de Deus vence o mundo!***

O tempo não pára, mas os sonhos não envelhecem!

Dedico este trabalho com particularidade,

*Aos meus pais, José e Nadir, pelo amor e carinho com que se dedicaram
à minha educação e sempre me ensinaram os caminhos da honestidade,
humildade, bondade e amor, os grandes sentimentos que regem a vida dos
seres humanos, em especial a minha mãe pela figura de educadora.*

*Aos meus irmãos, Alexandre e Angelina, e a todos os meus amigos, pelo
estímulo, apoio e pelo amor que nos une.*

*Priscila sonho que se sonha só é só um sonho, mas sonhamos juntos este
momento que agora se faz real, a você minha companheira e amada sem a
qual a esse momento e vida é um nada, a você todo amor que houver nesta
vida! E, os seus familiares José Wanderlei, Zilda, Camila e vó Lourdes o
meu obrigado, pelo apoio, incentivo, suporte, pelas orações, carinho e
amor e a amada filha a mim confiada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho. Manifesto minha gratidão a todas elas e de forma particular:

À Deus e Nossa Senhora, em primeiro lugar, por terem me dado força, ânimo, sabedoria e pela graça da conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, José e Nadir, pelo amor incondicional, compreensão, força, estímulo e participação em todos os momentos difíceis.

Aos meus irmãos Alexandre e Angelina, pela alegria, amor e carinho.

À minha amada e companheira Priscila, que esteve presente em todos os momentos da realização deste trabalho, por todo amor, carinho, dedicação, cuidado e paciência.

A todos os meus familiares e de Priscila, e todos os amigos que estiveram presentes durante esta jornada.

À minha orientadora, Prof. Dra. Vera Lucia Borges Isaac e a Prof. Dra. Chung Man Chin, pelos ensinamentos, amizade, apoio, respeito e incentivo em todos os momentos da realização desse trabalho. Agradeço a oportunidade que me foi dada.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela confiança e colaboração, abrindo as portas de seu laboratório, por toda atenção, dedicação e por sua participação ativa e grande contribuição a este durante a jornada, minha amizade eterna a você e seus familiares.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Corrêa, pelo apoio, amizade, incentivo, pela atenção, paciência, desabafos, admiração e ensinamentos durante todos os momentos da realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Raquel Regina Duarte minha professora e amiga e ao Técnico e amigo Luiz Eduardo dos Santos pela amizade, incentivo e apoio.

Ao Prof. Dr. Jean Leandro Santos pelo apoio, amizade, incentivo e contribuição durante este trabalho.

À Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida pela força, amizade e contribuição durante este trabalho.

À Profa. Dra. Rosemeire Pietro, pelo incentivo, carinho e amizade.

À Profa. Dra. Maria Virgínia Scarpa Gomes de Oliveira e a técnica Fátima, pelo incentivo, carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Vitor do Sacramento, pelo incentivo, carinho e amizade.

À Profa. Dra. Márcia da Silva, pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. João Aristeu da Rosa, pelo uso do microscópio de fluorescência, pelo apoio e colaboração.

Aos colegas de trabalho, todos os professores, alunos e funcionários da Uniara, em especial aos Profs. Bruno Mancini, Profa. Dra. Thalita Formariz e Prof. Dr. Antonio Távora, e aos Profs. Leonardo Gorla, Andréia Moreno, Rogério Lustri, Tereza Cazuco e a funcionária Iara, meus sinceros agradecimentos pelo apoio.

Aos amigos de longa data e com os quais dividi muitas jornadas na vida e no trabalho, Rogério Cardoso de Castro, Roni Antonio Mendes, Regiane Rocha Gonçalves, aos amigos Fábio Frederico e Luis Coelho.

Aos colegas de laboratório, Bruna, Paulo Renato, Emerson, Renato Menegon, Lorena Blau, Ednir, Elaíse, Jemima, Guilhermee a tantos outros que em algum momento foram presentes (Laboratórios de Cosmetologia, Farmacognosia, Desenvolvimento de Fármacos, Biotecnologia e Bioequivalência) e todos os estagiários (especialmente a Bruna, Maísa e Helena) pela convivência e amizade.

Aos técnicos Margarete, Angélica, Osmar, Mateus, Ilza, Maria e Rodrigo, agradeço a atenção, disponibilidade e toda a ajuda prestada sempre que necessário e solicitado.

A todos os meus irmãos Curvianos, amigos de infância (especialmente ao Nenê, Nando e Gelson) e da vida e a minha eterna amizade, carinho, convivência e apoio.

Às minhas eternas segunda mãe Dona Maria da Curva de Rio, Marijuana e Maria do Rosário, pelo carinho, amizade, convivência e apoio.

À Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado e todas as funcionárias da seção de Pós-Graduação, especialmente à Cláudia, Sônia e Laura, pela ajuda paciência e valiosas orientações.

A secretária mais alegre e gente boa do Departamento de Fármacos e Medicamentos, a contagiante Queila Leme meus sinceros agradecimentos.

À toda equipe da biblioteca da FCF (UNESP), pelo auxílio nas correções;

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, todos os funcionários que me acompanham de longa jornada na UNESP, professores dos Departamentos de Fármacos e Medicamentos, de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, de Ciências Biológicas e de Análises Clínicas, porteiro, vigias, pessoal do apoio e informática, meus sinceros agradecimentos .

*“Mais uma dose? É claro!É claro que eu tôafim.
A noite nunca tem fim.Por que quê a gente é assim?...”*

Cazuza

Resumo

Os frutos de *Spondias dulcis*, popularmente conhecidos no Brasil como cajá-manga ou cajarana, são de formato ovóide, de polpa amarela e sementecaracterística. Essa espécie tem despertado grande interesse devido ao seu potencial funcional, principalmente por apresentar compostos fenólicos de capacidade antioxidante, podendo ser úteis na prevenção do envelhecimento precoce da pele, provocado pelo estresse oxidativo, podendo assim ser utilizada em formulação de uso tópico com potenciais efeitos benéficos para a pele. Foram produzidos 14 extratos diferentes a partir da polpa do fruto, estabilizada e convenientemente seca. Os extratos foram avaliados quanto ao teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante com os radicais DPPH[•] e ABTS[•]. O extrato obtido por maceração 2:10 m/v (M20) utilizando etanol 70° GL apresentou maior rendimento, teor de fenólicos totais e atividade antioxidante, além de não apresentar toxicidade nos ensaios de micronúcleo e citotoxicidade. A análise do extrato M20 etanólico 70° GL por cromatografia líquida de alta eficiência e por cromatografia em camada delgada permitiu a identificação, pela primeira vez na espécie, de rutina e de ácido clorogênico, substâncias com conhecida atividade antioxidante, confirmando os resultados preliminares obtidos nos ensaios de triagem fitoquímica (positiva para flavonoides). O extrato M20 foi incorporado em três concentrações distintas em formulação cosmética cuja estabilidade foi avaliada sob condições de estresse térmico e físico, analisando-se os seguintes parâmetros durante o período de 90 dias: pH, densidade e viscosidade. Os resultados apontam para o potencial uso de formulação fitocosmética estável, contendo extrato seco da polpa de *S. dulcis* capaz de minimizar os efeitos deletérios provocados pelos radicais livres, com propriedades na prevenção do envelhecimento cutâneo.

Palavras-chave: cajá-manga, *Spondias dulcis*, compostos fenólicos, radicais livres, antioxidante, toxicidade, fitocosméticos.

Abstract

The fruits of *Spondias dulcis*, popularly known in Brazil as cajá-manga or cajarana, are ovoid, with yellow pulp and characteristic seeds. This species contains phenolic compounds and may be useful in preventing premature skin aging caused by oxidative stress. Thus, it could be used in topical formulation with potential beneficial effects on skin. Fourteen different extracts were produced from the stabilized and dried pulp. The phenolic content and antioxidant activity (DPPH[•] and ABTS) of extracts were evaluated. The extract 2:1 m/v (M20) obtained with ethanol 70°GL presented higher yield, phenolic content and antioxidant activity. Additionally, this extract has not presented toxicity in both micronucleus and cytotoxicity assays. Rutin and chlorogenic acid (antioxidant compounds) were identified in M20 by high performance liquid chromatography and thin layer chromatography analysis. The extract M20 was incorporated (three different concentrations) in cosmetic formulations and the stability of formulations was evaluated (pH, viscosity and density) for a period of 90 days. The results of this work suggest the potential use of *S. dulcis* pulp fruit in a stable phytocosmetic formulation with antioxidant properties and useful in preventing premature skin aging caused by oxidative stress.

Keywords: cajá-manga, *Spondias dulcis*, phenolic compounds, free radicals, antioxidant, toxicity, phytocosmetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Distribuição geográfica da <i>S. dulcis</i> nas Ilhas da Sociedade no Pacífico Sul, Oceania, Polinésia e Melanésia.....	31
Figura 1.2	Árvore de <i>S. dulcis</i> (cajá-manga). No detalhe, frutos em cachos.....	32
Figura 1.3	Estrutura da cajá-manga verde-madura.....	33
Figura 1.4	Estrutura do ácido ascórbico.....	46
Figura 1.5	Reação do α -tocoferol (sendo R, a sua cadeia lateral) com radicais peroxila (LOO $\cdot$), formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e sua regeneração pela vitamina C, originando o radical ascorbila.....	47
Figura 1.6	(A) Estrutura básica dos flavonóides e (B) Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4.....	48
Figura 1.7	Principais classes de flavonóides.....	49
Figura 1.8	Estabilização do radical DPPH $\cdot$ por um antioxidante.....	53
Figura 1.9	Estabilização do radical ABTS $\cdot$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	53
Figura 2.1	Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de <i>S. dulcis</i> a 1:10 (m/v).	70
Figura 2.2	Fluxograma de obtenção e rendimento dos extratos de <i>S. dulcis</i> a 2:10 (m/v).	70
Figura 2.3	Obtenção e pré-tratamento do extrato M20 EtOH 70° GL obtido da polpa de <i>S. dulcis</i> para análise por CLAE-UV	76
Figura 2.4	Processo de conservação e obtenção da droga vegetal.....	85
Figura 2.5	Extrato obtido por maceração 2:10 em etanol 70° GL.....	90
Figura 2.6	Cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos obtidos por maceração e padrões de ácidos fenólicos.....	93
Figura 2.7	Cromatogramas (CLAE-UV) da fração 03 (ao centro) obtida do fracionamento e tratamento do extrato M20 EtOH 70° GL e padrões de rutina (acima) e ácido clorogêncio (abaixo) analisados em comprimento de onda 325 nm.....	95
Figura 2.8	Perfil espectrofotométrico referente à análise do extrato etanólico obtido a partir de polpa seca de fruta madura.....	96
Figura 2.9	Perfil espectrofotométrico referente à análise do extrato hidroalcoólico obtido a partir de polpa seca de fruta madura.....	97

Figura 2.10	Autobiografia da cromatoplaça de extrato M20 EtOH 70.....	99
Figura 2.11	Resultado visual da redução dos radicais ABTS• (esquerda) e DPPH• (direita) na presença de antioxidantes presentes nos extratos.....	101
Figura 2.12	Curvas analíticas dos padrões de ácido gálico e rutina.....	109
Figura 2.13	Avaliação da citotoxicidade dos extratos macerados com EtOH 70° GL.....	112
Figura 2.14	Reticulócito normal e reticulócito micronucleado (coloração: laranja de acridina).....	114
Figura 2.15	Inibição (%) dos radicais DPPH• (esquerda) e ABTS• (direita) pelos diferentes extratos obtidos a 1:10 (m/v); (onde A : M 10 EtOH; B : M 10 EtOH 70; C : T 10 EtOH; D : T 10 EtOH 70; E : R 10 EtOH; F : R 10 EtOH 70; G : P 10 EtOH); (*p< 0,05 em relação a todos os extratos, exceto o R 10 EtOH).....	122
Figura 2.16	Inibição (%) dos radicais DPPH• (esquerda) e ABTS• (direita) pelos diferentes extratos obtidos a 2:10 (m/v); (onde A : M 20 EtOH; B : M 20 EtOH 70; C : T 20 EtOH; D : T 20 EtOH 70; E : R 20 EtOH; F : R 20 EtOH 70; G : P 20 EtOH); (*p< 0,05 em relação a todos os extratos, exceto o R 20 EtOH).....	123
Figura 2.17	Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500, 1500 e 2500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20. *p<0,05 (em relação ao controle negativo); **p<0,05 (em relação ao extrato M 10).....	123
Figura 3.1	Ilustração da técnica de preparo de soluções amostras para a determinação do FPS.....	131
Figura 3.2	Aspecto do creme base e fitocosméticos após adição dos extratos.....	133
Figura 3.3	Aspecto do CR cajá-manga 20 submetido à temperatura de 45 ± 2° C após 90 dias.....	135
Figura 3.4	Aspecto do creme ao final do prazo de estabilidade acelerada.....	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Características físicas e químicas do cajá (<i>Spondias lutea</i>), de acordo com diversos autores.....	34
Tabela 1.2	Relação efeito eritematogênico (EE) versus Intensidade da radiação (I) conforme o comprimento de onda.....	44
Tabela 2.1	Condições utilizadas no processo de extração.....	72
Tabela 2.2	Grupos de animais tratados com os controles e extratos de <i>S. dulcis</i> obtido por diferentes processos extrativos.....	82
Tabela 2.3	Triagem fitoquímica com material vegetal e extrato obtidos de <i>S. dulcis</i>	86
Tabela 2.4	Rendimento dos extratos de <i>S. dulcis</i> , obtidos por diferentes processos extrativos utilizando diferentes solventes, em % de massa obtida de extrato seco/ 10 e 20 g massa inicial de droga (m/m).....	90
Tabela 2.5	Determinação do pH obtidos nas análises de diferentes extratos.....	91
Tabela 2.6	Valores dos picos com respectiva absorvidade obtida em análise espectrométrica de extrato etanólico obtido a partir de polpa seca de fruta madura.....	96
Tabela 2.7	Valores dos picos com respectiva absorvidade obtida em análise espectrométrica de extrato hidroalcoólico obtido a partir de polpa seca de fruta madura.....	97
Tabela 2.8	Resultado do rendimento e da redução dos radicais DPPH [•] e ABTS [•] pelos extratos de <i>S. dulcis</i> obtidos por diferentes processos extrativos 1:10 (m/v) em diferentes solventes.....	102
Tabela 2.9	Resultado do rendimento e da redução dos radicais DPPH [•] e ABTS [•] pelos extratos de <i>S. dulcis</i> obtidos por diferentes processos extrativos 2:10 (m/v) em diferentes solventes.....	105
Tabela 2.10	Teor de fenólicos totais equivalente à ácido gálico em µg /100mg de extrato.....	109
Tabela 2.11	Teor de fenólicos totais equivalente à rutina em µg /100mg de extrato.....	109
Tabela 2.12	Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD).	115
Tabela 3.1	Composição percentual do sistema emulsionado contendo extrato de cajá-manga.....	126
Tabela 3.2	Valores de pH, densidade (g/cm ³) e viscosidade (Pas) do creme base.....	133

Tabela 3.3	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	137
Tabela 3.4	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	138
Tabela 3.5	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	139
Tabela 3.6	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	140
Tabela 3.7	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	141
Tabela 3.8	Valores médios de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	142
Tabela 3.9	Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	144
Tabela 3.10	Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	145
Tabela 3.11	Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	146
Tabela 3.12	Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	147
Tabela 3.13	Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	148
Tabela 3.14	Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	149
Tabela 3.15	Valores de absorvância e porcentagem de inibição no ensaio de atividade antioxidante dos fitocosméticos.....	151
Tabela 3.16	Valores de fator de proteção solar do creme base e fitocosméticos.....	153

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato M10 EtOH.....	102
Gráfico 2.2	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato M10 EtOH.....	102
Gráfico 2.3	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato M10 EtOH 70° GL.....	103
Gráfico 2.4	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato M10 EtOH 70° GL	103
Gráfico 2.5	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato T10 EtOH.....	103
Gráfico 2.6	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato T10 EtOH.....	103
Gráfico 2.7	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato T10 EtOH 70° GL.....	103
Gráfico 2.8	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato T10 EtOH 70° GL	103
Gráfico 2.9	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato R10 EtOH.....	104
Gráfico 2.10	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato R10 EtOH.....	104
Gráfico 2.11	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato R10 EtOH 70° GL.....	104
Gráfico 2.12	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato R10 EtOH 70° GL	104
Gráfico 2.13	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato P10 EtOH.....	104
Gráfico 2.14	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato P10 EtOH.....	104
Gráfico 2.15	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato M20 EtOH.....	105
Gráfico 2.16	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato M20 EtOH.....	105
Gráfico 2.17	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato M20 EtOH 70° GL.....	106
Gráfico 2.18	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato M20 EtOH 70° GL	106
Gráfico 2.19	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato T20 EtOH.....	106
Gráfico 2.20	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato T20 EtOH.....	106
Gráfico 2.21	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato T20 EtOH 70° GL.....	106
Gráfico 2.22	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato T20 EtOH 70° GL	106
Gráfico 2.23	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato R20 EtOH.....	107
Gráfico 2.24	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato R20 EtOH.....	107
Gráfico 2.25	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato R20 EtOH 70° GL.....	107
Gráfico 2.26	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato R20 EtOH 70° GL	107
Gráfico 2.27	Inibição (%) do radical DPPH [•] pelo extrato P20 EtOH.....	108
Gráfico 2.28	Inibição (%) do radical ABTS [•] pelo extrato P20 EtOH.....	108
Gráfico 2.29	Curva analítica de absorvância da solução padrão de rutina.....	112

- Gráfico 2.30** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo) e água (controle negativo)..... 116
- Gráfico 2.31** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por maceração de 1:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70° 116
GL.....
- Gráfico 2.32** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por maceração de 2:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70° 117
GL.....
- Gráfico 2.33** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por turbólise 2:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70° 118
GL.....
- Gráfico 2.34** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por refluxo 2:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70° 118
GL.....
- Gráfico 2.35** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 119
20.....
- Gráfico 2.36** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 1500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 119
20.....
- Gráfico 2.37** Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com

	2500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 120 20.....	120
Gráfico 3.1	Valores de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	137
Gráfico 3.2	Valores de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	138
Gráfico 3.3	Valores de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar.....	139
Gráfico 3.4	Valores de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	141
Gráfico 3.5	Valores de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	142
Gráfico 3.6	Valores de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	143
Gráfico 3.7	Valores de densidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	144
Gráfico 3.8	Valores de densidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	145
Gráfico 3.9	Valores de densidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	146
Gráfico 3.10	Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	148
Gráfico 3.11	Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	149
Gráfico 3.12	Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada.....	150
Gráfico 3.13	Reograma da curva de fluxo do creme base efitocosméticos no dia 1 e no dia 90.....	150
Gráfico 3.14	Valores de absorvância e porcentagem de inibição no ensaio de atividade antioxidante dos fitocosméticos.....	152

ABREVIATURAS

ABTS	ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
BM	Banho-Maria
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
CCDC	Cromatografia em camada delgada comparativa
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência
CR base	Creme base
CR cajá-manga 5	Creme adicionado de 5% de extrato de cajá-manga
CR cajá-manga 10	Creme adicionado de 10% de extrato de cajá-manga
CR cajá-manga 20	Creme adicionado de 20% de extrato de cajá-manga
DPPH•	2,2-difenil-2-picrilhidrazida
DV	Droga vegetal
EHA	Extrato hidroalcoólico
EOH	Extrato etanólico
EtOH	Etanol
EtOH 70	Etanol 70° GL
FPS	Fator de proteção solar
g	Gramma
%INIBIÇÃO	Porcentagem de inibição
mp _v	Massa do picnômetro vazio
mp _a	Massa do picnômetro com amostra
m/v	Massa/volume
mg	Miligramma
ml	Mililitro
µg	Microgramma
M10 EtOH	Extrato obtido por maceração a 10% em etanol
M10 EtOH 70	Extrato obtido por maceração a 10% em etanol 70° GL
M20 EtOH	Extrato obtido por maceração a 20% em etanol
M20 EtOH 70	Extrato obtido por maceração a 20% em etanol 70° GL

MN	Micronúcleo
MNRET	Reticulócito micronucleado
OMS	Organização Mundial da Saúde
p/p	Peso/peso
PC	Peso Corpóreo
P10 EtOH	Extrato obtido por percolação a 10% em etanol
P20 EtOH	Extrato obtido por percolação a 20% em etanol
R10 EtOH	Extrato obtido por refluxo a 10% em etanol
R10 EtOH 70	Extrato obtido por refluxo a 10% em etanol 70° GL
R20 EtOH	Extrato obtido por refluxo a 20% em etanol
R20 EtOH 70	Extrato obtido por refluxo a 20% em etanol 70° GL
rpm	Rotações por minuto
T10 EtOH	Extrato obtido por turbólise a 10% em etanol
T10 EtOH 70	Extrato obtido por turbólise a 10% em etanol 70° GL
T20 EtOH	Extrato obtido por turbólise a 20% em etanol
T20 EtOH 70	Extrato obtido por turbólise a 20% em etanol 70° GL
UV	Ultravioleta
v/v	Volume/volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO.....	23
1.2 OBJETIVOS.....	28
1.2.1 Objetivo geral.....	28
1.2.2 Objetivos específicos.....	28
1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
1.3.1 Família <i>Anacardiaceae</i>	29
1.3.2 Cajá-manga ou cajarana - <i>S. dulcis</i> Parkinson sin. <i>Spondias cytherea</i> Sonn.....	30
1.3.3 Metabólitos secundários – compostos fenólicos.....	35
1.3.4 Radical Livre, envelhecimento, fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese.....	38
1.3.5Espectro de radiação ultravioleta e seus efeitos.....	41
1.3.6 Fotoprotetores.....	42
1.3.6.1 Determinação do fator de proteção solar – FPS.....	42
1.3.6.2 Métodos <i>in vitro</i> de determinação do FPS.....	43
1.3.7 Papel das substâncias antioxidantes na saúde.....	45
1.3.8 Antioxidantes naturais.....	46
1.3.8.1 Vitaminas.....	46
1.3.8.2 Flavonóides.....	48
1.3.9 Metodologias e mecanismos empregados na determinação da capacidade antioxidante.....	52
1.3.9.1Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•	52
1.3.9.2. Capacidade antioxidante frente ao radical ABTS•.....	53
1.3.10 Extração de antioxidantes naturais.....	54
1.3.11Avaliação da toxicidade.....	56

1.3.11.1 A importância da avaliação da citotoxicidade.....	58
1.3.11.2 A importância da avaliação da mutagenicidade.....	58
1.3.12 Fitocosméticos.....	59
1.3.13 Padronização química e dos processos para obtenção de extratos.....	61

CAPÍTULO 2 – Obtenção e avaliação dos extratos

2.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1.1 Equipamentos e acessórios.....	63
2.1.2 Reagentes e solventes.....	64
2.1.3 Preparo da exsicata para identificação botânica.....	65
2.1.4 Material vegetal.....	66
2.1.5 Obtenção da droga vegetal.....	66
2.1.6 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes na polpa dos frutos de <i>S. dulcis</i>	67
2.1.6.1 Identificação de flavonoides.....	67
2.1.6.2 Identificação de taninos.....	68
2.1.6.3 Identificação de saponinas.....	69
2.1.6.4 Identificação de antraquinonas.....	69
2.1.7 Obtenção dos extratos a partir de polpa de frutos de <i>S. dulcis</i>	70
2.1.7.1 Obtenção de extratos por maceração da polpa de frutos de <i>S. dulcis</i>	70
2.1.7.2 Obtenção de extratos por turbólise da polpa de frutos de <i>S. dulcis</i>	71
2.1.7.3 Obtenção de extratos por refluxo da polpa de frutos de <i>S. dulcis</i>	71
2.1.7.4 Obtenção de extratos por percolação da polpa de frutos de <i>S. dulcis</i>	72
2.1.8 Purificação, secagem e armazenamento dos extratos.....	72
2.1.9 Determinação do pH dos extratos.....	73
2.1.10 Perfil cromatográfico.....	73
2.1.10.1 Cromatografia em camada delgada comparativa.....	73
2.1.10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	74
2.1.10.2.1 Pré-tratamento da amostra.....	74
2.1.10.2.2 Preparação dos padrões e dos analitos.....	75
2.1.10.2.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato M20 EtOH 70° GL	75

2.1.11 Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta.....	76
2.1.12 Estudo da ação antioxidante <i>in vitro</i>	77
2.1.12.1 Ensaio de autobiografia em CCD para avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•	77
2.1.12.2 Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH•	77
2.1.12.3 Avaliação da atividade antioxidante total pelo ABTS•.....	78
2.1.13 Determinação do teor de fenólicos totais.....	79
2.1.14 Determinação do teor de flavonóides totais.....	79
2.1.15 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de <i>S. dulcis</i>	80
2.1.16 Ensaio de mutagenicidade dos extratos etanólicos 70° GL obtidos de <i>S. dulcis</i> através do teste de micronúcleo.....	81
 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 84
2.2.1 Preparo da exsicata e identificação botânica.....	84
2.2.2 Obtenção da droga vegetal.....	84
2.2.3 Análises físicas e químicas do material vegetal.....	85
2.2.4 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes na polpa dos frutos de <i>S. dulcis</i>	86
2.2.5 Obtenção dos extratos.....	89
2.2.6 Determinação do pH dos extratos obtidos.....	91
2.2.7 Cromatografia em camada delgada comparativa.....	92
2.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência	93
2.2.9 Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta.....	96
2.2.10 Estudo da ação antioxidante <i>in vitro</i>	98
2.2.10.1 Ensaio de autobiografia em CCD para avaliação da atividade utilizando radical livre DPPH•	98
2.2.10.2 Avaliação da atividade antioxidante captura dos radicais livres DPPH• e ABTS•.	99
2.2.11 Determinações do teor de compostos fenólicos totais.....	108
2.2.12 Determinações do teor de flavonoides totais.....	111
2.2.13 Avaliação da citotoxicidade dos macerados obtidos de <i>S. dulcis</i>	112

2.2.14 Avaliação da mutagenicidade dos diferentes extratos obtidos de <i>S. dulcis</i> através do teste de micronúcleo.....	113
2.2.15 Escolha do extrato e otimização das condições de extração a partir de polpa seca de frutos de <i>S. dulcis</i>	121

CAPÍTULO 3 – Obtenção e avaliação dos fitocosméticos

3.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	125
3.1.1 Equipamentos.....	125
3.1.2 Reagentes.....	125
3.1.3 Formulação proposta do fitocosmético.....	126
3.1.3.1 Preparo do creme base.....	126
3.1.4 Estudo da estabilidade.....	127
3.1.4.1 Centrifugação.....	127
3.1.4.2 Estresse térmico.....	128
3.1.4.3 Avaliação macroscópica.....	128
3.1.4.4 Determinação do valor do pH	128
3.1.4.5 Determinação e avaliação da densidade.....	129
3.1.4.6 Determinação e avaliação da viscosidade.....	129
3.1.5 Avaliação da atividade antioxidante dos fitocosméticos.....	130
3.1.6 Avaliação do fator de proteção solar dos fitocosméticos.....	130
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	132
3.2.1 Formulação.....	132
3.2.2 Estudo da estabilidade preliminar e acelerada.....	134
3.2.2.1 Centrifugação.....	134
3.2.2.2 Avaliação macroscópica.....	135
3.2.2.3 Determinação do valor do pH	136
3.2.2.4 Determinação e avaliação da densidade.....	143
3.2.2.5 Determinação e avaliação da viscosidade.....	146
3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante dos fitocosméticos.....	151

3.1.6 Avaliação do fator de proteção solar dos fitocosméticos.....	152
--	-----

CAPÍTULO 4

4.1 CONCLUSÕES.....	154
---------------------	-----

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	155
-----------------------------------	-----

ANEXOS.....	183
-------------	-----

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

Cosméticos antienvelhecimento cutâneo, antirradicais livres e protetores solares surgiram no mercado como alternativas para a correção e prevenção de um dos problemas que acompanham a vida do homem, o envelhecimento da pele.

A partir da década de 1990 até a atualidade, tem ocorrido uma grande tendência ao desenvolvimento de produtos cosméticos contendo princípios ativos obtidos de fontes naturais, com destaque para descoberta de substâncias com propriedade antioxidante capazes de prevenir e minimizar o envelhecimento da pele. Em constante evolução, a indústria cosmética aposta neste enfoque importante da comprovação científico fitocosmético, caracterizado como tendência nacional e mundial.

Entendida como o segmento da Cosmetologia que se dedica ao estudo e aplicação das substâncias de origem vegetal, a fitocosmética está aliada à biodiversidade brasileira, fonte de várias substâncias ativas.

Muitos cientistas no Brasil e no mundo discutem e investigam a biodiversidade mundial. O Brasil possui enorme biodiversidade, uma das mais ricas floras do mundo e os poucos estudos existentes sobre estes materiais justificam a busca de maior desenvolvimento nesta área. Uma vez que a biodiversidade brasileira não é totalmente estudada, milhões de espécies distintas de vegetais, micro-organismos ou animais podem ser pesquisados (GUERRA e NODARI, 2001).

O cajá-manga (*Spondias dulcis*) fazendo parte do universo da biodiversidade sudoeste brasileira pode explorar, de modo sustentável, os potenciais recursos de diferentes territórios, proporcionando a prospecção de ativos com capacidades diversas dentro da cosmetologia e outras áreas de aplicação afins. Através de um desenvolvimento sustentável, este enorme potencial pode ser transformado em fonte inesgotável e renovável de matérias primas, alternativas aos produtos sintéticos. O emprego destes recursos deve sempre seguir as normas no que diz respeito aos requisitos de eficácia e segurança e muitos trabalhos na literatura relatam a falta de qualidade na produção, comercialização e prescrição de produtos

farmacêuticos e cosméticos, tanto em países em desenvolvimento, quanto em países desenvolvidos (RATES, 2001).

A obtenção de um produto de interesse cosmético a partir de um vegetal necessita de um conjunto de procedimentos que garanta a qualidade final (CARVALHO; PACHIONI, 1989; SIMÕES *et al.*, 2004; FERREIRA, 2003) e estudos de estabilidade (MADDEN; JACKSON, 1981; D'LEON, 2001; ISAAC *et al.*, 2008).

Estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos são de vital importância para a seleção de plantas passíveis de serem investigadas quanto a sua utilidade cosmética. Esta abordagem tem se mostrado eficiente na descoberta de novas substâncias, em contraste com outras abordagens, como triagens fitoquímicas, *screening* biológico de plantas coletadas ao acaso e, ainda, investigações fitoquímicas com o objetivo de identificar novos compostos químicos (SIMÕES *et al.*, 2004).

Apadronização de produtos derivados de plantas é realizada com base na identificação e quantificação de um ativo ou classe de princípios ativos ou através de uma substância marcadora presente em um extrato concentrado. No caso da padronização empregando uma substância marcadora, deve ser considerada, também, a presença dos demais componentes que asseguram a atividade preconizada. Ainda, para assegurar uniformidade na ação de um produto, é recomendada a aplicação de métodos farmacológicos e clínicos com posterior análise qualitativa e quantitativa do perfil químico do extrato (TYLER, 1999).

A quantificação dos princípios ativos de plantas pode ser feita de várias maneiras. Os métodos mais utilizados são os cromatográficos e, dentre as técnicas mais utilizadas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a indicada para os compostos não-voláteis e a cromatografia gasosa para os voláteis.

Para restabelecimento do equilíbrio redox cutâneo, bem como para prevenção ou tratamento de patologias causadas por estresse oxidativo, são utilizadas muitas classes de substâncias antioxidantes provenientes de produtos naturais. Muitos extratos são veiculados em formulações para uso tópico, tendo sua eficácia comprovada. Além disso, inúmeras são as formas orais de suplementação, como a ingestão de chás, cápsulas, decoctos, entre outros. Estudos descritos na literatura abordam o uso de antioxidantes oriundos de produtos naturais. A eficácia de antioxidantes desta origem é extensamente investigada, principalmente frente aos efeitos da radiação UV capazes de provocar reações radicalares e suas consequências, sendo utilizados alguns extratos como o de *Calendula officinalis* (CORDOVA *et al.*, 2002),

de *Polypodium leucotomos* (GOMES *et al.*, 2001), de *Pothomorphe umbellata* (ROPKE *et al.*, 2003), entre muitos outros, a fim de prevenir ou amenizar os efeitos causados pela radiação UV, como o envelhecimento dérmico.

Os antioxidantes naturais são promissores na prevenção do câncer de pele, pois muitos já mostraram efeitos anticarcinogênico e antimutagênico, além de baixa toxicidade. Assim, o uso de substâncias antioxidantes, por via oral ou tópica, pode auxiliar os sistemas endógenos de proteção da epiderme, além de contribuir para prevenção de problemas em longo prazo (AFAQ *et al.*, 2002).

Fitofármacos são princípios ativos descritos e de estrutura química e propriedade farmacológica conhecida; entretanto, como qualquer produto eficaz, é importante conhecer a concentração dos compostos na planta para que uma dose adequada possa ser utilizada pelo usuário com segurança. Este é um problema importante em cosméticos, pois a maioria dos componentes ativos empregados não é padronizada, sendo verificada por análise visual direta que a embalagem do produto não informa a concentração do princípio ativo, respeitando a exigência da legislação vigente no país referente a produtos cosméticos, e que, por isso, necessitam serem revisadas. Assim, a qualidade e a concentração de ativos de um determinado fitocosmético influenciando na sua eficácia, podem variar de acordo com o fabricante, entre outros fatores diretamente relacionados ao produto.

Conforme a Resolução 343/2005, a ANVISA estabelece a reorganização do sistema de controle sanitário dos produtos cosméticos, definindo e classificando-os. Assim, aqueles caracterizados como Grau de Risco 1 a notificação, para fins do registro do produto, deve ser feita até 30 dias antes da comercialização. Os de Grau de Risco 2 continuam necessitando para o registro, conforme legislação, comprovação da eficácia e segurança. O fabricante ou importador deve, ainda, possuir dados que atestem a qualidade, segurança e eficácia de todos os seus produtos, bem como a idoneidade dos respectivos dizeres de rotulagem. Documentos com tais comprovações devem ser apresentados aos órgãos de vigilância sanitária, sempre que solicitados ou por ocasião das inspeções (BRASIL, 2005).

Os produtos de origem vegetal podem atuar de forma similar aos de origem sintética, possuindo também efeitos colaterais, sendo necessário reunir conhecimentos popular e científico para garantir a sua segurança e eficácia (WARGOVICH *et al.*, 2001).

O potencial irritante de várias substâncias e produtos de uso humano vem sendo avaliado, em experimentos que utilizam animais de laboratório, desde a década de 40. Alguns

dos ensaios adotados para tal finalidade, denominados testes de irritação ocular ou cutânea, ainda hoje adotados pelos órgãos oficiais, foram inicialmente descritos por Draize e colaboradores, em 1944.

Apesar de toda a preocupação por parte dos órgãos fiscalizadores, alguns autores apresentam relatos de formulações de produtos cosméticos que resultam com frequência em processos irritativos e dermatites de contato, principalmente na área dos olhos. Discutem, ainda, que atributos apresentados na rotulagem de alguns produtos, designados por expressões como hipoalergênico, dermatologicamente testado, não irritante, muitas vezes não são comprovados (DRAELOS, 1999).

Métodos alternativos vem sendo investigados para tentar minimizar conflitos relacionados a procedimentos que afetam a segurança dos animais gerando críticas e discussões por parte de entidades não governamentais. Tendo em vista que as formulações dos produtos podem sofrer alterações ou adaptações para atender a diferentes necessidades da população de variadas regiões mundiais; a introdução, padronização e validação de ensaios alternativos são necessárias.

Assim sendo, é perfeitamente justificada a preocupação de estudar modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* que possam avaliar quantitativa e qualitativamente os efeitos dos produtos sobre a pele ou na região dos olhos, no sentido de se obter formulações eficazes e seguras. Além de fornecer subsídios que facilitem o controle de produtos disponíveis no mercado, essas iniciativas estarão colaborando com as ações de Saúde Pública.

Uma vez que, de acordo com levantamento bibliográfico e baseado na cultura popular, *Spondias dulcis* é um fruta comestível e detentora de aromas, pode ser usada em preparações fitocosméticas, em função de sua composição química variada e dos resultados preliminares de nosso grupo de pesquisa, mostrando que os extratos desta planta são ativos em modelos experimentais *in vitro*.

E uma vez que não há relatos na literatura que atestam a segurança de extratos obtidos de polpas dos frutos de cajá-manga, a proposta deste trabalho foi: preparar fitocosmético contendo extrato de cajá manga (*Spondias dulcis* PARKINSON) eficaz e seguro, para o quê, inicialmente, foram estabelecidos critérios para obter droga vegetal estabilizada para submissão a diferentes métodos de obtenção de extratos para avaliar e comparar suas atividades antioxidantes *in vitro*, buscando correlação com a avaliação do teor de fenólicos e avaliar a segurança dos extratos nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Analisar e identificar, através

de diferentes técnicas espectrofotométricas e cromatográficas, substâncias ativas visando padronizar o extrato a ser empregado na preparação do fitocosméticoe, finalmente, avaliara atividade cosmética planejando o desenvolvimento de preparação cosmética contendo concentração eficaz e segura dos ativos obtidos da polpa do fruto do cajá-manga.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Obtenção e padronização de extratos de polpa de frutos de *Spondia dulcis* Parkinson (“cajá- manga”) (Anacardiaceae) assim como a determinação de sua atividade antioxidante e segurança para desenvolvimento de fitocosmético eficaz e seguro.

1.2.2 Objetivos específicos

- Obter extratos, hidroalcoólicos e alcoólicos a partir da polpa dos frutos de *Spondias dulcis*;
- Realizar triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos presentes nos extratos obtidos;
- Determinar o perfil cromatográfico dos extratos obtidos por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) dos extratos obtidos;
- Avaliar o teor de compostos fenólicos e de flavonóides nos extratos obtidos;
- Avaliar a ação antioxidante dos extratos obtidos pelos ensaios DPPH[•] e ABTS;
- Avaliar a toxicidade dos extratos *in vitro* através de ensaios de citotoxicidade e *in vivo* através de teste de genotoxicidade;
- Padronizar o extrato para incorporação em formulação cosmética;
- Avaliar a estabilidade da preparação cosmética;
- Determinar a atividade cosmética: avaliar a ação antioxidante e fotoprotetora da formulação.

1.3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.3.1 Família *Anacardiaceae*

A família *Anacardiaceae* é representada por cerca de 80 gêneros e 600 espécies que possuem como característica marcante, a presença de substâncias terpenóides e polissacarídeos, tanto no corpo primário como no floema secundário, conhecida por produzirem frutos saborosos, excelente madeira usada para produção de canoas nas Ilhas da Sociedade da Oceania (Micronésia, Melanésia, Polinésia, Hawai e Polinésia Francesa) e compostos processados na indústria alimentícia e na medicina do Camboja, sendo a ação adstringente da casca utilizada em associação com diversas espécies vegetais como um antidiarreico (ENGLER, 1896; VENNING, 1948; METCALFE; CHALK, 1950; FAHN, 1979; CARMELLO *et al.*, 1995; MACHADO; CARMELLO-GUERREIRO, 2001; BARROSO *et al.*, 2002).

O gênero *Spondias*, segundo a literatura, tem a seguinte posição taxonômica: Domínio – Eukarya; Reino – Plantae; Filo – Anthophyta; Divisão – Spermatophyta; Subdivisão – Angiospermae; Classe – Eudicotyledoneae; Subclasse – Archichlamidae; Ordem – Sapindales; Família – *Anacardiaceae*; Tribo – *Spondiadeae*, e Gênero – *Spondias* L. (SHAW e FORMAN, 1967; RAVEN *et al.*, 2001; JOLY, 2002).

O gênero *Spondias* foi inicialmente nominado à criação da nomenclatura binomial e do sistema de classificação científica concebido pelo médico, botânico e zoólogo sueco Carl Linnaeus, em seu tratado botânico *Genera Plantarum*, de 1753, compreendendo as bem conhecidas “ameixas dos trópicos ou maçãs douradas”, época em que era conhecida apenas uma espécie do gênero, a cajazeira (*Spondias mombin* L. sin. *Spondias lutea* L.) (SHAW e FORMAN, 1967).

Posteriormente, colaboradores de Linnaeus procuraram aperfeiçoar a descrição das diferentes espécies do gênero, resultado que culminou na catalogação e denominação de outras espécies dentre as quais a *Spondias dulcis* Forst (GOMES, 2007; SEREJO *et al.*, 2009) sin. *Spondias cytherea* Sonn., popularmente conhecida como cajarana ou cajá-manga (EMBRAPA, 2006). Atualmente, a família *Anacardiaceae* agrupa diversas espécies frutíferas importantes, como as *Spondias* (cajá-manga - *S. dulcis* Parkinson, cajá - *S. mombin* L., umbu -

S. tuberosa Arruda, umbu-cajá - *Spondias* spp., seriguela *S. purpurea* L.), o cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), a mangueira (*Mangifera indica* L.) e o pistache (*Pistacia vera* L.), que são exploradas economicamente em várias áreas tropicais e subtropicais do mundo, em variadas épocas do ano e de acordo com sua sazonalidade, valorizadas graças a seus saborosos frutos consumidos *in natura* ou produtos derivados e processados, como sucos, geléias, sorvetes e picolés; entretanto, pouco exploradas cientificamente e, ainda, as aroeiras (*Astronium fraxinifolium* Schoot. e *Schinus terebentifolius* Raddi.), conhecidas como árvores produtoras de madeira de excelente qualidade.

1.3.2 Cajá-manga ou cajarana - *S. dulcis* Parkinson sin. *Spondias cytherea* Sonn.

Um membro da família Anacardiaceae desvalorizado, mas que merece uma maior apreciação é o cajá-manga, *Spondias dulcis* Parkinson (syn. *S. cytherea* Sonn.). Entre os muitos nomes comuns que recebe em diferentes partes do mundo como *apple* e *quince Tahitian* no Taiti, enquanto nas demais Ilhas da Polinésia, onde é nativa é conhecida como *plum* e *golden apple*. Na Malásia e Indonésia, ele é denominado popularmente *kedondong*; na Tailândia como *ma kok farang*; no Camboja, *mokak*; no Laos como *kook hvaan*; no Vietnã e Trinidad e Tobago, *pomme de Cythere*, assim como em, St. Lucia e Dominica conhecida como *prune Cythere* nas Antilhas Francesas, na Jamaica e Granada como *june plum*; em Cuba, como *ciruela Dulce*. Na Costa Rica, é conhecido como *juplon*; na Colômbia como *hobo de racimos*, Venezuela, *jobo da Índia* ou *mango jobo*, *manzana de oro* no Equador, cajá-manga ou cajarana no Brasil; *ambarella*, na Flórida e na França; *jobo da Índia*; nas Filipinas, *heri*; na Birmania, *gway* (JANICK; PAULL, 2008).

Como descrito por Gomes (2007) o cajá-manga ou cajarana é uma *Anacardiaceae*, também chamada taperebá-do-sertão no Brasil, originária das Ilhas da Sociedade no Pacífico Sul, Oceania, especificamente da Melanésia e Polinésia (Figura 1.1) e através dos trópicos tem sido introduzido em áreas, tanto do Antigo quanto do Novo Mundo. É comum nos jardins da Malásia e bastante frequente na Índia, no Ceilão e no Vietnã, onde os frutos são vendidos em mercados. Foi introduzido na Jamaica em 1782 e, mais tarde, no Havaí, onde tem sido cultivado por muitos anos. É cultivado em Cuba, Haiti, República Dominicana, Porto Rico e

Trinidad e também na América Central, Venezuela e Suriname. No Brasil e em outras partes da América tropical é ainda obtida por extrativismo (JANICK; PAULL, 2008).



Figura 1.1. Distribuição geográfica da *S. dulcis* nas Ilhas da Sociedade no Pacífico Sul, Oceania. Retirado de: <http://oki-park.jp/kaiyo/en/guide/index.html> (acesso em: 23/11/2010)

A árvore (Figura 1.2) cresce atingindo rapidamente altura de 18 m na Melanésia e Polinésia, os frutos chegam a pesar 450 g; e não mais de 9-12 m em outras áreas. Sua madeira é bastante rígida e seu caule verticalizado simetricamente, possuindo características ornamentais imponentes, com folhas decíduas, pinadas, 8-24 cm de comprimento, composta de 9-25 folíolos brilhantes. A porção terminal dos galhos é elíptica ou obovado-oblonga de 10-25 cm de comprimento, finamente denteadas em direção ao ápice. No início do verão, o clima seco e fresco faz com que as folhas amarelo brilhante caiam das árvores que permanecem poucas semanas nuas. Os frutos aparecem e formam regime de cachos com uma dúzia ou mais; oval ou um pouco irregulares com algumas protuberâncias e 6-9 cm de comprimento, casca fina e firme. Os frutos são do tipo climatério e, quando verdes e duros, os frutos podem cair no chão e à medida que amadurecem, as cascas tornam-se amarelo-ouro. A polpa é succulenta, fibrosa e pouco ácida, de fragrância marcante e difícil de fatiar devido ao

caroço fibroso, firme e evidente, entranhado na polpa (FRANQUIN *et al.*, 2005; JANICK; PAULL, 2008).

Spondias dulcis é uma espécie tropical que vem recebendo atenção especial dos pesquisadores por secretar uma goma que possui ação antimicrobiana. Os estudos químicos sobre a composição do exsudato de *Spondias* permitiram o isolamento de fenólicos como os elagitaninos (BASU, 1980; BASU; RAO, 1981; MARTÍNEZ *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ *et al.*, 2005).

Frutífera perene, dispersa nas regiões tropicais da América, da África e da Ásia. No Brasil, o conhecimento da extensão e distribuição geográfica deste gênero tem variado muito, sendo encontrada principalmente nas regiões de cerrado e disseminada por vários estados do país. Árvore de rápido crescimento, com ramos grossos e quebradiços, folhas compostas de 11 a 13 folíolos e flores dispostas em grandes panículas terminais. Os frutos cosmetíveis ao natural se apresentam em cachos como drupas elipsóides ou ligeiramente obovóides, amarelas, de pele fina, de tamanho pouco maior que um limão (detalhe na Figura 1.2).



Figura 1.2. Árvore de *S. dulcis* (cajá-manga), no detalhe, frutos em regime de cachos.
Fonte: <http://novaescoladevargemgrande.spaceblog.com.br/56374> (acesso em: 10/12/2010)

A Figura 1.3 demonstra a estrutura do cajá-manga verde madura; a polpa é compacta, quando madura torna-se amarelo pálido, sumarenta, acídula e doce, que cobre uma semente eriçada de compridos feixes lenhosos, entranhados profundamente na massa da polpa.

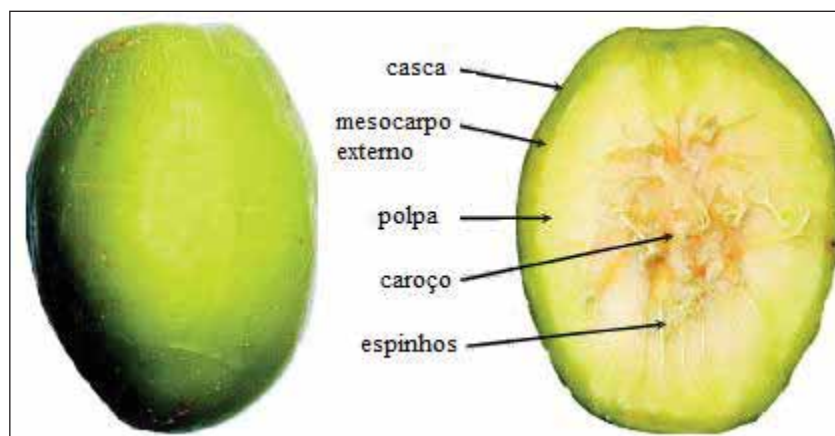


Figura 1.3. Estrutura da cajá-manga verde-madura.

Fonte: FRANQUIN *et al.*, 2005.

No início da estação chuvosa plantam-se mudas obtidas por sementes, mas sua propagação ocorre principalmente por mergulhia ou estacas, quando suas folhas caem e possuem grande reserva de nutrientes. É cultivada com compasso de 8 por 8 metros, de preferência em solos profundos, sílico argilosos, em climas quentes e úmidos, semiáridos (FRANQUIN *et al.*, 2005).

No Brasil, os frutos de *Spondias*, em especial da cajarana, graças a seu característico *flavour*, é matéria-prima de produtos cuja demanda é crescente. Explorada extrativamente ou em pomares domésticos, não faz parte das estatísticas oficiais, mas, mesmo assim, tem grande importância socioeconômica para as regiões Central, Norte e Nordeste do Brasil. Seus frutos são consumidos na forma *in natura* ou processados, obtendo grande número de produtos saborosos, de excelente qualidade e alto valor comercial, o que torna viável a exploração.

A *Spondias mombim*, popular cajá possui grande semelhança e características a *S. dulcis*, outra importante espécie da família Anacardiaceae, foi estudada por Sacramento e colaboradores (2007) que descreve o tamanho do fruto variando de 9,3 e 21,9 g sendo que de 8,4 a 18, 7% referem-se à casca, 15,7 a 31,1% ao endocarpo e de 56,0 a 73,3% de polpa. O pH ácido de 2,4 a 3,0 apresentado é devido à concentração de ácido ascórbico (28,2 a 54,7 mg/100g) entre outros compostos de mesma característica. Leon e Shaw (1990) através de investigação de constituintes nutricionais nos frutos descreve ser este fruto de alto valor

energético e vitamínico, devido à presença principalmente de elevada concentração de vitamina C (ácido ascórbico), enquanto Barbosa e colaboradores(1981), descrevem valores menores que Sacramento (2007) e semelhantes a Leon e Shaw (1990) desta vitamina. A Tabela 1.1 apresenta características físicas e químicas do cajá, analisadas pelos autores.

Tabela1.1. Características físicas e químicas do cajá (*Spondia lutea*),de acordo com vários autores

Caracteres	Sacramento et al. (2007)	Barbosa et al. (1981)	Leon e Shaw (1990)
Fruto (g)	9,3 a 21,9	10,0	—
Casca (g)	0,9 a 2,9		—
Casca (%)	8,4 a 18,7	15,0	—
Endocarpo (g)	2,0 a 4,4		—
Endocarpo (%)	15,7 a 31,1	46,0	—
Polpa (g)	6,0 a 14,6		—
Polpa (%)	56,0 a 73,3	36,0	—
Valor energético (cal/100 g)	—	—	21,8 a 70,0
Carboidratos (g/100g)	—	—	8,7 a 13,8
Proteínas (g/100g)	—	—	0,8 a 1,4
Lipídios (g/100g)	—	—	0,1 a 2,1
Fibras (g/100g)	—	1,1	1,0 a 1,2
Cinzas (g/100g)	—	—	0,6 a 0,7
pH potenciômetro	2,4 a 3,0	2,1	2,1
Sólidos solúveis em brix a 20°C (100g)	11,4 a 15,0	10,2	—
Ácido total (ácido cítrico) g/100g)	0,9 a 1,6	1,65	1,65
Açúcares redutores (g/100g)	6,1 a 10,8	6,7	6,7 a 9,4
Cálcio (mg/100g)	—	—	26,0 a 31,4
Fósforo (mg/100g)	—	40,0	31,0 a 40,0
Ferro (mg/100g)	—	—	2,2 a 2,8
Ácido ascórbico (mg/100g)	28,2 a 54,7	11,0	11,0 a 16,6
Vitamina A (µg/100g)	—	—	70,0 a 71,0
Tiamina (mg/100g)	—	—	0,08 a 0,09
Riboflavina (mg/100g)	—	—	0,05 a 0,06
Niacina (mg/100g)	—	—	0,05

Fonte: Sacramento et al. (2007) e Leon; Shaw (1990)

O cajá-manga, assim como outras espécies de *Spondias* de grande semelhança como o cajá, é relatado por Gouadoe e colaboradores (2007), como uma boa fonte de próvitamina A e de carotenóides, fornecendo valor de vitamina A de 1,95 µg/100 g; de próvitamina A de 30,15 µg/100 g e de zeaxantina de 5,11 µg/100 g na fração apolar de extratos; enquanto foi observado quantidades para β-caroteno de 6,54 µg/100 g e de 23,61 µg/100 g de criptoxantina para um total de carotenóides de 35,27 µg/100 g na fração aquosa, confirmando estudos realizados por Rodriguez-Amaya e Kimura (1989) quando analisaram a composição do mesmo fruto.

Os frutos, por serem perecíveis e deteriorarem em poucos dias, têm comercialização *in natura* dificultada a grandes distâncias, além disso, pode ser estimado que perdas de frutos pós-colheita variem de 15 a 50% dependendo como são conservados ou transportados (CHITARRA e CHITARRA, 2005). Amer e Rubiolo (1998), relatam que o congelamento rápido de um alimento preserva sua qualidade, uma vez que seu uso leva à retenção de maior quantidade dos aromas voláteis que são perdidos durante o congelamento lento, além de ter menor fração de produto não congelado.

1.3.3 Metabólitos secundários – compostos fenólicos

Os metabólitos secundários, no passado, eram vistos como produtos de desperdício resultantes de desvios do metabolismo primário. Atualmente, já está claro que os metabólitos secundários são componentes-chaves em muitos mecanismos ecológicos vegetais. Sua produção é associada à defesa da planta contra ataque de patógenos, radiação solar e herbivoria (MONTANARI Jr., 2002; GOBBO-NETO; LOPES, 2007), atuando na competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de sementes e micro-organismos simbiotes (PERES, 2011) ou, ainda, situação adaptativa a condições ambientais estressantes ou condicionantes.

Metabólitos secundários são substâncias produzidas de diferentes vias metabólicas nos vegetais resultantes de mecanismos interrelacionados de processos químicos fisiológicos das plantas e condições adaptativas (evolutivas e ecológicas) a que são submetidos. Podem ser compostos finais ou intermediários do metabolismo primário da fotossíntese, ocorrendo em diferentes proporções numa mesma espécie e em plantas diferentes de acordo com variações

sazonais dentre outros fatores capazes de exercer diferença nos níveis de metabólitos produzidos. De uma forma globalizada são descritos aproximadamente 10⁵ metabólitos naturais ativos, mesmo não sendo todos essenciais ao desenvolvimento das plantas e de alguns não possuírem ainda função fisiológica elucidada completamente. De modo adicional, é sabido que os metabólitos secundários podem coordenar ou alterar ou serem indispensáveis à sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, de forma evolutiva e adaptativa (MONTANARI Jr., 2002; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A produção e acúmulo de metabólitos secundários pelas plantas pode ser afetada por variações importantes principalmente de fatores relacionados à sazonalidade. Outro fator de igual importância é a influência do estresse ambiental ou outros fatores capazes de resultar em variações no crescimento e desenvolvimento do vegetal. A limitação na quantidade de água, por exemplo, pode ser uma restrição ambiental importante para a produtividade de metabólitos secundários em plantas em determinados habitats. Deficiências de umidade não apenas podem limitar o crescimento e a sobrevivência das plantas, mas também induzir várias respostas metabólicas e fisiológicas, tais como fechamento dos estômatos, declínio na taxa de crescimento, acúmulo de solutos e antioxidantes e na expressão de genes específicos do estresse (BURT, 2004; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Experimentos conduzidos por Lopes e colaboradores (2007) mostraram que variações na quantidade de luminosidade (exposição controlada à radiação solar) e condições de cultivo (uso de adubação orgânica) a que foram submetidas espécies vegetais do gênero *Mikania* resultaram em diferenças significativas de concentrações de compostos secundários polares produzidos, com acúmulo de até 20 vezes maior do metabólito ácido 3,5-cafeoilquínico (grupo do ACGs), mas, entretanto, não encontraram diferenças significativas quanto ao aumento destes ou outros metabólitos quando os vegetais foram submetidos a estresse hídrico. (CAROLLO, 2008). Gray e colaboradores (2003) ao contrário, descrevem aumento significativamente importante da concentração de metabólitos secundários fenólicos como flavonoídes e ácido clorogênico em flores de *Hypericum perforatum* quando cultivadas sob influência de baixos índices pluviométricos (GRAY *et al.* 2003).

Na realidade, quase todos os extratos obtidos de vegetais são extremamente complexos em sua composição, em função da presença de uma grande variedade de compostos, pertencentes a diferentes classes químicas. A complexidade química dos vários grupos de metabólitos secundários que podem estar presentes nos vegetais dificulta a análise dos seus componentes bioativos, sendo o constituinte majoritário nestes complexos o responsável pela

bioatividade, na maioria das vezes, mas, que pode também, ser atribuída à ação sinérgica ou antagonica de vários componentes presente em um extrato vegetal (BURT, 2004).

Os compostos fenólicos, representam um dos grupos de maior abundância e de variados constituintes que podem estar presentes em materiais vegetais. Apresentam como principais representantes os polifenóis das classes dos taninos e dos flavonóides, de estruturas diversas de metabólitos secundários que inclui os metabólitos originados de diferentes vias metabólicas de síntese. Os taninos hidrolizáveis são biossintetizados a partir da via metabólica do acetato e os flavonóides e os taninos condensados a partir da via dos fenilpropanóides de origem mista a partir da condensação de unidades acetato e chiquimato (HARBORNE, 2000; SIMÕES, 2004).

Polifenóis, como são também conhecidos os taninos, são substâncias fenólicas solúveis em água com massa molecular em torno de 500 e 3000 Dalton. Apresentam habilidade de formar complexos insolúveis em água com alcalóides, gelatina e outras proteínas (SANTOS; MELLO, 2000). Os taninos vegetais constituem cerca de 40% das cascas e do caule e compõem uma significativa porção do carbono em ecossistemas florestais (KRAUSE *et al.*, 2003). A composição química do material vegetal é diretamente correlacionada com sua composição e é definida como a quantidade de nutrientes, carboidratos e compostos fenólicos presentes no material vegetal (RICHARDSON *et al.*, 2002).

Compostos polifenólicos constituem uma classe de substâncias de elevada importância na dieta humana e que é atribuída à grande habilidade antioxidante frente a sistemas radiculares prevenindo a formação excessiva de espécies reativas de oxigênio, por impedirem a conversão de hidroperóxido em oxirradicais bastante reativos, capazes de causarem grandes danos e prejuízos à saúde (DIMITRIOS *et al.*, 2006).

Os compostos fenólicos, como parte dos demais metabólitos secundários, têm regulada sua disponibilidade por estarem envolvidos nos processos de defesa contra micro-organismos patógenos e animais. Funcionam, ainda como mecanismo de retenção de nutrientes, particularmente em solos pobres, atuando como protetores contra radiação UV e como atrativos a polinizadores (LEVIN, 1971; CHANDLER, 1982; NORTHUP *et al.*, 1995).

A quantificação de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de métodos; todavia, o que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) é o mais extensivamente empregado (ABDILLE *et al.*, 2005).

A interação planta-solo apresenta possíveis relações positivas resultantes da produção de compostos fenólicos. O cerrado brasileiro, um dos ecossistemas de adaptação da cajarana, apresentando solos ácidos e distróficos com baixa concentração de nutrientes, constitui um bioma de grande expressão do gênero; entretanto, ainda são escassos estudos que enfocam a quantificação destes compostos nas folhas, cascas e frutos da espécie de *Spondias dulcis*.

1.3.4 Radical livre, envelhecimento, fotoenvelhecimento, fotocarcinogênese

O envelhecimento cutâneo cronológico pode ser influenciado intrinsecamente por desequilíbrios no sistema redox da pele, desencadeando alterações sistêmicas dos fatores relacionados ao envelhecimento. A exposição à radiação solar é um fator extrínseco dentre muitos outros que, por seus efeitos cumulativos, pode, além do envelhecimento, resultar em consequências mais expressivas, como o câncer de pele (ICHILHASHI *et al.*, 2003).

Os estudos para avaliar respostas cutâneas à incidência da radiação UV devem seguir parâmetros relacionados ao comprimento de onda desta radiação, a dose de exposição e características intrínsecas, como, por exemplo, susceptibilidade genética e pigmentação da pele (SCHARFFETTER-KOCHANKE *et al.*, 2000).

O sítio de formação dos radicais livres está diretamente relacionado ao seu alvo celular podendo ocorrer na membrana, nas mitocôndrias e/ou no citoplasma tendo, como principais mecanismos biológicos responsáveis, a peroxidação lipídica, o dano oxidativo do DNA e ou a oxidação protéica (BLOIS, 1958; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Uma espécie radicalar pode ser gerada em um átomo ou molécula quando um ou mais elétrons estão sozinhos num orbital, ou seja, de forma “desemparelhada” (PÓVOA, 1995; YOUNGSON, 1995; HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000).

Os radicais livres são moléculas instáveis, capazes de existir em função de fatores intrínsecos a partir da energia recebida, por exemplo, por um átomo extremamente reativo como o oxigênio, que de alguma forma perdeu um elétron de sua camada mais externa (LORAY, 1999; SAMPAIO E RIVITTI, 2001; BUCHLI, 2002).

Essas moléculas instáveis também podem ser formadas a partir de diversos fatores extrínsecos, capazes de gerar danos às membranas celulares ocasionando a morte ou mau funcionamento, provocando efeitos negativos sobre a pele, processo denominado

fotoenvelhecimento, quando relacionado à exposição excessiva e ou inapropriada à radiação solar, causando danos às células superficiais e profundas da epiderme, degradando os fibroblastos da derme e podendo, inclusive, lesar a cadeia de DNA, proteínas, carboidratos, lipídios, causando até mesmo câncer nos casos mais graves. Fatores como o consumo excessivo e descontrolado de bebidas alcoólicas e de tabaco e o estresse podem, também, acelerar o processo do envelhecimento (QUIROGA E GUILLOT, 1987; PÓVOA, 1995; BUCHLI, 2002).

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos. Contudo, na condição de pró-oxidante, a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes (CERUTTI, 1991; CERUTTI 1994). O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais livres tem sido chamado de estresse oxidativo (SIES *et al.*, 1993; BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A exposição de um indivíduo à radiação pode gerar o radical hidroxila. Se estes radicais atacarem o DNA, ocorrem danos e mutações no material genético ou, até mesmo, o rompimento dos filamentos de DNA desempenhando processos de mutagênese e carcinogênese (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2007; BUCHLI, 2002).

As principais formas reativas de oxigênio incluem o radical superóxido ($O_2\cdot$) e o radical hidroxila ($OH\cdot$), considerados os mais perigosos nos danos ao organismo. O ânion superóxido apresenta baixa capacidade de oxidação, enquanto o radical hidroxila é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares, porém de pequena capacidade de difusão; outros podem ainda ser citados como óxido nítrico ($NO\cdot$), o peroxinitrito ($ONOO\cdot$) e o radical semiquinona ($Q\cdot$) (BIANCHI e ANTUNES, 1999; HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2007; PÓVOA, 1995). O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

O dano provocado pelos radicais livres apresenta uma reação radicalar, e os ataques dos radicais livres sobre o tecido são conhecidos como estresse oxidativo (YOUNGSON, 1995).

Estresse oxidativo é comumente definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos

sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

A ocorrência de um estresse oxidativo moderado frequentemente é acompanhado do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celular (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Segundo HALLIWELL e GUTTERIDGE (2007), o estresse oxidativo pode resultar de: diminuição de antioxidantes; deficiência de antioxidantes na dieta alimentar ou dietas ricas em componentes que possam aumentar o estresse oxidativo; produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) pela exposição elevada à O₂; presença de toxinas que são metabolizadas e produzem ERO/ERN ou ativação excessiva de sistemas naturais de ERO/ERN (exemplo: ativação inapropriada de células de fagocitose em doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide e colites ulcerativas).

O envelhecimento constitui o conjunto de modificações fisiológicas irreversíveis e inevitáveis acompanhadas de uma mudança do nível de homeostasia, sendo um processo dinâmico observado na epiderme como um reflexo das modificações que ocorrem também no tecido conjuntivo da derme. O envelhecimento da pele participa das alterações involutivas que ocorrem em diversos setores do organismo, podendo ser considerado que o envelhecimento possui dois tipos. O envelhecimento intrínseco decorrente do desgaste natural do organismo, causado pelo passar dos anos, esperado, previsível, inevitável, progressivo, sem a interferência de agentes externos e equivale ao envelhecimento de todos os órgãos, inclusive a pele. O envelhecimento extrínseco pode ocorrer através do tabagismo, fatores físicos, nutricionais e mecânicos (DRAELOS, 1999).

O fotoenvelhecimento provoca alterações aparentes (físicas) e funcionais na pele, o que ocorre mais pelo resultado de uma exposição solar repetitiva do que pelo simples passar do tempo. A exposição solar excessiva pode causar diversos danos ao organismo, como o fotoenvelhecimento precoce e o aparecimento de fotocarcinogênese. Durante toda a vida e principalmente na infância e na adolescência, as exposições repetidas ao sol exercem efeito sobre a pele de forma cumulativa (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Os radicais livres também estão envolvidos nesse processo de envelhecimento por serem capazes de provocar dano celular, que seria acumulado durante a vida, resultando em aceleração de disfunções (MONTAGNER e COSTA, 2009).

A exposição à radiação ultravioleta proveniente do sol é considerada a principal causa de câncer de pele tipo melanoma e não-melanoma, o qual provoca grandes deformações, mas

não leva à morte, se tratado. Atinge principalmente pessoas com pele, cabelo e olhos claros. Manifesta-se lentamente em áreas expostas ao sol como face, braços, colo e mãos e, freqüentemente, é indolor. Aparece como nódulos e feridas que não cicatrizam (OKIDA *et al.*, 2001, SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

1.3.5 Espectro de radiação ultravioleta e seus efeitos

O espectro de radiação é comumente classificado de acordo com seu comprimento de onda (λ). A radiação ultravioleta é a parte do espectro solar eletromagnético entre 4 e 400 nm. Os raios ultravioleta são divididos em radiação ultravioleta C (200-290 nm), radiação ultravioleta B (290-320 nm) e radiação ultravioleta A (320-400 nm) que, ainda, pode ser subdividida em curta ou UVA-I (320-340 nm) e longa ou UVA-II (340-400 nm). A radiação solar abaixo de 290 nm praticamente não atinge a superfície terrestre, sendo absorvida pela camada estratosférica de ozônio, daí a importância da manutenção da camada (RIBEIRO, 2006).

A radiação solar incide sobre a pele, causando aumento do risco de câncer cutâneo, fotoenvelhecimento e exacerbação de dermatoses fotossensíveis (STOKES, 2000).

As radiações UVA e UVB são responsáveis pela diminuição de sistemas antioxidantes cutâneos, bem como pela alteração do balanço redox celular por diferentes formas resultando em aumento de sistemas oxidantes e, conseqüentemente, altera a homeostasia cutânea (YASUI e SAKURAI, 2000). A primeira resposta observada na pele após exposição ao sol é a inflamação, caracterizada por eritema, edema e calor e pela elevação dos níveis de prostaglandinas e leucotrienos. Células especializadas, como neutrófilos, são recrutadas e estimuladas, seguido da ativação do sistema NAD(P)H oxidase, gerando uma série de espécies reativas (CLYDESDALE *et al.*, 2001).

A reação das espécies reativas então formadas, com componentes celulares, pode resultar em lipoperoxidação, oxidação de proteínas e de DNA (LINTON *et al.*, 2001). Os aldeídos formados pela lipoperoxidação podem ainda interagir com o DNA, formando aductos que têm sido associados com câncer (CHAUDHARY *et al.*, 1994).

Tendo em vista a prevenção ou terapias para o câncer de pele, um dos tipos de câncer de maior ocorrência, são muito discutidos mecanismos para o restabelecimento do equilíbrio

redox, sendo que o uso de antioxidantes nesses casos é uma alternativa, que tem sido amplamente utilizada.

1.3.6 Fotoprotetores

Inicialmente, os fotoprotetores foram desenvolvidos para proteger a pele contra queimaduras do sol, isto é, preferencialmente contra a radiação ultravioleta B, permitindo bronzeamento por meio de ultravioleta A. Um fotoprotetor eficiente deve prevenir não apenas a possível queimadura, mas também reduzir o acúmulo de todas as lesões induzidas pela radiação ultravioleta (FLOR *et al.*, 2007).

A pele apresenta mecanismo natural de fotoproteção, entretanto, produtos cosméticos fotoprotetores contendo substâncias artificiais, classificadas, como filtro solar físicos ou bloqueadores e químicos ou absorvedores (COELHO, 2005), assim como substâncias naturais como extratos vegetais fotoprotetores, podem ser utilizados para proteção da pele às radiações solares (OLIVEIRA *et al.*, 2004).

Os extratos vegetais contendo flavonóides são capazes de absorver a luz ultravioleta. O espectro de absorção de um flavonóide mostra, em geral, dois picos máximos de absorção, um entre a faixa 240-280 nm e outro na faixa de 300-550 nm, o que mostra a possibilidade de uso de extrato como filtros de radiação solar em preparações fotoprotetoras (SOUZA, 2004).

Entre as principais classes de substâncias com atividade fotoprotetora estão: o ácido para-aminobenzóico (PABA) e seus derivados; os derivados do ácido cinâmico; os derivados do benzilideno canforado; as benzofenonas e seus derivados que têm tendência a propriedades alergizantes (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

1.3.6.1 Determinação do Fator de Proteção Solar- FPS

O fator de proteção solar é a medida da capacidade de um filtro solar em proteger contra o eritema, formado principalmente pela exposição à radiação UVB, sendo, então, uma avaliação da medida de eficácia do filtro contra a radiação UVB (ROSEN, 2003). No Brasil, a

ANVISA considera os filtros solares como produtos cosméticos e enquadra os produtos para proteção solar como categoria 2, em relação ao grau de risco. A ANVISA define fator de proteção solar como sendo a razão entre a dose mínima eritematosa (DME) na pele protegida, dividida pela dose mínima eritematosa na pele não protegida. A DME é definida como a dose mínima de radiação ultravioleta requerida para produzir a primeira reação eritematosa perceptível com bordas claramente definidas, observadas entre 16 e 24 horas após a exposição à radiação ultravioleta (ANVISA, 2002).

A ANVISA não descreve um método para determinação do FPS, mas que deverá ser realizada pela aplicação estrita de uma das seguintes normas de testes *in vivo*: metodologia de determinação do fator de proteção solar indicada pelo FDA (Food and Drug Administration), de maio de 1993, ou a norma COLIPA (The European Cosmetics Association), de outubro de 1994.

1.3.6.2 Métodos *in vitro* de Determinação do FPS

Atualmente, métodos *in vitro* podem ser utilizados para avaliar o FPS durante o desenvolvimento de formulações e para o controle de qualidade de rotina, lote a lote (RIBEIRO *et al.*, 2004). Os principais empregam soluções diluídas dos produtos testados que são levadas para leitura por espectrofotometria no UV. Os métodos podem explorar a absorvância (MANSUR *et al.*, 1986) ou a refletância (DIFFEY, 1997) dos filtros solares.

O método desenvolvido por Mansur e colaboradores (MANSUR *et al.*, 1986) demonstrou ser eficaz e rápido, além de apresentar uma boa correlação com os resultados *in vivo*, já tendo sido utilizado em outros trabalhos (BARTH, 2000; SANTOS *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 1990). Mede-se a absorvância de uma solução obtida pela diluição da formulação em sistema solvente adequado em vários comprimentos de onda (290, 295, 300, 305, 310, 315 e 320nm) e aplica os resultados na fórmula apresentada a seguir:

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

(MANSUR *et al.*, 1986).

FC = fator de correção (igual a 10).

EE (λ) = efeito eritematogênico da radiação de comprimento de onda λ .

I (λ) = intensidade da luz solar no comprimento de onda λ .

Abs(λ) = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução da preparação no comprimento de onda (λ).

A relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação em cada comprimento de onda pode ser vista na Tabela 1.2, segundo SAYRE, 1979.

Tabela 1.2 Relação efeito eritematogênico (EE) versus Intensidade da radiação (I) conforme o comprimento de onda

λ (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Σ	1,000

SAYRE *et al.*, 1979

1.3.7 Papel das substâncias antioxidantes na saúde

Substâncias antioxidantes desempenham um papel importante na saúde, devido aos efeitos na modulação dos processos oxidativos que ocorrem no organismo. A formação de espécies reativas de oxigênio e subsequente oxidação de moléculas biológicas constituem um mecanismo de dano tecidual presente em vários processos fisiológicos como o envelhecimento cutâneo e patológicos como alguns tipos de câncer, inflamação, derrame, infarto do miocárdio, arteroesclerose, doença de Alzheimer e Parkinson (YOUNG e WOOSIDE, 2001).

Os antioxidantes têm sido extensivamente utilizados tanto no tratamento de patologias, como na prevenção do envelhecimento cutâneo e das conseqüências causadas pela radiação UV em curto e longo prazo, como o câncer de pele.

Antioxidante é qualquer substância heróica quando comparada ao substrato oxidável, prevenindo de maneira bastante eficaz a ação oxidativa dos radicais livres, atrasando ou inibindo, por exemplo, a peroxidação lipídica (PIETTA, 2000).

Podem ser sintéticos ou naturais e, para serem utilizados em diversos produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, demonstrar nível de eficácia e segurança. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados estão o hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e, entre os naturais, não enzimáticos, podem ser destacados o ácido ascórbico, a vitamina E e o β -caroteno (RICE-EVANS *et al.*, 1996). Compostos fenólicos são potentes antioxidantes obtidos de fontes naturais, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de metais (BARREIROS *et al.*, 2006).

Dentre os antioxidantes enzimáticos mais estudados, pode ser destacada a superóxido dismutase, considerada como a linha de frente de defesa antioxidante, embora possa exibir atividade peroxidásica na presença de excesso de H_2O_2 . Podem ser destacadas, também, a catalase e a glutathione peroxidase, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais $\cdot OH$ e $\cdot OR$, respectivamente (VASCONCELOS *et al.*, 2006).

Os antioxidantes podem ser encontrados naturalmente no organismo, agindo por diferentes mecanismos de defesa como complexação com íons metálicos, capturando radicais livres, decomposição de peróxidos, inibição de enzimas responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na modulação de vias sinalizadoras celulares

(VASCONCELOS *et al.*, 2006). São responsáveis pela proteção do organismo contra a ação oxidativa dos radicais livres (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; PÓVOA FILHO, 1995).

Nos vegetais, onde também são encontrados naturalmente, podem estar presentes altas concentrações de determinados grupos fitoquímicos, como os compostos fenólicos, muitos dos quais exibem melhores resultados quanto às propriedades antioxidantes e que, obtidos na dieta ou através de produtos utilizados diretamente no local alvo, podem estar relacionadas com o retardo do envelhecimento e com a prevenção de certas doenças (HARBORNE *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2002; ARABBI *et al.*, 2004).

1.3.8 Antioxidantes naturais

1.3.8.1 Vitaminas

A **vitamina C**, ou ácido ascórbico, apresenta grupos ionizáveis OH presentes no anel lactônico, como mostra a Figura 1.4, e provenientes das mais variadas plantas e alguns animais que o conseguem sintetizar a partir da glicose. Humanos entre outros animais precisam adquirir através da dieta, ou pela ingestão através de medicamentos (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000).

O ácido ascórbico quando administrado isoladamente também atua contra os danos induzidos pela radiação UV, capturando as espécies reativas geradas (F'GUYER *et al.*, 2003).

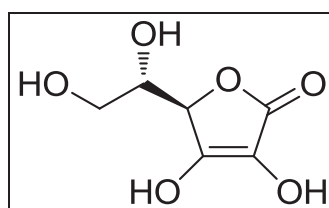


Figura 1.4 Estrutura do ácido ascórbico

A vitamina C é hidrossolúvel, rapidamente oxidada quando exposta ao ar e pelo calor, sensível ao pH, porém não afetada por ácido. É um dos antioxidantes protetores e agentes

redutores mais importantes para o organismo, reduzem a ação dos radicais livres, minimizando possíveis danos (KATCH e MCARDLE, 1996).

A **vitamina E**, ou α -tocoferol, é um antioxidante lipossolúvel de grande eficácia. Além de estabilizar as bicamadas lipídicas no estrato córneo, é um dos mais importantes inibidores da peroxidação lipídica em animais, por capturar $RO_2^{\cdot}$, protegendo as membranas celulares contra a lipoperoxidação. Assim, por ter sua eficácia comprovada, esta vitamina é muito utilizada na prevenção de doenças ou fotoenvelhecimento da pele, sendo veiculada tanto em suplementos orais, como em produtos de uso tópico (PÓVOA FILHO, 1995; BURTON *et al.* 1998; HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; BUCHLI, 2002).

Em estudos com voluntários foi verificado que o uso da vitamina E apresenta maiores efeitos benéficos quando administrada em conjunto com a vitamina C, pelo fato de ambas atuarem sinergicamente, sendo que a vitamina C pode reciclar o radical tocoferila (Figura 1.5) e a combinação dessas vitaminas pode aumentar efetivamente a atividade antioxidante total na pele (MIRELES-ROCHA *et al.*, 2002).

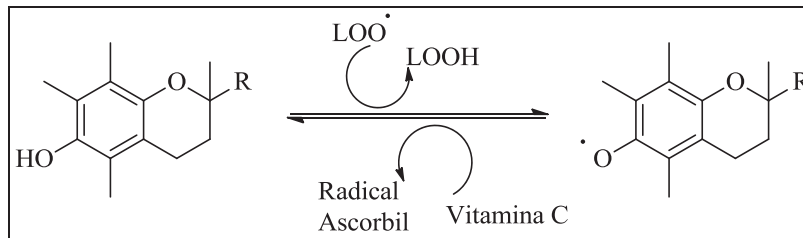


Figura 1.5. Reação do α -tocoferol (sendo R, a sua cadeia lateral) com radicais peróxila ($LOO^{\cdot}$), formando hidroperóxidos lipídicos ($LOOH$) e sua regeneração pela vitamina C, originando o radical ascorbila.

Os **carotenóides**, antioxidantes biológicos, são grupos de pigmentos coloridos comuns nos tecidos vegetais e em certas bactérias. São chamados também de pró-vitamina A por serem convertidos em vitamina A (retinol e outras formas) no fígado. São encontrados no leite integral, vegetais verdes, gema de ovo, frutas, entre outros. O retinol desempenha papel muito importante no nosso organismo, especialmente para a proteção da pele contra a radiação da luz solar e mudanças associadas à idade. Sua atividade frente ao estresse oxidativo causado pela radiação UV, tem sua habilidade protetora aumentada quando aplicados na pele

juntamente com vitaminas, atuando sinergicamente com as vitaminas C e E (HALLIWELL e GUITTERIDGE, 2000; BUCHLI, 2002; CESARINI *et al.*, 2003).

1.3.8.2 Flavonóides

Os flavonóides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e possuem funções como a proteção contra radiação ultravioleta e controle das reações oxidativas (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Sua estrutura consiste em dois anéis fenólicos A e B e um anel C como mostra a Figura 1.6, que pode ser um pirano heterocíclico (Figura 1.6A), como no caso de flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirona (Figura 1.6B), como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas, que possuem um grupo carbonila na posição C-4 do anel C, compreendendo as principais classes dos flavonóides como mostrado na Figura 1.6 (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

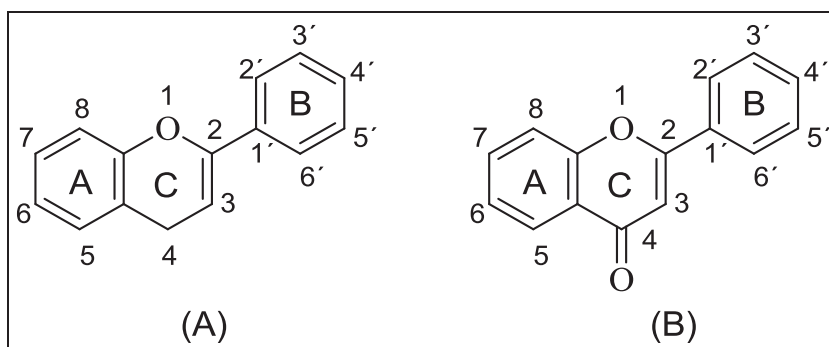


Figura 1.6. (A) Estrutura básica dos flavonóides e (B) Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila no C-4 (HUBER e RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

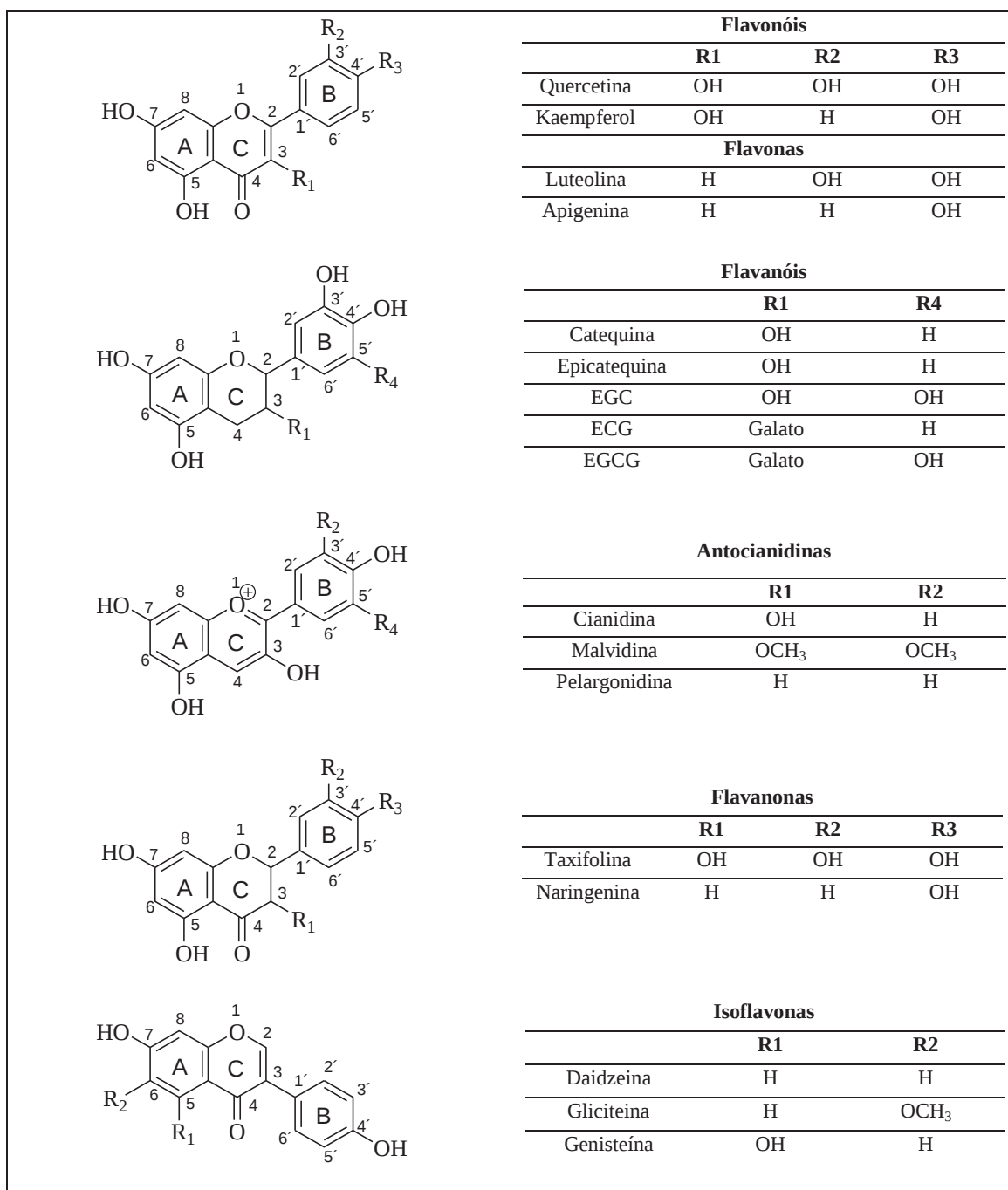


Figura 1.7 Principais classes dos flavonóides (HUBER E RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

Os flavonóides são encontrados em frutas, hortaliças, sementes, flores e seus produtos derivados, sendo importantes constituintes da dieta humana. As fontes alimentares são avaliadas principalmente em relação a três flavonóis (miricetina, quercetina e canferol) e duas flavonas (apigenina e luteolina) (CROZIER *et al.*, 1997), sendo estes os mais amplamente distribuídos nos alimentos e, portanto, os mais investigados em estudos sobre compostos ativos (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

O conteúdo de flavonóides é fortemente influenciado por fatores extrínsecos, como estação do ano, incidência de radiação ultravioleta, clima, composição do solo, preparo e processamento da matéria-prima vegetal (EWALD *et al.*, 1999; TRICHOPOULOU *et al.*, 2000).

Pode ser afirmado que as propriedades relacionadas à saúde humana exercidas pelos compostos fenólicos, com destaque aos flavonóides, são baseadas principalmente na sua atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres (PRIOR *et al.*, 2000) e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (SILVA *et al.*, 1998; TERAPO e PISKULA, 1999).

A capacidade antioxidante dos flavonóides pode ser aplicada, sobretudo, na neutralização das espécies reativas de oxigênio (ERO), além de desempenhar função preventiva na oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Deste modo, os flavonóides anulam os efeitos negativos destas lipoproteínas sobre as células (MARTINEZ-FLORES *et al.*, 2002).

Os flavonóides podem facilmente atuar como neutralizadores de radicais livres em meio aquoso devido à estrutura polifenólica hidroxilada. Podem também neutralizar ânions superóxidos produzidos por via química ou enzimática (YILMAZ e TOLEDO, 2004). Alguns flavonóides apresentam também a capacidade de eliminar os processos de peroxidação lipídica do ácido linoléico e dos fosfolipídeos das membranas, bem como a peroxidação dos glóbulos vermelhos (MARTINEZ-FLORES *et al.*, 2002).

Os flavonóides também exercem seus efeitos antioxidantes através de outros mecanismos (MUSCHIETTI e MARTINO, 2007). Primeiramente, podem agir como inibidores de enzimas responsáveis pela produção do ânion superóxido como a xantina-oxidase (HANASAKI *et al.*, 1994), a proteína quinase C (URSINI *et al.*, 1994), a ciclo-oxigenase, a lipo-oxigenase, a mono-oxigenase microssomal, a glutatona S-transferase, a succinato-oxidase mitocondrial e a NADH oxidase, todas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (KORKINA *et al.*, 1997).

Além disso, atuam como quelantes de metais divalentes, os quais desempenham um papel importante no metabolismo do oxigênio, como captadores (*scavengers*) de EROs e como participantes da regulação da atividade de enzimas antioxidantes (VAN ACKER *et al.*, 1996).

Van Acker e colaboradores (2000) demonstrou que certos flavonóides, como a fisetina, naringenina e o 7-monoidroxietilrutósídeo, poderiam atuar de forma similar ao antioxidante endógeno α -tocoferol (vitamina E), protegendo as membranas celulares do dano oxidativo.

Os flavonóides vêm despertando um grande interesse devido a estudos epidemiológicos que mostram que uma dieta rica nestes compostos está associada ao baixo risco de doenças cardiovasculares (KNEKT *et al.*, 1996; YOCHUM *et al.*, 1999) e algumas formas de câncer (KNEKT *et al.*, 1997; FRANKE *et al.*, 1998; NUUTILA *et al.*, 2002).

Flavonóides geralmente absorvem em comprimentos de onda na região de 280-315 nm, sendo capazes de agir como filtros de radiação ultravioleta nas plantas, exercendo proteção contra danos aos tecidos fotossintéticos. Desde os primeiros experimentos fisiológicos, já existiam algumas evidências de que os flavonóides estavam envolvidos na proteção ultravioleta. No entanto, apenas nas últimas décadas, uma série de experimentos em diferentes laboratórios no mundo inteiro (STAPLETON e WALBOT, 1994; BUCHHOLZ *et al.*, 1995; GITZ *et al.*, 1998; SCHNITZLER *et al.*, 1996) forneceram evidências convincentes de que plantas artificialmente sujeitas à radiação ultravioleta respondem por mudanças na síntese de flavonóides, possuindo uma relação direta com as propriedades de doar elétrons aos radicais livres, formando um derivado e desta forma neutralizando as EROs (STAPLETON e WALBOT, 1994; BUCHHOLZ *et al.*, 1995; BORS *et al.*, 1995; SCHNITZLER *et al.*, 1996; GITZ *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

As antocianinas são pigmentos fenólicos solúveis em água, pertencentes à classe dos flavonóides (BRAVO, 1998; ROBARDS *et al.*, 1999) e responsáveis pelas várias nuances entre laranja, vermelho e azul, exibidas pelas frutas, hortaliças, flores, folhas e raízes, onde essa pigmentação pode ser influenciada com a variação de pH (GIL *et al.*, 1997). Esses compostos são glicosídeos que, por hidrólise ácida, liberam agliconas também denominadas de antocianidinas (GUEDES, 2004). As antocianinas e suas respectivas agliconas são compostos bioativos e que, entre os vários outros efeitos fisiológicos, possuem capacidade antioxidante (KÄHKÖNEN e HEINONEN, 2003) e propriedade antiinflamatória (SEERAM *et al.*, 2001), promovem vasodilatação (BURNS *et al.*, 2000), atuam na prevenção da hiperglicemia (MATSUI *et al.*, 2002), estimulam a secreção de insulina (JAYAPRAKASAM *et al.*, 2005), melhoram a adaptação da visão noturna e previnem a fadiga visual (NAKAISHI *et al.*, 2000).

1.3.9 Metodologias e mecanismos empregados na determinação da capacidade antioxidante

Os estudos para a determinação da eficácia de antioxidantes podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*, utilizando animais ou seres humanos. Os estudos *in vitro* apresentam como vantagem a possibilidade de estudos mais expressivos; contudo, necessitam de extrapolação e, muitas vezes, não reproduzem o mesmo efeito *in vivo*. Os estudos *in vivo*, por sua vez, tem, como maior vantagem, a possibilidade de determinação da eficácia de uma substância diretamente em seu local de ação (SIMONSENet *al.*, 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidas técnicas analíticas de espectrofotometria UV, entretanto, devido à vida média dessas espécies ser muito baixa, da ordem de milésimo de segundos, não é possível realizar a medida de forma direta. O acoplamento do radical livre a um composto nitroso capaz de formar um aducto estável pode ser detectado por técnicas analíticas.

1.3.9.1 Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH•

Um dos métodos mais usados para verificar a capacidade antioxidante consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve em um comprimento de onda máximo de 517 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH• -H) como mostra a Figura 1.8, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorvância. A partir dos resultados obtidos, é possível determinar a atividade antioxidante da amostra proporcional à concentração utilizada no ensaio (quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (BRAND-WILLIAMSet *al.*, 1995; HUANG *et al.*, 2005).

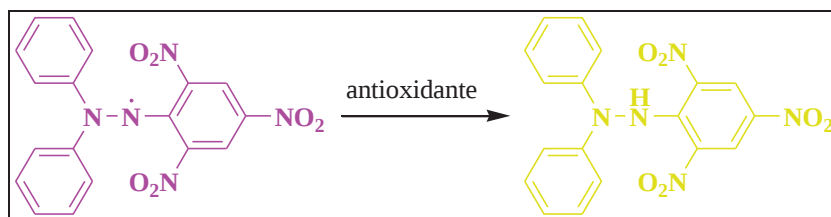


Figura 1.8 Estabilização do radical DPPH• por um antioxidante (RUFINO *et al.*, 2007).

O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O método é influenciado pelo solvente e pelo pH das reações. O método é considerado fácil e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

1.3.9.2 Capacidade antioxidante frente ao radical ABTS•

Outro método bastante utilizado para medir a atividade antioxidante é pela captura do radical ABTS•, que pode ser gerado por uma reação química, eletroquímica ou enzimática, formado a partir de seu precursor, o ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (Figura 1.9). Com essa metodologia, é possível medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

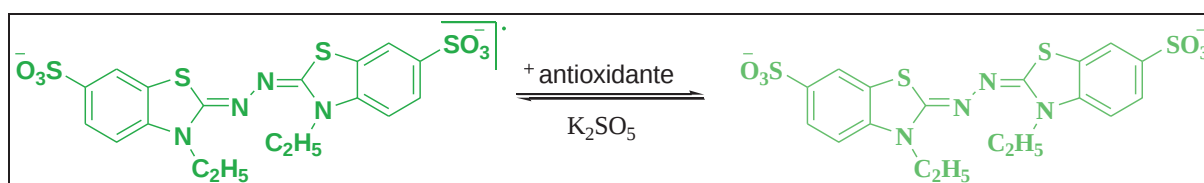


Figura 1.9. Estabilização do radical ABTS• por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

O radical ABTS• é um composto cromóforo quimicamente estável, com alta solubilidade em água e um máximo de absorvância em 414 nm (MILLER *et al.*, 1993). Pode ser utilizado tanto para amostras hidrossolúveis quanto lipossolúveis, o que lhe confere vantagem em relação a outros métodos. Tem sido utilizado em alimentos, como tomate e

molho de soja, vinhos e cervejas, além de amostras biológicas (SCALFI, *et al.*, 2000; MAZZA *et al.*, 2002).

Foram desenvolvidos novos métodos de geração do radical ABTS•, como a partir da oxidação do sal por persulfato de potássio, cuja reação ocorre na ausência de luz, durante 12 a 16 horas. A energia de ativação requerida é muito baixa e a reação começa imediatamente, mas não alcança um máximo de absorvância até o transcurso de 6 horas. O ABTS• reage estequiometricamente pela relação 1:0,05 com o persulfato de potássio (HENRIQUES *et al.*, 2002).

Uma vez gerado, o radical deve ser diluído em etanol até atingir uma absorvância de $0,7 \pm 0,02$ (RE *et al.*, 1999). A amostra a ser analisada é adicionada ao radical e mede-se a absorvância a 734 nm, a 30°C, durante 6 minutos. Este método tem sido muito aplicado a amostras biológicas (plasma), carotenóides e compostos fenólicos (ARTS *et al.*, 2001; PANNALA *et al.*, 2001).

1.3.10 Extração de antioxidantes naturais

Para a identificação e isolamento de compostos bioativos em fontes naturais (como frutas, sementes, folhas, raízes e caule) é necessária a realização de diferentes métodos de extração com solventes de polaridades diferentes. As pesquisas enfocam essas extrações com o objetivo de comparar seus resultados e encontrar a melhor alternativa para obtenção desses compostos de forma mais seletiva e eficiente.

Etapas preliminares que intencionem conservar os compostos bioativos como os antioxidantes (sensíveis à ação da luz, oxigênio e calor) devem ser realizadas para facilitar o processo de extração (AZIZA *et al.*, 1998; VEKIARI *et al.*, 1993).

O beneficiamento dos materiais vegetais normalmente desidratados, liofilizados ou congelados e, ainda, peneirados, moídos ou apenas rasurados antes do processo de extração, assume grande importância também. Assim, os substratos atingem maior superfície de contato com o solvente extrator, tornando inativos os efeitos deletérios de micro-organismos e de enzimas oxidantes. Tais enzimas, naturalmente presentes em vegetais, são responsáveis pela rancidez oxidativa enzimática e, quando inativadas, reduzem a capacidade de deterioração do material, conseqüente alteração dos ativos, das propriedades organolépticas e o produto torna-

se apropriado ao consumo e de fácil conservação (JUNTACHOTE e BERGHOFER, 2005; GÁMEZ-MEZA *et al.*, 1999).

Poucos são os processos extrativos onde os solventes podem ser dispensados. A extração com solventes orgânicos é frequentemente utilizada para o isolamento dos compostos bioativos. Dependendo do tipo de solvente ou sistema utilizado no processo, o rendimento da extração e a determinação da atividade dos extratos estarão sujeitas às diferenças nos potenciais de atividade e polaridade dos compostos (SIMÕES, 2004).

Dependo da finalidade, os solventes envolvidos nos processos devem seguir determinados critérios requisitados para o futuro comercial do produto. Cosméticos utilizam apenas solventes como álcool etílico, propilenoglicol, água, misturas hidroalcoólicas (JULKUNEM-TIITO, 1985; MARINOVA e YANISHLIEVA, 1997).

Não existe sistema de extração com solventes que seja satisfatória para o isolamento de todos ou de classe específica de substâncias naturais, devido a diversos fatores. A natureza química desses compostos nas plantas varia do pouco ao altamente polar; há grande variedade de compostos bioativos nos vegetais (como os ácidos fenólicos, antocianinas e taninos) e diferentes quantidades presentes, além da possibilidade de interação dos compostos antioxidantes com carboidratos ou proteínas. Alguns desses complexos, assim como alguns fenólicos com alto peso molecular, são altamente insolúveis em água. Entretanto, os extratos sempre contêm mistura de substâncias fenólicas de diferentes classes que são solubilizadas em sistema solvente hidro-alcoólico. Estágios adicionais podem ser necessários para purificar e isolar substâncias ou remover substâncias fenólicas e não-fenólicas indesejáveis (SHAIIDI e NACZK, 1995).

Extratos metanólicos tem apresentado grande atividade antioxidante (NESSA *et al.*, 2004; AZIZAH *et al.*, 1999). MOURE *et al.*, (2000) obtiveram melhores resultados usando solvente com maior polaridade para a extração de polifenóis. Estudos comparativos para a seleção do solvente ótimo são necessários,entretanto, etanol, água e propilenoglicol são os solventes mais empregados para a extração de antioxidantes por razões de toxicidade, abundância e custo.

Em estudo realizado com cogumelos “Ling Chih” (*Ganoderma tsugae*), o extrato metanólico apresentou maior atividade antioxidante, porém baixa concentração de compostos fenólicos (24,0 a 35,5 mg/g) (MAU *et al.*, 2005). No extrato aquoso, a concentração de fenólicos obtida foi de 40,86 a 42,34 mg/g(MAU *et al.*, 2005).A água extrai com eficiência os compostos fenólicos com atividade antioxidante devido a sua polaridade.

A estabilidade dos compostos fenólicos, durante a desidratação e extração, é afetada por degradações químicas e enzimáticas e pela volatilização dos compostos, mas a decomposição térmica tem sido apontada como a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis. Na decomposição térmica, os fenóis podem reagir com outros componentes e impedir sua extração (MOURE *et al.*, 2001).

A temperatura durante a extração pode afetar os compostos bioativos de diferentes maneiras. O conteúdo total de fenólicos diminui com aumento da temperatura (CONDE *et al.*, 1998), assim como o conteúdo de proantocianidina nas mesmas condições (CADAHÍA *et al.*, 1998). A extração sob temperaturas brandas é desejável nos casos em que alguns compostos podem ser degradados como, por exemplo, o ácido carnósico presente nos extratos de alecrim. Por essa razão, pode ser empregada a extração com fluido supercrítico que preserva a ação antioxidante dos extratos (IBÁÑEZ *et al.*, 1999).

Com o objetivo de otimizar a extração dos compostos antioxidantes da microalga *Spirulina platensis*, HERRERO *et al.* (2005) utilizaram hexano, éter de petróleo, etanol e água como líquidos extratores, assim como temperaturas e tempos distintos. Altas temperaturas de extração apresentaram grande influência em todos os resultados, alterando os compostos com propriedades antioxidantes, enquanto a influência do tempo foi quase insignificante.

KIM *et al.* (2006) estudaram o efeito do aquecimento e das condições físicas de sementes de uva na atividade antioxidante dos extratos. Afirmaram que o aquecimento das sementes de uva favoreceu a liberação de compostos fenólicos e, portanto, aumentou a quantidade de compostos ativos em seus extratos.

1.3.11 Avaliação da toxicidade

A realização de estudos de propriedades farmacológicas e toxicológicas de extratos obtidos de plantas medicinais e de seus fitofármacos, intencionando a obtenção de fitoterápicos e de fitocosméticos é necessária para o uso seguro destes produtos (CALIXTO, 2000; COHEN 2000; RATES, 2001).

A experimentação animal tem servido, ao longo de muitos anos, como um meio de se determinar a eficácia e a segurança de diversas substâncias e produtos, em diferentes áreas.

Na área cosmética, os animais têm sido utilizados para avaliar todos os riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo.

O potencial de irritação de um produto depende de uma série de variáveis: componentes utilizados, concentração dos componentes, absorção, quantidade aplicada, estado da pele, modo e frequência de aplicação, efeito cumulativo (DOOMS-GOOSSENS, 1993), além da idiossincrasia.

Uma preocupação crescente na indústria de cosméticos é evitar possíveis reações adversas a usuários de seus produtos. O consumidor está muito mais crítico quanto à irritação cutânea provocada por determinado produto tópico, sendo considerado reação adversa qualquer sinal ou sintoma desencadeado por um produto utilizado de maneira correta (FISHER, 1995). Entre as reações adversas cutâneas provocadas por cosméticos podem ser destacadas a dermatite eczematosa de contato, a urticária, a acne e manchas (SAMPAIOe RIVITII, 2000).

Os riscos a serem avaliados para as matérias-primas e cosméticos são do tipo irritativo, alérgico e sistêmico, este último essencialmente por meio de sua absorção oral ou permeação (BRASIL, 2003).

Os modelos de irritação (BRASIL, 2003), só podem ser utilizados como parâmetros experimentais de triagem, ou seja, tem caráter preliminar.

Através de um conjunto de métodos *in vitro*, teste em ovo de galinha - membrana corioalantóide (HET-CAM), permeabilidade e opacidade de córnea bovina (BCOP), citotoxicidade pela difusão em gel de agarose, citotoxicidade pelo método do vermelho neutro (MTT), red blood cell system(RBC), podem ser agrupadas informações que ofereçam subsídios para garantir a segurança do produto em nível ocular (BRASIL, 2003).

Atualmente, apesar de todos os esforços para a redução e substituição de animais de laboratório na experimentação biológica, ainda não é possível abandonar a utilização desses animais na avaliação da segurança de produtos, nos seus mais diversos aspectos (BRASIL, 2003).

Cabe ressaltar que a utilização de animais deve, obrigatoriamente, seguir os preceitos do rigor científico e da ética que norteiam os desenhos experimentais com modelos biológicos, bem como as normas de bioterismo preconizadas internacionalmente (BRASIL, 2003).

De uma forma geral, recomenda-se que os animais de laboratório utilizados em experimentação sejam manuseados dentro dos preceitos éticos preconizados pelos Guias Internacionais, de forma a contribuir para o refinamento dos ensaios e a diminuição do sofrimento a que possam ser submetidos durante a realização de ensaios biológicos (BRASIL, 2003).

1.3.11.1 A importância da avaliação da citotoxicidade

A toxicidade é um dos parâmetros mais importantes na avaliação da resposta biológica e do potencial em causar morte de células ou tecidos. Um dos ensaios *in vitro* preconizados para avaliar o potencial de uma substância em causar morte celular é o teste de citotoxicidade (GRAY *et al.*, 2003). Segundo Black (1992), este ensaio representa a fase inicial dos testes de biocompatibilidade de substâncias e/ou extratos obtidos de plantas com potencial atividade farmacêutica ou cosmética, que para serem aprovadas não devem causar morte das células nem afetar suas funções celulares. De acordo com Northup (1986), nas avaliações de citotoxicidade, normalmente são empregadas células de linhagens estabelecidas devido à facilidade de obtenção e manutenção das linhagens celulares.

1.3.11.2 A importância da avaliação da mutagenicidade

Segundo Fenech *et al.*, 2005, o estudo de danos ao DNA induzido por substâncias de origem natural ou sintética é de extrema importância, pois trata-se de uma área essencial da toxicologia genética, uma vez que mutações em cromossomos despertam grandes interesses por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, tais como câncer e arteriosclerose (FENECH *et al.*, 2005; DE FLORA, 1998).

Uma variedade de substâncias químicas são agentes causadores de alterações cromossômicas. Essas substâncias podem atuar provocando alteração na distribuição dos cromossomos durante o processo de divisão celular gerando as aneuploidias (não segregação cromossômica), sendo chamadas de substâncias aneugênicas, e outras atuam induzindo

quebras cromossômicas e consequentemente alteração na estrutura dos cromossomos, sendo conhecidas como substâncias clastogênicas. Em ambos os casos é possível avaliar, através de ensaios específicos, o potencial mutagênico de um determinado composto, portanto esses ensaios tornam-se imprescindíveis nestas avaliações (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

O ensaio de micronúcleo em células de sangue periférico de roedores *in vivo* é um dos testes preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, sendo amplamente aceito e recomendado para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2003). Este ensaio permite a identificação de mutações em células que são expostas a determinados compostos, sejam eles de origem natural ou sintética.

1.3.12 Fitocosméticos

Um produto cosmético é uma preparação testada do ponto de vista da tolerância e dotada de propriedades corretivas ou preventivas como, por exemplo, propriedades higiênicas, capazes de proporcionar à pele um equilíbrio físicoquímico sem afetar as funções do organismo, o que quer dizer, sem intenção de promover efeitos que modifiquem suas funções fisiológicas. O fitocosmético pode ser definido como produto cosmético incorporado de extratos vegetais contendo princípios ativos, ou, destes ativos isolados, com propriedades corretivas, estéticas, higiênicas e de manutenção da homeostasia da pele (VALFRÉ, 1990).

A finalidade de um produto cosmético é corrigir ou prevenir as deficiências estéticas adquiridas no processo de envelhecimento, que pode ocorrer em uma velocidade mais ou menos rápida, dando à pele um aspecto envelhecido. Este é um fenômeno na verdade normal, fisiológico; não se trata de uma patologia ou doença, o que faz com que o produto cosmético não seja considerado um medicamento. Ele pode constituir produtos ativos, de origens diversas, que agirão de forma a retardar o processo de envelhecimento, através da proteção ativa da pele e contra os fatores que aceleram este movimento permitindo uma alteração no metabolismo cutâneo (PEYREFITTE *et al.*, 1998).

O produto cosmético pode prolongar, na medida do possível, o bom estado de funcionamento da pele, protegendo-a contra agressores de origem externa ou interna, os quais podem provocar um desequilíbrio, originando um processo degenerativo precoce do tecido

cutâneo. Através desta barreira formada, o produto cosmético pode favorecer o restabelecimento das condições de equilíbrio fisiológico da pele. Pode, ainda, permitir reparos através de uma reativação do metabolismo cutâneo na medida em que sofre agressões diversas o que diminui o seu bom funcionamento (PEYREFITTE et al., 1998).

Substâncias de origem natural apresentam excelente compatibilidade com a epiderme e vem sendo aplicadas na cosmética com muito sucesso. Estes ativos vem sendo e ainda devem ser muito explorados devido a alguns de seus diferenciais em relação aos demais: contém uma infinidade de substâncias químicas capazes de manter em equilíbrio a atividade fisiológica e apresentar maior compatibilidade com tecidos cutâneos em relação a outras fontes de ativos (VALFRÉ, 1990).

A retomada da consciência ecológica nos últimos anos impulsiona o desenvolvimento deste mercado, o qual apresenta um interessante argumento e apelo de marketing.

Os métodos utilizados para a extração destes ativos, nem sempre se encontram estabelecidos e padronizados. Extratos vegetais de diferentes fornecedores apresentam, muitas vezes, diferenças no método de preparo e controle o que, por consequência, pode resultar de diferenças nas concentrações dos constituintes ativos (SANTOS, 2006).

Estudos técnico-científicos para comprovação da eficácia e segurança de substâncias obtidas de plantas para garantir atividade do produto cosmético são necessários e desejáveis para que os resultados almejados não signifiquem apenas um apelo comercial, contribuindo efetivamente para que o fitocosmético apresente funcionalidade e bioatividade, colaborando na manutenção do equilíbrio e defesa do local onde são aplicados (NICOLETTI, 1997).

Ativos de origem natural apresentam de um modo geral, uma fragilidade à contaminação microbiana e sua compatibilidade e estabilidade devem ser objeto de estudos frequentes, e suas formulações devem seguir especificações pré-determinadas, o que indica um sério critério na escolha, seleção e utilização de ativos de origem vegetal (ISAAC et al., 2008; ROCHA et al., 2004).

Podemos então tentar definir a fitocosmética como uma ciência que lança mão de princípios ativos de origem vegetal responsável pelo equilíbrio da atividade fisiológica, podendo o cosmético ser formulado com substâncias de origem natural ou não, mas, quando totalmente natural poderia ser empregado o termo, popularmente utilizado, cosmético natural. Produto inexistente, devido à dificuldade em formular um produto cosmético exclusivamente com ingredientes 100% naturais, primeiro porque produtos de síntese como emulsificantes, solubilizantes, detergentes e condicionadores catiônicos muitas vezes se tornam

indispensáveis em uma formulação, tendo uma funcionalidade muito mais atraente do que ingredientes naturais, e, mesmo que estes possuam estas propriedades, podem ocorrer, mais facilmente, incompatibilidades técnicas (ISAAC et al., 2008).

Quanto à terminologia fitocosmético, pode ser considerado como o produto que vem de fontes vegetais renováveis e que não seja derivado de forma quimicamente modificada ou alterada. É comum a utilização de uma definição mais ampla, pode ser considerado o fitocosmético como um produto derivado de uma fonte vegetal ou seus derivados sintéticos de origem natural (CHARLET, 1996).

Em princípio, pode parecer contraditório associar as palavras tecnologia e natural, mas a eficácia dos produtos que contém ingredientes naturais depende tanto da pureza da matéria prima como da correta formulação para serem compatíveis com os constituintes cutâneos e causarem menos agressões e alergias à pele.

Na verdade, o conceito da fitocosmética, vem sendo explorado desde os tempos mais remotos, quando o homem procurava se tornar mais insinuante, mais atraente, mudando a cor da pele, ativando a cor dos lábios, tornando os olhos mais luminosos, o cheiro mais agradável. Os nossos antepassados preparavam com plantas os pós, as tintas e pomadas, palavra que designou no passado o creme de beleza, cujo primeiro excipiente foi a polpa de maçã crua ou cozida.

Hoje observamos que o caminho volta ao natural, associado às tecnologias de extração e purificação. Os consumidores que procuram um produto natural, esperam maior pureza, segurança e eficácia, assim como maior compatibilidade com o organismo.

1.3.13 Padronização química e dos processos para obtenção de extratos

A padronização de extratos vegetais é de extrema importância e uma tendência mundial e tem como objetivo garantir uma maior segurança, reprodutividade e eficácia do produto cosmético.

Padronizar um extrato significa estabelecer a relação ideal entre droga vegetal e extrato seco e a relação extrato e marcadores químicos. Muitos extratos são comercializados com o objetivo de preparar fitocosméticos, sem ao menos apresentar a concentração dos

princípios ativos. A utilização de extratos padronizados pode assegurar a eficácia de um fitocosmético, garantindo segurança e qualidade.

O primeiro critério a ser observado é da relação entre a droga e o extrato, isto é, quanto em peso foi inicialmente utilizado da planta seca para fornecer a quantidade de extrato seco.

A outra forma de padronização envolve o doseamento das substâncias químicas relacionadas aos seus efeitos ou à avaliação da sua atividade. Padrões isolados e puros ou substâncias majoritárias os marcadores, devem ser utilizados rotineiramente em controle de qualidade e, entretanto, há várias plantas que, embora conhecidas e estudadas, ainda não foram objeto de pesquisas para isolamento e identificação de seus principais ativos.

A tendência mundial é a padronização de extratos através de técnicas rápidas e eficientes, sejam elas espectrofotométricas e cromatográficas, como cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com a finalidade de se determinar as substâncias normalmente presentes, responsáveis pela atividade cosmética, mesmo que em pequenas concentrações ou, ainda, marcadores que possam nortear a quantidade de ativos presentes (JÁCOME *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 2

De acordo com a revisão da literatura, não existem relatos que atestam a atividade e segurança de diferentes extratos obtidos de polpas dos frutos de cajá manga. Neste capítulo foram estabelecidos critérios para obter droga vegetal estabilizada submetendo a polpa obtida de frutos de cajá manga (*Spondias dulcis* PARKINSON) a diferentes métodos extrativos e a partir destes avaliar e comparar a atividade antioxidante *in vitro*, buscando correlação com o teor de fenólicos, avaliando ainda a segurança dos extratos em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

2.1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 Equipamentos e acessórios

- Agitador magnético Marconi[®]
- Balança analítica Shimadzu[®] - mod AY 220
- Balança semi-analítica Gehaka[®] - mod B6 2000
- Banho-Maria Quimis[®]
- Câmera de luz ultravioleta Prodicil[®]
- Centrífuga Fanem[®]
- Coluna C-18 Agilent[®] Zorbax ODS
- Estufa de secagem e estabilização Fanem[®]
- Espectrofotômetro UV-VIS Hitachi[®] - mod UV U-2001
- Cromatógrafo líquido Shimadzu[®] com módulo de controle mod SCL-10A, detector UV-VIS mod SPD-10A, sistema de bombeamento de fase móvel quaternário mod LC-10AD, degaseificador mod DGU-14A (a vácuo), injetor manual Rheodyne
- Microscópio de fluorescência Leica Leitz[®] - mod DM RXE
- Moinho de facas Tecnal[®]
- Peagômetro digital Gehaka[®] - mod PG 1800
- Pipetadores automáticos Eppendorf[®]

- Rotaevaporador Quimis[®]
- Módulo de concentração Spread Vac Savant[®] - mod SPD 131 DDA acoplado a bomba a vácuo Thermo Savant mod VLP 80 e sistema de refrigeração Vapor Trap modelos RVT 405 DDA e RVT 4104.
- Turbo-extrator Skymesen[®]

2.1.2 Reagentes e solventes

Acetona P.A. (Chemis)

Acetato de chumbo P.A. (Reagen)

Acetato de etila P.A. (Chemis)

Ácido acético glacial P.A.. (Synth)

Ácido ascórbico P.A. (vitamina C) (Vetec)

Ácido bórico P.A. (Synth)

Ácido clorídrico P.A. (Synth)

Ácido clorogênico P.A. (Sigma Aldrich)

Ácido gálico P.A. (Vetec)

Ácido oxálico P.A. (Synth)

Ácido sulfúrico P.A. (Synth)

Água deionizada

Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico P.A. (ABTS) (Sigma Aldrich)

Carbonato de sódio P.A. (Chemis)

Ciclofosfamida P.A. (Sigma Chemical Co.)

Cloreto de alumínio P.A. (Reagen)

Cloreto férrico P.A. (Reagen)

Cloreto de sódio P.A. (Vetec)

Clorofórmio P.A. (Merck)

2,2-difenil-1-picrilhidrazida P.A. (DPPH••) (Sigma Aldrich)

Éter etílico P.A. (Chemis)

Éter de petróleo P.A. (Chemis)

Folin-Ciocalteau P.A.(Reagen)
Gelatina (Kraft Foods)
Hidróxido de amônio P.A.(Synth)
Laranja de acridina P.A. (Sigma Aldrich)
Limalha de magnésio
Metanol P.A. (Synth)
Miristato de isopropila P.A.(Synth)
n-butanolP.A. (Chemis)
Persulfato de sódio P.A. (Vetec)
Quercetina P.A. (Vetec)
RutinaP.A. (Vetec)
Sulfato de ferro amoniacal P.A.(Synth)
Zinco metálicoP.A. (Reagen)

2.1.3 Preparo da exsiccata para identificação botânica

Para a montagem do material seco foi utilizada a amostra coletada mais representativa e completa (ramos, folhas, flores e frutos) a qual foi costurada em cartolina e envolvida por papel Kraft (MING, 1996). O material, acompanhado de suas descrições essenciais, como local de coleta (Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, localizado no km 1 da Rodovia Araraquara-Jaú, Araraquara, estado de São Paulo - S21°48'51,4''; W48°12'05,1'' e 661 m de altitude), data de coleta (21/09/2010), nome do coletor (José Ricardo Soares de Oliveira), observações sobre a planta e informações gerais (os ápices vegetativos foram obtidos de *S. dulcis* que continham primórdios foliares, inflorescências e folhas jovens), foi depositado para identificação botânica no Herbário do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo – IBUSP, São Paulo. A confirmação da identificação da espécie foi realizada pelo Prof. Dr. José Rubens Pirani, especialista na família Anacardiaceae.

Foram coletadas partes aéreas contendo botões florais de *Spondias dulcis* (Anacardiaceae) (cajá-manga). O material obtido passou pelo processo de prensagem, que foi realizado utilizando uma superfície lisa que serviu de suporte, onde foram intercaladas 2

amostras da planta. Foram utilizados barbantes para comprimir fortemente o material coletado. As prensas foram colocadas dentro de estufas, à temperatura de aproximadamente 60°C, onde permaneceram até que o material estivesse completamente seco, quando então foram enviadas para identificação.

2.1.4 Material vegetal

Os frutos verdes e maduros de *S. dulcis* (Anacardiaceae) (cajá-manga) foram coletados no período de fevereiro a março de 2008 a 2010, no Campus da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, localizado no km 1 da Rodovia Araraquara-Jaú, Araraquara, estado de São Paulo (S21°48'51,4''; W48°12'05,1'' e 661 m de altitude). Os frutos maduros foram fragmentados e congelados, enquanto os verdes foram colocados para amadurecimento por 10 dias à temperatura ambiente.

2.1.5 Obtenção da droga vegetal

Após a coleta do material vegetal foi realizado armazenamento a baixa temperatura em freezer ($-5 \pm 2^\circ \text{C}$) com finalidade de estabilizar e conservar o material pela diminuição da temperatura, para posterior obtenção da droga vegetal.

Frutos maduros fragmentados foram estabilizados em estufa com circulação de ar a temperatura de 50°C por um período de 12 h. Após este processo, os frutos foram submetidos à secagem em estufa com circulação de ar à temperatura não superior a 50°C por uma semana, e revolvidas periodicamente para secagem uniforme e até peso constante.

Após essa etapa, a droga vegetal foi transferida à moagem em moinho de facas a fim de pulverizá-la. O pó resultante foi armazenado em frascos hermeticamente fechados, mantidos à temperatura ambiente e protegidos da exposição solar direta, sendo posteriormente empregados nos diferentes processos extrativos.

2.1.6 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes na polpa dos frutos de *S. dulcis*

A triagem fitoquímica preliminar de metabólitos secundários foi realizada com as polpas dos frutos maduros de *S. dulcis*, seca e pulverizada e extratos obtidos, incluindo os extratos hidroalcoólico (EHA) e etanólico (EOH) com a finalidade de se conhecer quais as principais classes de princípios ativos presentes na amostra segundo normas da Organização Mundial da Saúde (OMS) (adaptado de COSTA, 2001; SIMÕES, 2004).

2.1.6.1 Identificação de flavonóides

A identificação de flavonóides foi realizada pelas reação de Shinoda, Taubock, Pewe cloreto de alumínio.

Reação de Shinoda - Foram transferidos 5 mL dos extratos macerados para tubos de ensaio e adicionados de 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante pelas paredes do tubo. O desenvolvimento de coloração laranja indica a presença de flavonas; violácea indica a presença de flavononas e vermelha indica a presença de flavonóis. A limitação da técnica é que chalconas, auronas e isoflavonas não desenvolvem coloração; porém, algumas chalconas em meio ácido produzem flavononas.

Reação de Taubock - foram transferidos cerca de 3 mL dos extratos macerados para tubos de ensaio e levados ao banho-Maria (BM) até secura. Após resfriamento, o resíduo foi umedecido com algumas gotas de acetona e cristais de ácido bórico e de ácido oxálico foram adicionados. Foi evaporado novamente em BM até a secura, o resíduo dissolvido em 3 mL de éter etílico e observado sob a luz ultravioleta, sendo considerado positivo para flavonóis quando apresentada fluorescência amarelo esverdeado.

Reação de Pew - Foram transferidos para tubos de ensaio, cerca de 3 mL dos extratos macerados, transferidos ao BM até secura e adicionados de 3 mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico e adicionado de aproximadamente 0,5 mL de HCl concentrado. O

desenvolvimento lento de coloração vermelha é considerado positivo para flavonóis, laranja para flavonas e violeta para flavononas.

Reação de cloreto de alumínio - Foi realizada uma reação com cloreto de alumínio utilizando papel de filtro, umedecendo áreas diferentes do papel de filtro com os extratos macerados obtidos. Em seguida foi adicionada, sobre uma das regiões, uma gota de solução de AlCl_3 a 5% e realizada a comparação da fluorescência sob luz ultravioleta de ondas longas, sendo que o resultado positivo é verificado pela intensificação de fluorescência com mudança de cor para amarelo esverdeado para flavonas, fluorescência amarela para flavonóis, amarelo para flavononas, amarelo acastanhado para isoflavonas e fluorescência azul esverdeado para chalconas.

2.1.6.2 Identificação de taninos

A identificação dos taninos foi realizada pela reação com cloreto férrico, sulfato de férrico amoniacal, acetato de chumbo e precipitação em presença de solução de gelatina.

Reação com cloreto férrico 1% (m/v)- foram transferidos 5 mL dos extratos macerados para tubos de ensaio e adicionadas 5 gotas de solução metanólica de cloreto férrico a 1%. O desenvolvimento de coloração verde a azul é indicativo da presença de taninos.

Reação com sulfato de ferro III amoniacal 1% (m/v) - foram transferidos 5 mL dos extratos EHA e EOH para tubos de ensaio e adicionados de 2 gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal a 1%. O desenvolvimento de coloração de verde ou azul é indicativa da presença de taninos condensados e hidrolisáveis, respectivamente.

Reação com acetato de chumbo 10% (m/v)- foram utilizados 5 mL dos extratos EHA e EOH, adicionados de 5 mL de ácido acético a 10% e gotejado 5 mL de acetato de chumbo solução aquosa a 10%. A formação de precipitado é indicativo da presença de taninos.

Precipitação com solução de gelatina a 2,5% em cloreto de sódio a 0,9% - Foi utilizada para a verificação de precipitação protéica, indicativo da presença de taninos. Foram transferidos para tubos de ensaio 0,5 mL, 1,0 mL e 2 mL dos extratos EHA e EOH,

sendo adicionados de 2,0 mL da solução de gelatina a 2,5% a cada tubo e observado. A precipitação e turvação são indicativas da presença de taninos.

2.1.6.3 Identificação de saponinas

Em tubos de ensaio foi adicionado decocto filtrado preparado com 2 g de droga vegetal em 10 mL de água destilada. Os tubos foram agitados energicamente por 20 segundos. Em seguida foram deixados em repouso por trinta minutos. A espuma formada foi medida. Espuma persistente após adição de ácido clorídrico, maior ou igual a um centímetro indica a presença de saponinas.

2.1.6.4 Identificação de antraquinonas

Em um balão de fundo chato de 100 mL foram transferidos 30 mL dos extratos EHA e EOH e adicionados 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. O balão foi acoplado a um condensador e transferido ao refluxo por 30 minutos. Aos extratos filtrados, ainda quentes, foram adicionados 30 mL de água deionizada, transferidos para um funil de separação e extraídos, em duplicata, com 10 mL de éter etílico. A fase orgânica foi separada e concentrada em BM a 60°C até restar 5 mL e transferidos para um tubo de ensaio. Foram adicionados 5 mL de solução de hidróxido de amônio e agitados lentamente. O desenvolvimento de coloração rósea-vermelha é indicativo da presença de antraquinonas; o desenvolvimento de coloração violeta indica a presença de naftoquinonas e de coloração azul é indicativa da presença de benzoquinonas.

2.1.7 Obtenção dos extratos a partir de polpa de frutos de *S. dulcis*

Neste trabalho foram preparados extratos vegetais a 1:10 e 2:10 (m/v), de acordo com as Figuras 2.1 e 2.2, segundo diferentes procedimentos: (1) maceração, (2) turbólise, (3) refluxo e (4) percolação. Nos três primeiros procedimentos, foram utilizados etanol P.A. (EtOH) e etanol 70°GL (EtOH 70) como solvente e no último, etanol P.A. (EtOH), sendo que as condições utilizadas nos processos estão reportadas nos itens 2.1.7.1 a 2.1.7.4.

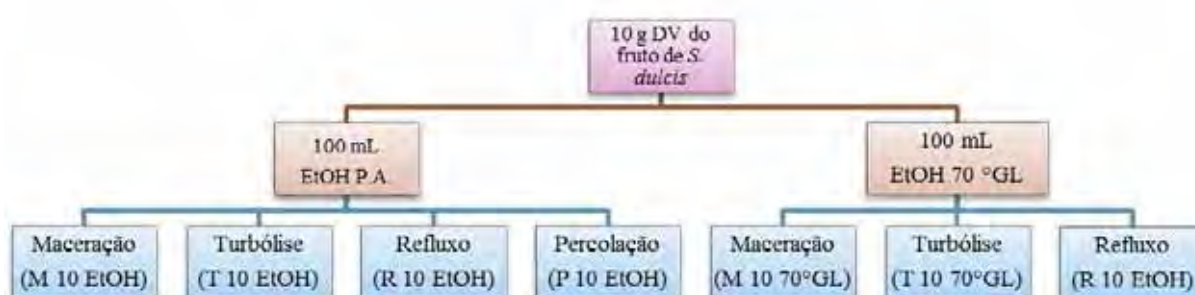


Figura 2.1 Fluxograma de obtenção dos extratos de *S. dulcisa* 1:10 (m/v).

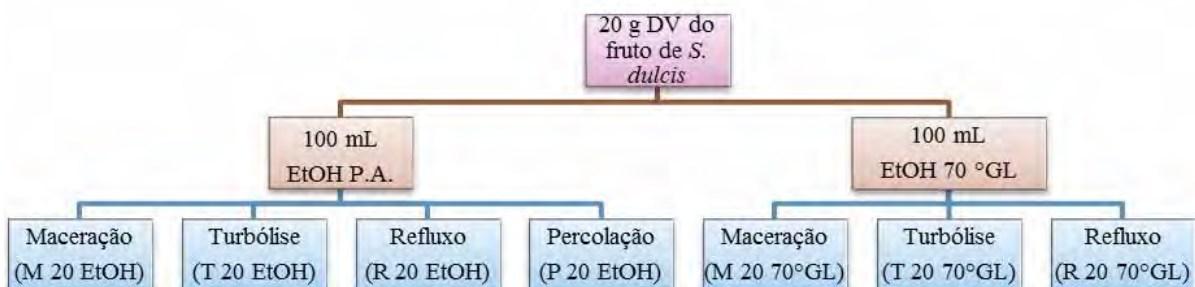


Figura 2.2 Fluxograma de obtenção dos extratos de *S. dulcisa* 2:10 (m/v).

2.1.7.1 Obtenção de extratos por maceração da polpa de frutos de *S. dulcis*

Para o preparo dos extratos foram utilizados como solventes extratores EtOH e EtOH 70°GL. Para o preparo de extratos a 1:10 e 2:10 (m/v) foram utilizados, respectivamente, 10 g e 20 g de droga vegetal (DV) obtida a partir da polpa do fruto de *S. dulcis* para 100 mL de cada solvente. Ao final do processo, foram obtidos os extratos M10 EtOH e M10 EtOH 70;

M20 EtOH e M20 EtOH 70. Essas soluções foram mantidas durante dez dias em vidros âmbar, sob o abrigo da luz e com agitação e temperatura controlada entre 40 e 50° C.

2.1.7.2 Obtenção de extratos por turbólise da polpa de frutos de *S. dulcis*

Para o preparo dos extratos foram utilizados como solventes extratores EtOH e EtOH 70. Para o preparo de extrato a 1:10 e 2:10 (m/v) foram utilizados 10 e 20 g de droga vegetal (DV) obtida a partir da polpa do fruto de *S. dulcis* para 100 mL de cada solvente, para a obtenção dos extratos T10 e T20, respeitando as devidas graduações alcoólicas, ao final do processo foram obtidos os extratos T10 EtOH e T10 EtOH 70; T20 EtOH e T20 EtOH 70.

As soluções foram colocadas no turboextrator e processadas por 15 minutos, em intervalos de 5 minutos, para o resfriamento do sistema.

2.1.7.3 Obtenção de extratos por refluxo da polpa de frutos de *S. dulcis*

Para o preparo dos extratos foram utilizados 10 e 20 g de droga vegetal (DV) obtida a partir da polpa do fruto de *S. dulcis* para 100 mL de cada solvente para a obtenção dos extratos R10 e R20, respectivamente.

O método extrativo por refluxo foi adaptado de Wagner (1984) e desenvolvido em duas etapas utilizando solventes de polaridade diferentes em cada etapa, para seletiva separação dos compostos e considerando, no processo de extração, a polaridade das substâncias presentes no material vegetal. A partir da polpa seca e pulverizada, foi realizado processo de tratamento para a retirada de pigmentos e gorduras, por meio de extração com éter de petróleo, sob refluxo, à temperatura controlada de 45°C em BM por 30 minutos. A produção dos extratos R10 EtOH, R10 EtOH 70, R20 EtOH e R20 EtOH 70 foi realizada pelo mesmo método, após recolhida a fração etérea e eliminação total do solvente do material vegetal, foi adicionado EtOH ou EtOH 70, deixando em contato durante o mesmo tempo.

2.1.7.4 Obtenção de extratos por percolação da polpa de frutos de *S. dulcis*

Foi usado o processo geral P, descrito na Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959), utilizando como solvente extrator, EtOH. Para o preparo dos extratos foram utilizados 10 e 20 g de droga vegetal (DV) obtida a partir da polpa do fruto de *S. dulcis* para 100 mL do solvente para a obtenção dos extratos P10 EtOH e P20 EtOH, respectivamente.

A Tabela 2.1 resume as condições utilizadas para todos os métodos extrativos.

Tabela 2.1 Condições utilizadas no processo de extração.

Condições de extração						
Métodos extrativos	Volume de solvente (mL)	Temperatura (°C)	Agitação	Tempo	Relação DV/solvente (g/mL)	
Maceração	100	40	Sim	10 dias	1:10	1:20
Turbólise	100	35	Sim	15 min	1:10	1:20
Refluxo	100	45	Sim	30 min	1:10	1:20
Percolação	100	Ambiente	Não	48 h	1:10	1:20

2.1.8 Purificação, secagem e armazenamento dos extratos

Foi realizada a filtração em funil comum com papel de filtro dos líquidos extrativos, que, em seguida, foram concentrados em rotaevaporador, sob pressão reduzida, à temperatura de BM não superior a 50°C, até quase a secura. O fim da secagem foi realizado em capela, à temperatura ambiente, até que atingisse massa constante. Os extratos obtidos foram pesados e armazenados em dessecador e, posteriormente, mantidos à temperatura de 4° C em frasco de vidro fechado.

2.1.9 Determinação do pH dos extratos

A determinação do pH, adaptada da Farmacopéia Brasileira (2000), foi realizada preparando soluções a 10% do extrato em água recém destilada, com peagômetro digital, calibrado com soluções tampão fosfato e acetato, pH 7,0 e 4,0, respectivamente. As análises realizadas em triplicata e os resultados obtidos referem-se às médias das determinações para os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos.

2.1.10 Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico dos extratos da polpa seca do fruto de *S. dulcis* obtidos por diferentes procedimentos e sob diferentes concentrações foi realizado utilizando as técnicas de Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (STICHER, 1993; USP 25, 2002).

2.1.10.1 Cromatografia em camada delgada comparativa

Para realizar a CCDC foi utilizada para a detecção de flavonóides fase móvel proposta por WAGNER (1984) e modificada, composta pelo sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético:água (110:10:10:20, v/v/v/v) para análise da presença de rutina e ácido clorogênico. Pelo sistema eluente acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético (145:2,5:2,5, v/v/v) para observar a presença de quercetina.

A fase estacionária utilizada foi placa de alumínio de sílica gel 60 F₂₅₄ (MERCK). Foram aplicadas 10 µL das amostras (extratos obtidos) e os padrões, (ácido clorogênico, ácido gálico, ácido tânico, rutina e quercetina, solubilizados 1 mg/mL em metanol). As placas foram reveladas com solução metanólica, contendo ácido bórico a 3% e oxálico 10% (WAGNER, 1984) e observadas em câmara escura sob luz ultravioleta (325 nm).

2.1.10.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

O extrato M20 EtOH 70°GL utilizado no método de CLAE foi escolhido e definido por parâmetros de resultados obtidos nas análises da atividade antioxidante, quantidade de fenólicos e mutagenicidade.

2.1.10.2.1 Pré tratamento da amostra

O procedimento de pré-tratamento da amostra (Figura 2.3) foi realizado para retirada de açúcares e de possíveis interferentes lipofílicos que pudessem danificar a coluna utilizada na CLAE. Foram pesados 10 g do macerado seco e solubilizados em 100 mL de água destilada. A solução foi, então, submetida à partição em funil de separação com três porções sequenciais de 50 mL de n-butanol e as frações resultantes foram recolhidas em vidro de relógio tarado e submetidas à evaporação dos solventes. Dos resíduos secos obtidos, 1,84 g resultou do n-butanol e 7,72 g do resíduo aquoso.

Os resíduos obtidos da partição líquido-líquido foram, ainda, submetidos a um segundo pré-tratamento (“clean up”), através de extração em fase sólida (EFS) utilizando sílica C-18 (2 x 1 cm; 40-63 µm). Após condicionada com 10 mL de H₂O, foi adicionado 1,0 mL de solução aquosa adicionada de 10 mg de amostra dos resíduos secos. A eluição foi realizada utilizando 4 mL de H₂O, e, na sequência, 5 mL da mistura eluente acetonitrila/H₂O (95: 5 v/v), seguida por 5 mL do eluente acetonitrila. As frações recolhidas para cada fase da partição foram denominadas, respectivamente, FR01, fração aquosa da fase aquosa da partição; FR02, fração ACN 95% da fração aquosa da partição; FR03, fração aquosa da fase n-butanol da partição; FR04, fração ACN 95% da fase n-butanol da partição. As frações ACN de ambas as fases da partição não foram analisadas por CLAE.

2.1.10.2.2 Preparação dos padrões e dos analitos

Preparou-se soluções padrão de trabalho de concentração 1mg/mL. Para isto, pesaram-se exatamente 0,0010 g de padrão e transferidos quantitativamente para balão volumétrico de 10 ml e adicionou-se cerca de 5 mL de metanol, agitou-se por 20 minutos e manteve-se por 10 minutos em banho ultrassônico e, então, completou-se o volume com metanol obtendo soluções padrão de trabalho (SPT).

Os padrões foram obtidos, nas concentrações desejadas, pela solubilização em escala volumétrica da alíquota necessária. Foram empregados como padrões nas análises o ácido clorogênico, a rutina, a quercetina, o ácido cafeico e o ácido ascórbico.

Metanol, ácido acético e acetonitrila grau HPLC e água ultrapura obtida por aparelho Milli-Q[®] foram os solventes utilizados. Todas as soluções de padrões e amostras foram filtradas utilizando seringa de vidro de 20 mL não estéril (Artiglass[®]) e de membranas de 0,22 µm (PVDF da Millipore[®]). Para a injeção foi utilizada microseringa Hamilton[®] de 50 µL; o volume de injeção foi sempre de 20 µL.

2.1.10.2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) do extrato M20 EtOH 70

Para a análise por CLAE foi utilizado um sistema cromatográfico da Shimadzu[®] com módulo de controle modelo SCL-10A, detector UV-VIS modelo SPD-10A, sistema de bombeamento de fase móvel quaternário modelo LC-10AD, degaseificador modelo DGU-14A (à vácuo), e *loop* do injetor de 20 µL. O controle e o registro das informações foi realizado como programa CLASS A-VP da Shimadzu[®].

A coluna utilizada foi a Agilent[®] Zorbax ODS C-18 (250mm x 4,6 mm; 5 µm). O método para análise foi adaptado de Apati e colaboradores (2002). A fase móvel empregada foi adicionada de 4% de ácido acético e iniciou com 10% de acetonitrila (ACN) por 15 min (isocrático), aumentando a concentração do eluente em 30% de ACN até 25 min, 50% até 35 min atingindo concentração de 100% até o final da corrida em 50 min, mais 100% ACN por 5

min, com vazão de 1,0 mL/min, em ambiente de temperatura controlada de 20° C e com detector selecionado em 325 nm.

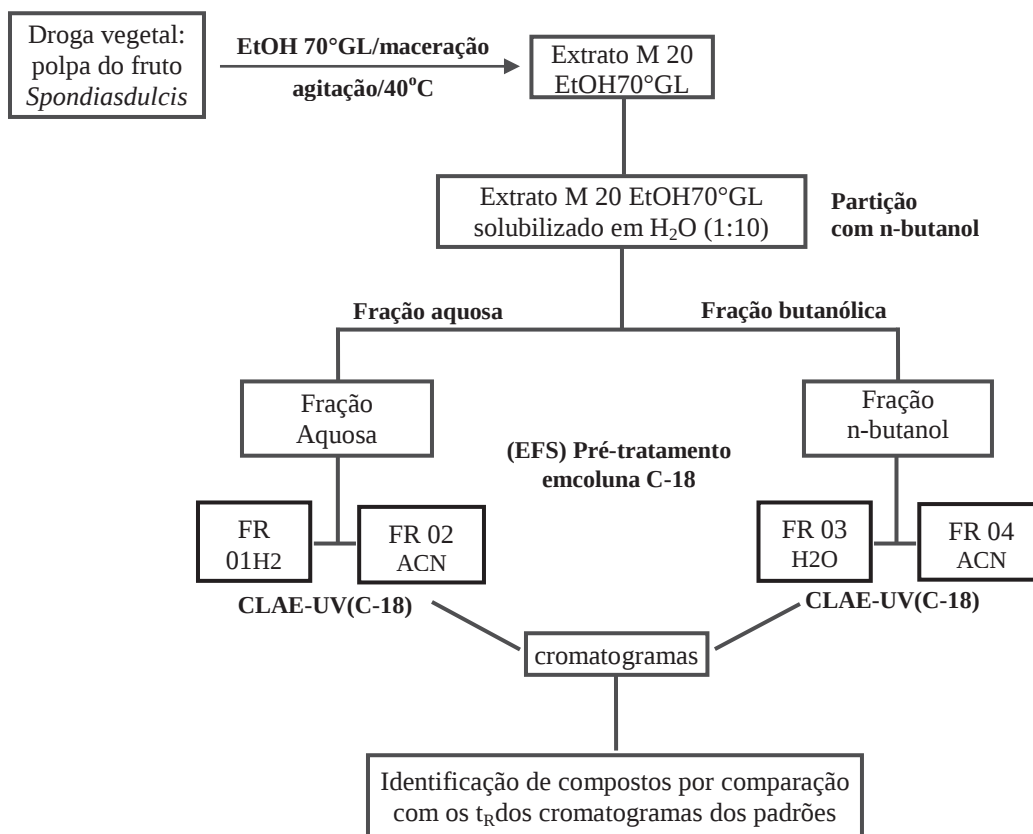


Figura 2.3 Obtenção e pré-tratamento do extrato M20 EtOH 70°GL obtido da polpa de *S. dulcis* para análise por CLAE-UV(C-18).

2.1.11 Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta

Os extratos obtidos foram analisados em espectrofotômetro na região de ultravioleta e os seus respectivos espectros registrados.

A leitura de absorvância foi realizada na faixa de 190 a 600 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro Hitachi® U-2001, com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. As amostras foram analisadas usando o metanol como branco (CHOI et al., 2006).

2.1.12 Estudo da ação antioxidante *in vitro*

2.1.12.1 Ensaio de autobiografia em CCD para avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•

Para avaliação da atividade sequestradora de radicais livres foi desenvolvida metodologia baseada em dados da literatura (BLOIS, 1958; MOLYNEUX, 2004; GIORDANI *et al.*, 2008) utilizando como revelador uma solução recém preparada de DPPH• em MeOH a 0,2%. Foram obtidos cromatogramas para o extrato M20 EtOH 70° GL e de suas frações investigados por técnica de CCDC como no item 2.1.10.1, utilizando placas 20x20 de sílica gel (Merck®).

A placa, após eluída e revelada com solução de DPPH•, foi submetida à análise em câmara escura sob lâmpada fluorescente de comprimento de onda 254 nm, para observação de manchas de coloração amarela (extrato) sobre um fundo de coloração púrpura do DPPH•. A presença de manchas amarelas revela o poder antioxidante dos extratos examinados.

2.1.12.2 Avaliação da atividade antioxidante pela captura do radical livre DPPH•

Uma solução 0,06mM de DPPH• foi preparada dissolvendo 2,4 mg de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila em 100 mL de metanol e transferida para um frasco de vidro âmbar.

A partir dos extratos obtidos, todos foram preparados, em tubos de ensaio, seis diluições diferentes e em triplicata (15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg/mL). Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição dos extratos para tubos de ensaio com 3,9 mL da solução do radical DPPH• 0,06 mM. Os tubos foram homogeneizados em agitador e mantidos na ausência de luz por 30 minutos. Para solução controle foram utilizados 0,1 mL de metanol e 3,9 mL do radical DPPH•, e tratados nas mesmas condições das amostras. O ensaio também foi realizado para o ácido ascórbico e rutina como padrões antioxidantes, em diferentes concentrações (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1 mg/mL). O ensaio foi realizado em

triplicata e as absorvâncias foram medidas em 517 nm para os extratos, utilizando metanol como branco (BLOIS, 1958; BRAND-WILLIAM *et al.*, 1995 e SÁNCHEZ- MORENO *et al.*, 1998; BRACA *et al.*, 2002). Na presença de sequestradores (*scavengers*) deste radical, a intensidade da absorvância em 517 nm diminui e a porcentagem de inibição (%Inibição) pode ser calculada como (CUENDET *et al.*, 1997):

$$\% \text{ Inibição DPPH} \bullet\bullet = \left(1 - \frac{A_{AMOSTRA}}{A_{CONTROLE}} \right) \times 100$$

sendo que,

$A_{AMOSTRA}$ é a absorvância do DPPH•• em 517 nm na presença de amostra.

$A_{CONTROLE}$ é a absorvância do DPPH•• em 517 nm na ausência de amostra.

2.1.12.3 Avaliação da atividade antioxidante total pelo ABTS

Uma solução do radical ABTS foi preparada a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio. A mistura foi mantida no escuro, à temperatura ambiente, por 16 horas. Em seguida foi diluído 1 mL desta mistura em etanol até obter uma absorvância de 0,70 nm ± 0,05 nm a 734 nm (RUFINO *et al.*, 2007). Alíquotas de 10 µL das amostras em diferentes concentrações dos todos os extratos (15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/mL) foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante, foram adicionados a 1 mL da solução de ABTS e o desaparecimento da absorvância do radical foi determinado em 734 nm a 30° C, exatamente 6 minutos após o início da reação. Foi realizada a leitura da absorvância e calculada a concentração de inibição de 50% do radical pelas amostras (EREL, 2004; KARAKAYA e YLMAZ, 2007, RUFINO, 2007a).

2.1.13 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando o método de FOLIN-CIOCALTEAU, que consiste na comparação, por espectroscopia na região de UV-vis, entre a absorvância do extrato vegetal após reação com o reagente de FOLIN, frente às curvas analíticas dos padrões ácido gálico e rutina (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Preparo da curva analítica. Para o preparo das soluções padrão foram utilizados balões de 100 mL, adicionados de 75 mL de água deionizada, rutina e ácido gálico, usados como padrões, em diferentes quantidades para originar as diferentes concentrações, 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído a 10%, 10 mL de solução de Na_2CO_3 7,5%, completando o volume com água destilada, sob agitação. As soluções foram preparadas em triplicata. Após 30 minutos de repouso, foi obtida curva analítica, a partir da média das leituras da absorvância em 765 nm dos padrões, nas concentrações de 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Para determinação da equação da reta e do coeficiente de correlação linear foi utilizado o programa Excel® do Microsoft Office 2007.

Análise das amostras. Todas amostras a serem analisadas foram preparadas em triplicata, segundo o método descrito para as soluções padrão, exceto pelo fato de que, ao invés do padrão, foram adicionados 0,25 mL de cada extrato diluídos em MeOH/ H_2O 8:2 (400 mg/mL). As leituras das absorvâncias das soluções resultantes foram determinadas também em 765 nm e utilizada a média no cálculo da concentração de fenólicos totais, sendo usada a curva analítica do padrão. Os valores determinados foram, então, expressos em μg de fenólicos totais equivalentes à rutina ou ao ácido gálico por miligrama de extrato seco.

2.1.14 Determinação do teor de flavonóides totais

A determinação do teor de flavonóides foi realizada para o extrato M 20 EtOH 70° GL obtido de polpa de *S. dulcis*. Foram pesados, exatamente, 20,00 mg de extrato e adicionou-se 2 mL de metanol 80%. Após 2 h, a mistura foi centrifugada e completou-se o volume do sobrenadante para 10 mL com metanol 80%. A 2 mL desta última solução adicionou-se 2 mL

de uma solução de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2% em metanol. Depois de 15 minutos, procedeu-se à leitura espectrofotométrica em 430 nm, utilizando uma solução de 2 mL de amostra adicionada de 2 mL de metanol 80% como branco. Rutina foi utilizada como padrão na construção da curva analítica, nas concentrações de 0,5, 1,5, 2,5, 5,0 e 10 $\mu\text{g/mL}$ etodas as determinações foram executadas em triplicata (DJERIDANE *et al.*, 2006). O teor de flavonóides totais foi expresso em $\mu\text{g/mL}$ equivalente à rutina em cada 100 mg de extrato.

2.1.15 Avaliação da citotoxicidade dos extratos de *S. dulcis*

Para os testes de citotoxicidade foram utilizados macrófagos (linhagem J774), mantidos em garrafas de cultura em meio RPMI- 1640 (pH 7,0), preparado com 10% de soro bovino fetal, 0,2% de bicarbonato de sódio e 10 mM de HEPES. Ao acondicionamento das garrafas foram adicionados 0,1% de solução de estreptomicina e 0,1% de solução de anfotericina B. As células foram incubadas em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 .

Foram pesados 20 mg dos extratos M10 EtOH 70° GL e M20 EtOH 70° GL e dissolvidos em 200 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, foram diluídos 1:5 com meio de cultura e 20 μL foram aplicados em 180 μL de meio e diluídos de forma seriada na proporção 1:1. A faixa de concentração do teste variou de 2000 $\mu\text{g/mL}$ a 1,95 $\mu\text{g/mL}$ e os testes foram realizados em triplicata.

A técnica consistiu em coletar as células, com auxílio de “scraper” e centrifugá-las a 1500 rpm por 10 minutos e contá-las com auxílio do corante Turk, em câmara de Neubauer, ajustando para a concentração de 10^5 células/mL em meio de cultura.

As células foram incubadas em microplacas de 96 poços, a 37°C e 5% de CO_2 por 24 h. Após este período, foi observada a formação de tapete celular e foi retirado o meio existente, já inadequado para a manutenção.

Em outra microplaca de 96 poços foram colocados 100 μL de meio em todos os poços, exceto nos poços da coluna 1, onde foram acrescentados 180 μL de meio de cultura e 20 μL das amostras previamente diluídas 1:5 dos extratos M10 EtOH 70° GL e M20 EtOH 70° GL. Foi, então, realizada uma diluição seriada 1:1 (v/v), a partir destes poços com 200 μL

para os demais poços da respectiva microplaca. As amostras assim diluídas foram transferidas para a microplaca contendo o tapete celular (OHNO *et al.*, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 2008).

Posteriormente ao período de incubação de 24 h a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 15 µL de solução aquosa de resazurina a 0,1 mg/mL, incubando a microplaca por 3 h na mesma estufa. Quatro poços da coluna 12 foram utilizados para controle positivo do crescimento celular e quatro como controle negativo de ausência de crescimento.

A leitura dos resultados foi realizada visualmente pela diferenciação entre a cor azul, indicativa da ausência de células vivas e cor-de-rosa, indicativa de presença de células vivas (O'BRIEN *et al.*, 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.

2.1.16 Ensaio de mutagenicidade dos extratos etanólicos 70° GL obtidos de *S. dulcis* através do teste de micronúcleo

Para a avaliação da mutagenicidade *in vivo* dos extratos etanólicos 70° GL obtidos de *S. dulcis* (cajá-manga), nos diferentes processos de extração, foi empregado o teste de micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos da espécie *Mus musculus* (Swiss albino) com aproximadamente 30g de peso corpóreo, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura de 23± 2°C.

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento desse ensaio foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, a qual manifestou-se favorável à sua execução. O Protocolo CEP/FCF/CAr nº 31/2010 consta do Anexo 01.

Para os tratamentos, os animais foram divididos em grupos de 10, sendo 5 machos e 5 fêmeas. Cada um deles recebeu as diferentes doses dos extratos obtidos de *S. dulcis* (M 10, M 20, T 20 e R 20) via *gavage*.

Foi estabelecido um grupo controle negativo (GI), onde os animais foram tratados apenas com água, o mesmo veículo utilizado para solubilizar os extratos e um grupo controle

positivo (GII), no qual os animais foram tratados via intraperitoneal com ciclofosfamida (50 mg/kg p.c.)

Os animais foram separados em 12 grupos tratados com extrato obtido pelo processo de maceração 1:10 (m/v) em etanol 70° GL (G III, G IV e G V); extrato obtido pelo processo de maceração 1:20 (m/v) em etanol 70° GL (G VI, G VII e G VIII) e extrato obtido pelo processo de turbólise 1:20 (m/v) em etanol 70° GL (G IX, G X e G XI); extrato obtido pelo processo de refluxo 1:20 (m/v) em etanol 70° GL (G XII, G XIII e G XIV). Os tratamentos recebidos estão descritos na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 Grupos de animais tratados com os controles e extratos de *S. dulcis* obtidos por diferentes processos extrativos

Grupos	Tratamento (mg/Kg) com extratos EtOH 70					
	Ctrol -	Ctrol +	M10	M20	T20	R20
I	X					
II		X				
III			500			
IV			1500			
V			2500			
VI				500		
VII				1500		
VIII				2500		
IX					500	
X					1500	
XI					2500	
XII						500
XIII						1500
XIV						2500

O protocolo adotado para a realização deste trabalho foi o descrito por Hayashi *et al.* (1990), no qual se empregam lâminas précoradas com o corante fluorescente laranja de acridina (acridine orange), que proporciona coloração amarela ao DNA e vermelha ao RNA.

Preparo das lâminas com laranja de acridina. As lâminas limpas foram aquecidas em uma placa aquecedora a aproximadamente 70°C. Nas lâminas ainda quentes, foram colocados 10µL de solução de laranja de acridina (1 mg/ml) sobre a lâmina e fez-se o espalhamento utilizando a extremidade de outra lâmina limpa. As lâminas foram secas ao ar e guardadas em caixa apropriada, à temperatura ambiente, em local escuro por, pelo menos, 24 horas.

Obtenção do sangue e preparo das células. Com o auxílio de uma agulha, foi perfurada a cauda do animal, sendo coletados 5µL de sangue (uma gota) que foram depositados no centro da lâmina previamente preparada com laranja de acridina, cobrindo-a com lamínula. As lâminas com o material biológico foram mantidas -20°C e na ausência da luz por, no mínimo, 24 horas antes da análise citológica, propiciando melhor ação do corante.

Análise citológica. A análise das lâminas contendo o sangue periférico dos animais foi efetuada o mais rápido possível, para evitar a deterioração do material. Esta análise deve ser realizada em microscópio de fluorescência, combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo. Foram contados 1000 reticulócitos por animal e anotadas as frequências de células micronucleadas.

Após a análise citológica das lâminas contendo amostras do sangue periférico dos camundongos tratados com os extratos, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Preparo da exsicata e identificação botânica

O material vegetal foi identificado como pertencente à família Anacardiaceae, gênero e espécie *Spondias dulcis*, realizada pelo Prof. Dr. José Rubens do Herbário do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo – IBUSP, São Paulo.

A correta identificação botânica é necessária, uma vez que foram constatadas na literatura confusões de nomes, tanto populares quanto científicos, para alguns indivíduos do gênero *Spondias*, o que pode levar muitas investigações ao descrédito científico.

A descrição botânica do cajá-manga relata a existência de poucos estudos para a espécie estudada quando comparada às demais espécies do gênero *Spondias*. Mais raros são os estudos das potenciais propriedades de seus compostos bioativos, sendo que a maioria dos trabalhos disponíveis cita sua composição nutricional semelhantes à *S. mombim* como na Tabela 1.1, que vão além das reconhecidas características aromáticas representadas excelentemente pelos frutos ou sucos de frutas tropicais.

2.2.2 Obtenção da droga vegetal

Buscando a eficiência no processo de conservação e estabilização, após a coleta os frutos maduros de *S. dulcis* foram submetidos a uma sequência de processamentos, incluindo fragmentação.

Em virtude da necessidade de conservação do material vegetal e, consequentemente, das substâncias presentes, o material vegetal coletado e armazenado, após sofrer fragmentação, foi submetido aos processos de estabilização e secagem, para posterior pulverização, o que resultou em material estável de fácil conservação.

Observou-se visualmente que é possível a secagem do material a temperatura baixa e controlada (max. 50°C). O desenvolvimento da técnica de estabilização busca minimizar, ou

ainda, eliminar agentes deletérios, responsáveis pela degradação, por processos enzimáticos ou microbianos. Os processos de beneficiamento, estabilização e secagem do material, tiveram como principal função facilitar a conservação e, quando necessária, comercialização do material estável e de qualidade.

A Figura 2.4 mostra o material vegetal desde o armazenamento e conservação até obtenção da droga vegetal.



Figura 2.4 Processo de conservação e obtenção da droga vegetal

2.2.3 Análises físicas e químicas do material vegetal

A droga vegetal, na forma pulverizada, foi submetida a processos de caracterização fitoquímica e obtenção dos extratos, utilizando os processos extrativos por meio de métodos de maceração, turbólise, refluxo e percolação. Os extratos obtidos foram analisados por CCDC, investigados quanto à capacidade antioxidante e toxicidade para a escolha do extrato incorporado à formulação cosmética. O melhor método extrativo foi obtido por maceração segundo resultados obtidos nas análises.

2.2.4 Triagem fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários presentes na polpa dos frutos de *S. dulcis*

A caracterização de classes de metabólitos secundários de plantas pode ser objeto de triagem fitoquímica de substâncias de interesse farmacológico. A droga vegetal e extratos obtidos a partir da polpa de frutos de *S. dulcis* foram avaliados quimicamente quanto à presença dos respectivos grupos químicos por reações seletivas (COSTA, 2001; SIMÕES *et al.*, 2004; HARBORNE, 2000): (1) flavonóides, (2) taninos, (3) saponinas, (4) antraquinonas. Os resultados obtidos nas análises indicaram a presença das três primeiras classes estudadas e, conseqüentemente, serviram como estudo preliminar de análise da presença de substâncias de interesse.

Os estudos são fundamentados, em sua maioria, em reações colorimétricas e outras de precipitação. No primeiro caso, os nuances colorimétricos decorrem de diferenças estruturais de compostos conforme o núcleo, o número e a disposição dos substituintes hidroxilados presentes majoritariamente nas moléculas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; FALKENBERG *et al.*, 2004).

Desta forma, os resultados obtidos com a droga vegetal e os extratos em análise para cada classe dos principais metabólitos secundários são demonstrados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 Triagem fitoquímica coma droga vegetale extrato macerado de *S. dulcis*.

Grupos	Testes	Resultados	Especificação
Flavonóides	Shinoda	-	Róseo ou vermelho
	Taubock	+	Fluorescencia amarelo esverdeada
	Pew	-	Vermelha
	Cloreto de alumínio	+	Fluorescência verde-amarelo sob luz U.V.
	Cloreto férrico	-	Verde ou amarelo
Taninos	Gelatina	+	Precipitado
	Sais de ferro	-	Azul ou verde
Saponinas	Presença de espuma	+	Espuma persistente e abundante
Antraquinonas	Borntrager	-	Camada aquosa rósea

Dentro das classes dos flavonóides descrições da literatura sugerem que, em relação ao tipo de reação de caracterização, pode ser sugerida a subclasse de metabólitos presente no material analisado, sendo, por exemplo, a subclasse dos flavonóis caracterizada através das reações de Shinoda, resultando coloração em tom avermelhado ao final da reação de redução de compostos flavonoídicos ou de coloração amarela para as subclasses chalconas, isoflavonas e auronas (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; COSTA, 2002). Não foram verificadas as colorações tons de vermelho ou amarelo ao final da reação, ou seja, o resultado foi negativo nesta reação para as subclasses citadas.

A reação de Taubock caracteriza particularmente a presença de flavonóis, os quais reagem com ácido bórico e oxálico, resultando em fluorescência amarelo esverdeada sob luz ultravioleta. A formação de compostos borínicos pode ser explicada pela substituição na molécula de ácido bórico por dois radicais orgânicos (ZUANAZZI; MONTANHA, 2007; COSTA, 2002). O resultado da fluorescência amarelo-esverdeada sugere a presença de flavonóides da classe de flavonóis nas amostras avaliadas.

A reação de Pew se assemelha à reação de Shinoda; entretanto, a redução dos compostos ocorre em meio ácido, e o agente redutor é o zinco diferentemente do magnésio metálico utilizado na outra reação. Além disso, não apresenta especificidade a nenhuma das classes de flavonóides, embora a formação de coloração avermelhada, ao final da reação, seja também característica desta classe de substâncias (COSTA, 2002). O resultado foi considerado negativo para todas as classes de flavonóides nesta reação.

Compostos flavonoídicos podem ser caracterizados na reação do cloreto férrico em função da formação de complexos entre núcleo fundamental destes compostos e o íon férrico resultando em diferentes colorações ao final da reação, o que possibilita a caracterização das subclasses: verde (flavonas e suas iso formas), verde acastanhado (flavonóis e flavanonas) e amarela (chalconas) (COSTA, 2002). Não foram verificados nenhuma das colorações para caracterização de resultado positivo nesta reação.

A reação de complexação de flavonóides com alumínio, pode ser verificada pela reação do cloreto de alumínio que, como a reação de Taubock, resulta em intensificação da fluorescência amarela ou esverdeada quando exposta à luz ultravioleta no comprimento de onda de 365 nm (COSTA, 2002). Obteve-se como resultado a intensificação da coloração amarela sob luz ultravioleta, ou seja, o resultado foi positivo para a classe de flavonóis.

De acordo com a Tabela 2.3, observa-se que os resultados obtidos correspondem aos flavonóides da subclasse de flavonóis, que têm como dois dos seus vários componentes a rutina e a quercetina, sendo compostos investigados por outras metodologias de pesquisa apresentada por este trabalho.

A triagem fitoquímica preliminar revelou existência de metabólitos secundários de compostos dos grupos dos flavonóides, de taninos e de saponinas na droga vegetal e nos extratos obtidos por maceração empregados nos ensaios, o que sugere que os extratos obtidos podem apresentar potencial para inibir processos oxidativos. Os testes de identificação para antraquinonas não resultaram em reação colorimétrica necessária para a confirmação de sua presença; portanto, foi considerado como negativo para esta classe de compostos.

Estudos das potencialidades benéficas dos flavonóides proporcionados à saúde humana há tempos vem sendo realizados sendo descritas ações cardioprotetoras (COOK e SAMMAN, 1996; SCHRAMM e GERMAN, 1998), arterosclerose (GELEJSE et al, 1999), anticâncer (HERTOG, 1996; KURODA e HARA, 1999; YANG et al. 2001).

A presença de compostos fenólicos, como ácidos fenólicos e flavonóides, na droga vegetal e nos extratos obtidos, em especial nos macerados, M10 e M20, pode ser indicativa do potencial destas substâncias. A inibição dos processos da oxidação em certos sistemas deve-se à capacidade que essas moléculas possuem em doar átomos de hidrogênio e, portanto, inibir as reações em cadeia provocadas pelos radicais livres (HARTMAN e SHANKEL, 1990; DECKER, 1997; ARORA et al., 1998).

Muitos autores estudaram quimicamente a composição do exsudato em *Spondias* isolaram compostos como os elagitânicos, com potente ação adstringente, antibacteriana, moluscicida e antiviral (BASU, 1980; BASU e RAO, 1981; MARTÍNEZ et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2005).

Diante da escassez de estudos farmacognósticos com os frutos de *S. dulcis* foi necessário estabelecer parâmetros, tais como avaliação dos processos extrativos e avaliação fitoquímica das principais classes de metabólitos secundários, entre outras determinações (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; SIMÕES et al., 2002; FRANCO, 2001). É importante a correta avaliação dos extratos obtidos de frutos, possibilitando maior segurança quanto ao uso e, ainda, a avaliação do potencial do extrato a ser incorporado em formulações de acordo com a identificação da presença de substâncias potencialmente ativas e da atividade apresentada dos extratos, para obtenção da máxima eficácia do produto cosmético.

Os processos de prospecção fitoquímica são de extrema importância, pois permitem identificar quais classes de metabólitos secundários e/ou princípios ativos estão presentes em determinada amostra vegetal e, a partir daí, orientar a extração e/ou fracionamento de extratos para identificação e, quando necessário, o isolamento e quantificação de compostos de maior interesse.

2.2.5 Obtenção dos extratos

Os extratos vegetais são obtidos fundamentalmente pelo emprego de vegetais secos, sendo, portanto, uma etapa importante a obtenção da droga vegetal. Como o principal objetivo é retirar do vegetal diversas possibilidades dentro um universo químico extraordinariamente complexo, a seletividade exigida é fundamentada em dois principais fatores, as características do solvente e o processo extrativo aplicado (DÄR, 1981; VOIGT e BORNSCHEIN, 1982; PRISTA *et al.*, 1996; ANSEL *et al.*, 2000).

Dois sistemas solventes extratores (EtOH e EtOH 70°GL) foram utilizados em diferentes processos extrativos (maceração, turbólise, refluxo e percolação) como metodologias empregadas para obtenção dos extratos, partindo de proporções 1:10 e 2:10 m/v de polpa da fruta seca e pulverizada de *S. dulcis* e solvente. Obtiveram-se diferentes rendimentos, segundo os métodos de extração e o líquido extrator utilizado, calculados ao final da concentração de solução extrativa, como pode ser observado na Tabela 2.4.

Os extratos obtidos, após concentrados, foram armazenados em frasco de vidro âmbar fechado em temperatura de geladeira a 4°C.

A massa dos extratos secos obtidos estão na Tabela 2.4, sendo que o rendimento do extrato seco em relação à droga vegetal foi de 30,0% para os extratos M 10 e M 20 EtOH 70°GL, o que provavelmente deve-se ao fato do material vegetal (polpa de fruta) conter grande quantidade de substâncias solúveis em sistemas de alta polaridade, como os açúcares: glicose, frutose e sacarose (1,2 g ; 1,5 g e 3,1 g/100g) (FRANQUIN *et al.*, 2005).

Tabela 2.4 Rendimento dos extratos de *S. dulcis*, obtidos por diferentes processos extrativos utilizando diferentes solventes, em % de massa obtida de extrato seco/ 10 e 20 gramas de massa inicial de droga vegetal (m/m).

Amostra	Rendimento	% de massa	Rendimento	% de massa
	(g) extrato 1:10 (m/v)	extrato 1:10 (m/v)	(g) extrato 2:10 (m/v)	extrato 2:10 (m/v)
M EtOH	1,68	16,8	2,4	12
M EtOH 70°GL	3,06	30,6	6,0	30
T EtOH	1,38	13,8	1,74	8,7
T EtOH 70°GL	2,04	20,4	3,78	17,9
R EtOH	1,2	12	1,92	9,6
R EtOH 70°GL	3,3	33	5,04	25,2
P EtOH	1,98	19,8	3,48	17,4

M = maceração; T = turbólise; R = refluxo; P = percolação

A maceração além de ser uma metodologia farmacopéica, resultou em melhor rendimento do extrato 2: 10 quando comparado aos demais métodos e, pode ser considerado simples e eficiente. A Figura 2.5 mostra o aspecto dos extratos obtidos por maceração 2:10 em etanol 70° GL.

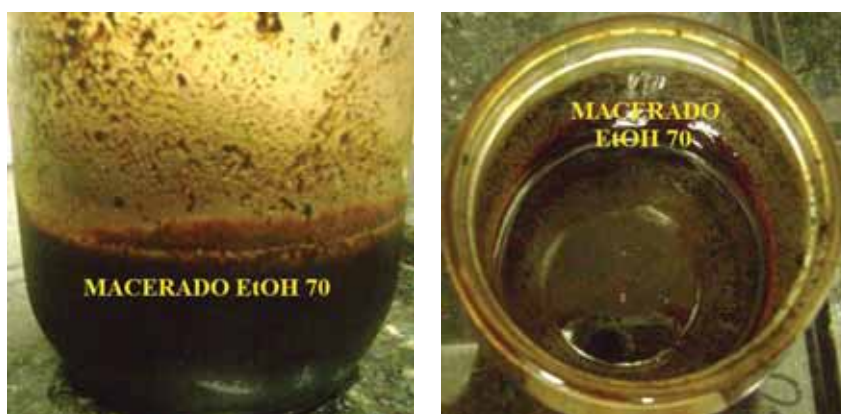


Figura 2.5 Extrato seco obtido por maceração 2:10 em etanol 70° GL.

2.2.6 Determinação do pH dos extratos obtidos

Diferentes ácidos orgânicos podem ocorrer em plantas, presentes de forma livre ou inclusos no citoplasma, representando diversos grupos de substâncias químicas, aromáticas ou não, formando sais ou outra forma estrutural de composto químico, o que pode caracterizar um determinado extrato quanto ao caráter ácido-base, permitindo, inclusive, a identificação e quantificação destes compostos em extratos vegetais.

Os extratos secos, obtidos por vários processos extrativos e diferentes tipos de solventes empregados, foram solubilizados em água recém deionizada na concentração de 10% e os valores do pH avaliados demonstraram leve acidez com resultados médios entre 2,5 e 2,9 para os extratos hidroalcolico e alcoólico, respectivamente. Foi utilizada água destilada como referencia, o pH da água foi de 5,45. Os resultados estão expressos na tabela 2.5.

Tabela 2.5 Determinação do pH obtido nas análises de diferentes extratos

Extrato analisado	Valores médios de pH
Hidroalcolico (70°GL)	2,52 ±0,05
Alcoólico	2,99 ±0,10

Os valores de pH verificados para os extratos alcoólicos e hidroalcoólicos podem estar diretamente relacionados à quantidade de ácidos presentes nos frutos e, consequentemente, caracterizando os extratos, podendo ser sugerido que o extrato obtido nas diferentes extrações, utilizando mistura hidroalcoólica, tem capacidade de solubilizar maior quantidade destas substâncias por ser mais polar que o alcoólico.

FRANQUIN e colaboradores (2005) descreveram que a fruta *S. dulcis* apresenta acidez comparável a do limão, onde a acidez da fruta com um pH baixo (2,6) e uma alta acidez titulável (1,3 g de ácido cítrico Eq. 100 g⁻¹ matéria fresca). Verificou que a fruta é rica em vitamina C (52,0 mg · 100 g⁻¹) e fenóis (349,5 mg de ácido gálico Eq. 100 g⁻¹) em estudo comparativo realizado com frutos obtidos nas Antilhas Francesas.

No mesmo ano, pesquisas realizadas na Universidade Sains na Malásia por Ishak *et al.* (2005) avaliaram e descreveram teores de compostos fenólicos totais e de vitamina C,

analisando três diferentes estágios de maturação do fruto, verificando entretanto, que os frutos maduros foram significativamente menos ácidos do que os verdes e os em estágio de maturidade (semi-maduros).

2.2.7 Cromatografia em camada delgada comparativa

Os resultados das análises por CCDe o cálculo do valor do fator de retenção (R_f) revelaram a presença de substâncias da classe de compostos fenólicos (flavonóides e ácidos fenólicos); rutina, quercetina e ácido clorogênico.

Para análise cromatográfica em camada delgada para detecção de flavonóides foram observadas nas placas, analisadas em câmara escura com luz ultravioleta (365 nm), manchas de fluorescência para os extratos testados, fluorescência azul para o ácido clorogênico e amarelo-alaranjado para os flavonóides. Os sistemas eluentes utilizados foram modificados de Wagner (1984) e o valor do fator de retenção (R_f) de manchas das amostras foi o mesmo que o valor calculado para os padrões de rutina (R_f 0,31) e ácido clorogênico (R_f 0,42) no experimento, utilizando o sistema eluente, acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (110:10:10:20, v/v/v/v) e, pelo sistema eluente acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético (145:2,5:2,5, v/v/v) foi possível observar a presença do padrão de quercetina (R_f 0,65). A Figura 2.6 ilustra fotografia obtida após revelação da cromatoplaça com padrões para ácidos fenólicos (gálico, tânico e clorogênico) e amostras de extratos 1:10 examinadas.

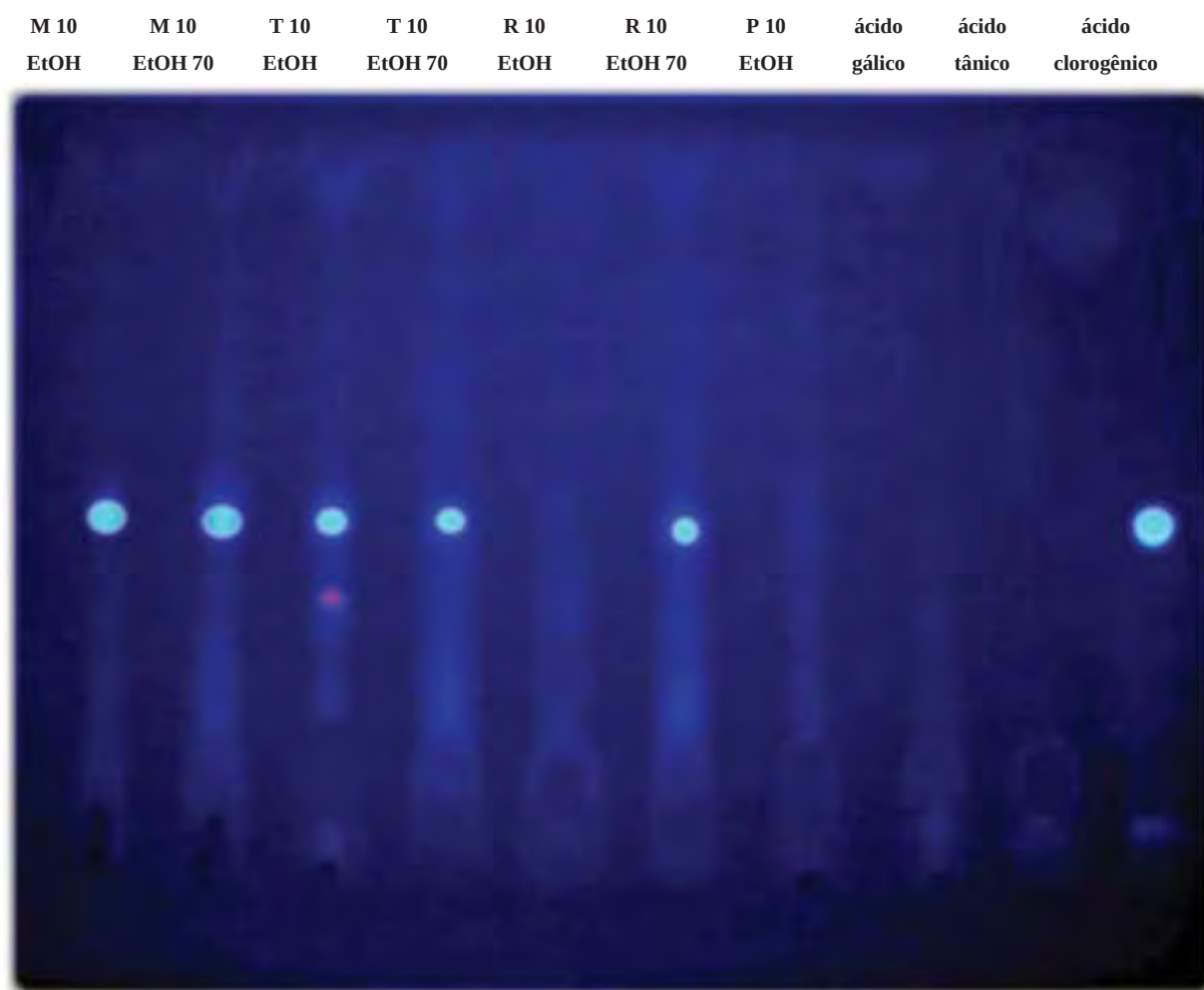


Figura 2.6. Cromatografia em camada delgada comparativa dos extratos 1:10 e padrões de ácidos fenólicos utilizando o sistema eluente, acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (110:10:10:20, v/v/v/v)

2.2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

Foram analisadas frações do extrato M20 EtOH 70° GL por CLAE-UV. As massas obtidas das frações do pré-tratamento foram: FR01 = 3,0 mg; FR02 = 2,0 mg; FR03 = 5,0 mg e FR04 = 2,0 mg.

O cromatograma da fração 03 obtido no comprimento de onda 325 nm, apresentou picos com tempo de retenção como os observados para os padrões – ácido clorogênico e rutina (Figura 2.7).

Nos cromatogramas apresentados para a fração 03 do extrato M20 EtOH 70° GL na Figura 2.7 foi possível identificar os picos relativos ao ácido clorogênico e à rutina, confirmando a presença de compostos fenólicos sendo um ácido fenólico e um flavonóide, resultados coerentes com os determinados na triagem química e CCD para o extrato obtido de polpa dos frutos *S. dulcis*. A identificação destes compostos, por CLAE em fase reversa, cujos utilizados foram misturas de água e acetonitrila, adicionadas de ácido acético, para evitar a ionização, demonstrou ser a metodologia apropriada na separação e identificação de compostos fenólicos; entretanto, existe necessidade de otimização das condições de pré tratamento para quantificação dos compostos no extrato obtidos dos frutos.

Dentre os ácidos fenólicos destacam-se os derivados do ácido caféico como o ácido clorogênico, os quais contribuem com a característica ácida que particularmente caracterizam o sabor do fruto. Devido a esta característica ácida, podem exibir facilidade de seu isolamento devido à solubilidade em solventes de alta polaridade, e seu estudo como marcadores taxonômicos nas futuras análises de atividade do extrato.

A incorporação em cosmético de extrato composto de fenólicos antioxidantes é indicativo que doenças causadas pelas reações oxidativas em sistemas biológicos possam ser retardados ou suprimidos pela ação antioxidante de *S. dulcis*.

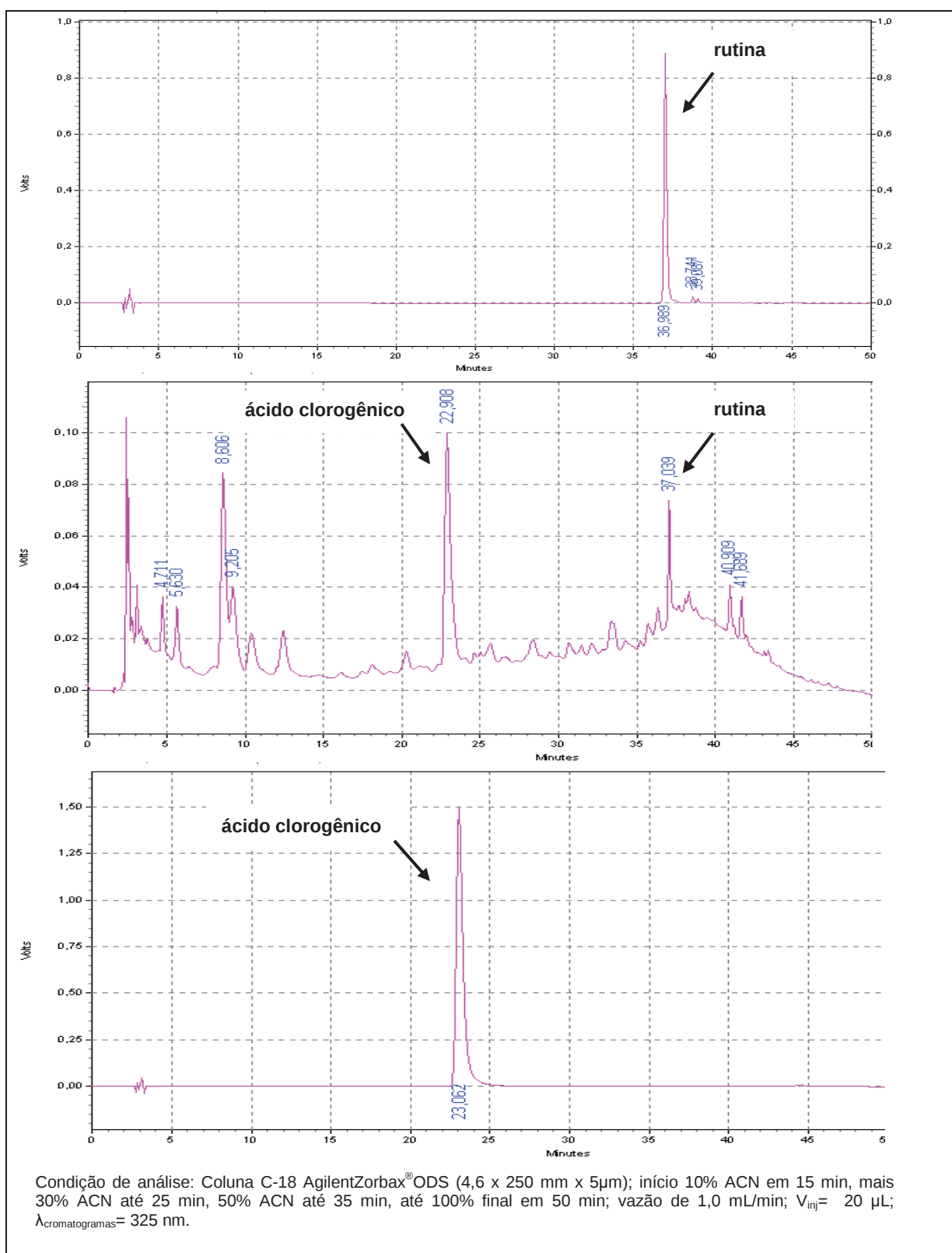


Figura 2.7 Cromatogramas (CLAE-UV) da fração 03 (ao centro) obtida do fracionamento e tratamento do extrato M20 EtOH 70° GL e padrões de rutina (acima) e ácido clorogênico (abaixo) analisados em comprimento de onda 325nm.

2.2.9 Perfil espectrofotométrico na região de luz ultravioleta-visível

Os extratos obtidos foram analisados em espectrofotômetro UV-visível U-2001 de marca Hitachi® e os valores de absorvância encontrados para dois dos extratos macerados 1:20, denominados etanólico e hidroalcoólico, são observados respectivamente nas Figuras 2.8 e 2.9.

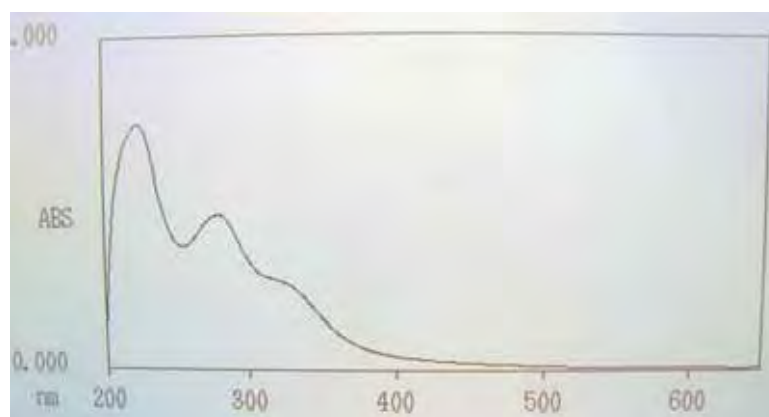


Figura 2.8 Perfil espectrofotométrico referente à análise do extrato etanólico M20 obtido a partir de polpa seca de fruto maduro.

O extrato etanólico M20 apresentou 2 bandas de absorção no UV-VIS com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de 220 nm (2,230 UA) e 279 nm (1,366 UA) mostrados na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Valores das bandas com respectiva absortividade obtida em análise espectrofotométrica de extrato M20 etanólico obtido a partir de polpa seca de fruto maduro.

Amostra 1	Bandas	Absorvância
Extrato etanólico M20 de polpa seca de fruto maduro	220,0 nm	2,230
	279,0 nm	1,366

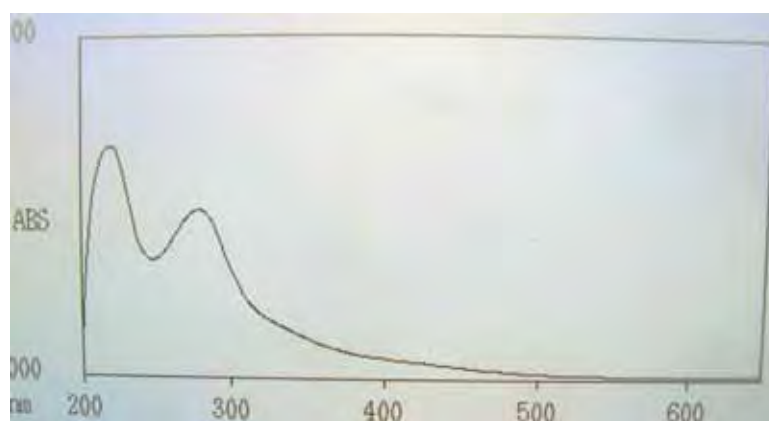


Figura 2.9 Perfil espectrofotométrico referente à análise de extrato hidroalcoólico M20 obtido a partir de polpa seca de fruto maduro.

O extrato hidroalcoólico M20 apresentou 2 bandas de absorção no UV-VIS com valores de $\lambda_{\text{máx}}$ de 224 nm (2,124 UA) e 279 nm (1,358 UA) mostrados na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 Valores das bandas com respectiva absortividade obtida em análise espectrométrica de extrato hidroalcoólico M20 obtido a partir de polpa seca de fruto maduro.

Amostra 2	Bandas	Absorvância
Extrato hidroalcoólico M20 de polpa seca de fruto maduro.	224,0 nm	2,124
	279,0 nm	1,358

As bandas observadas através da espectrofotometria no ultravioleta sugerem que existem nos extratos substâncias com grupamentos cromóforos (aromáticos, ex. fenóis) o que confirmaria a presença de substâncias fenólicas nos extratos, como detectados através dos ensaios de triagem fitoquímica, possivelmente sendo, ainda, responsáveis pela atividade antioxidante e fotoprotetora.

As bandas observadas para os extratos sugerem capacidade de absorver a luz ultravioleta, importante na função de fotoproteção prevenindo os danos causados a pele.

2.2.10 Estudo da ação antioxidante *in vitro*

Vários métodos foram desenvolvidos e padronizados para investigar a capacidade antioxidante de substâncias isoladas ou presentes em sistemas complexos, como extratos vegetais. Foram escolhidos para este trabalho métodos práticos, rápidos e eficazes para uma investigação preliminar dos extratos obtidos. A metodologia inicialmente empregada na verificação do potencial antioxidante dos extratos foi baseada na avaliação da atividade sequestrante de radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) (RUFINO *et al.*, 2007). O DPPH• é um radical estável muito utilizado nos estudos com antioxidantes, que apresenta máximo de absorção em 517 nm, sendo este o comprimento de onda utilizado para avaliar a ação das amostras.

Um segundo método de análise escolhido para a comprovação da atividade antioxidante foi de captura do radical livre ABTS•. Este método de investigação realizado na determinação da redução do radical catiônico de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico (ABTS•)), é a base para uma dos métodos mais sensíveis que tem sido aplicado para a determinação da capacidade antioxidante em diferentes sistemas.

2.2.10.1 Ensaio de autobiografia em CCD para avaliação da atividade antioxidante utilizando radical livre DPPH•

A cromatoplaça obtida e revelada com solução de DPPH• indicou a presença de substâncias (extrato M20 e suas frações obtidas no prétratamento, rutina, quercetina e ácido clorogênico-ACG) com poder antioxidante no extrato M20 EtOH70 e padrões analisados pela presença de manchas amarelas contra um fundo de cor púrpura do DPPH• indicando a atividade sequestradora, conforme mostrado na Figura 2.10.



Figura 2.10 Autobiografia da cromatoplaça de extrato M20 EtOH 70 e suas frações, rutina, quercetina e ácido clorogênico (ACG) revelados com solução de DPPH•

2.2.10.2 Avaliação da atividade antioxidante pela captura dos radicais livres DPPH• e ABTS

A metodologia científica utilizada na determinação da atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir da polpa seca de frutos de *S. dulcis* pela captura do radical livre DPPH• demonstrou ser o extrato hidroalcoólico obtido pelo processo de maceração, o mais ativo, apresentando o percentual de decréscimo da absorvância (A_{517}) do radical DPPH• mais expressiva e linear, em relação ao aumento da concentração do ácido ascórbico e rutina. Os extratos alcoólicos obtidos foram menos ativos e de percentual de inibição semelhantes. A partir do fracionamento das soluções extrativas utilizando o solvente orgânico acetato de etila foram testadas, entretanto, as frações orgânicas não apresentaram atividade antioxidante, o que possibilita afirmar que os ativos presentes no fruto têm característica polar.

As soluções extrativas obtidas com os 02 solventes, foram avaliadas quanto à capacidade antioxidante frente à variação do pH, naturalmente ácido e neutralizado. Os resultados demonstraram que a solução extrativa de pH ácido é mais ativa quando comparada

aos resultados obtidos com a neutralização, o que sugere a presença de ácidos antioxidantes. Estes dados foram importantes pelo fato de que as soluções extrativas contendo água, para serem concentradas usam processo de liofilização e necessitam para tanto ser neutralizadas ou acrescidas de adjuvante para secagem de forma eficaz. Diante disto, podem ser desenvolvidos processos de secagem utilizando adjuvante como amido e/ou maltodextrina adicionados às soluções extrativas aquosas.

Embora o ácido ascórbico (vitamina C) seja considerado por alguns autores como maior contribuinte na atividade antioxidante de alguns frutos e, possivelmente, este ácido ou ainda, outros, como o clorogênico e o cítrico serem descritos na literatura como constituintes dos frutos analisados, estudos da concentração de compostos fenólicos foram realizados para confirmar que a maior contribuição na atividade antioxidante total do fruto é devido à composição destes compostos fitoquímicos, sendo ainda possível demonstrar correlação entre estes e a atividade antioxidante.

O método DPPH• para determinação da capacidade antioxidante é um dos mais utilizados por ser um método prático, simples e rápido, muito conveniente para realização de “*screening*” de grande número de amostras com diferentes polaridades; entretanto foi efetuada outra metodologia, ABTS, com a intenção de confirmar e validar os dados obtidos por esta metodologia.

A determinação de antioxidantes realizada pelo método de captura do radical de DPPH•, um radical livre estável à temperatura ambiente e que produz cor violeta em solução alcoólica, é reduzido na presença de moléculas antioxidantes, o que promove queda da intensidade da coloração violeta, quantificada quando analisada em comprimento de onda 517 nm como mostra Figura 2.11.

Os resultados da redução do DPPH• pelos extratos hidroalcoólicos e etanólicos estão reportados nas Tabelas 2.8 (M10) e 2.9 (M20). Como amostra de referência para a verificação dos valores de redução da absorvância foi utilizado como branco o DPPH• com o solvente utilizado para obtenção das diluições dos extratos ensaiados e, como padrão positivo, quercetina e ácido ascórbico.

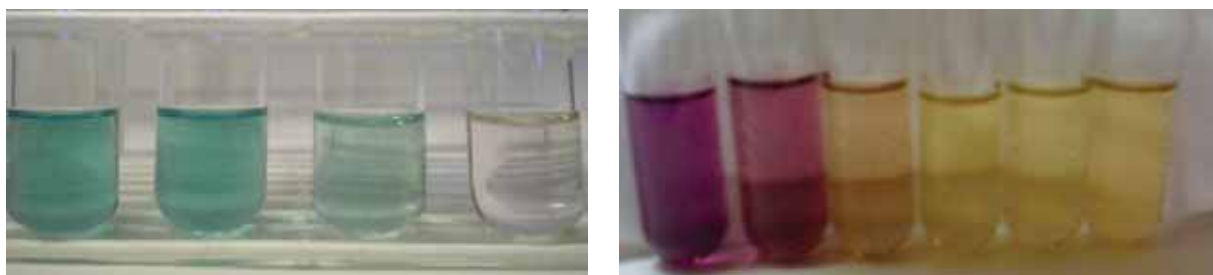


Figura 2.11 Resultado visual da redução dos radicais ABTS• (esquerda) e DPPH• (direita) na ausência e na presença de antioxidantes presentes nos extratos.

O ácido ascórbico apresenta um alto poder antioxidante, sendo que a partir de 0,001mg/mL esse poder é acentuado, atingindo sua IC_{50} entre esse valor e 0,002 mg/mL (1-2 μ g/mL). Seguindo o modelo referenciado por RUFINO *et al.*, 2007, foi utilizado o ácido ascórbico, como padrão de redução do DPPH•, para possíveis comparações com os resultados dos extratos de *Spondia dulcis*.

Os valores obtidos na análise de inibição do radical ABTS• mesmo não coincidindo com os valores analisados na redução do DPPH•, permitem a verificação de consistência da atividade antioxidante do extrato M20 EtOH 70°GL, uma vez que em ambos os testes foi verificada a maior capacidade inibitória com menor concentração entre todos os extratos avaliados.

A rutina apresenta um alto poder antioxidante, atingindo sua IC_{50} entre 3,1 e 3,5 μ g/mL. Seguindo o modelo referenciado por RUFINO *et al.*, 2007, foi utilizada a rutina como padrão, de redução do ABTS•, para possíveis comparações com os resultados dos extratos de *Spondia dulcis*.

Tabela 2.8 Resultado da redução dos radicais DPPH• e ABTS• pelos extratos de *S. dulcis* obtidos por diferentes processos extrativos 1:10 (m/v) em diferentes solventes

Amostra	IC ₅₀ DPPH• (mg/mL) ^a	Correção IC ₅₀ diluição µg/mL ^b	IC ₅₀ ABTS• (mg/mL) ^a	Correção IC ₅₀ diluição µg/mL ^b
M 10 EtOH	29,82±0,07	745,5	50,3 ±0,30	503,0
M 10 EtOH 70	26,06 ±0,06	651,5	34,63 ±0,28	346,3
T 10 EtOH	31,78 ±0,13	794,5	43,03 ±0,14	430,3
T 10 EtOH 70	29,16 ±0,14	729,0	39,09 ±0,10	390,1
R 10 EtOH	37,07 ±0,08	926,75	50,68 ±0,34	506,8
R 10 EtOH 70	29,5 ±0,11	737,5	39,97 ±0,11	399,7
P 10 EtOH	37,08 ±0,08	927,0	42,55 ±0,13	425,5

^a concentração do extrato em mg/mL na solução de partida

^b concentração real em µg/mL dos extratos na reação com os respectivos radicais DPPH• e ABTS• no ensaio

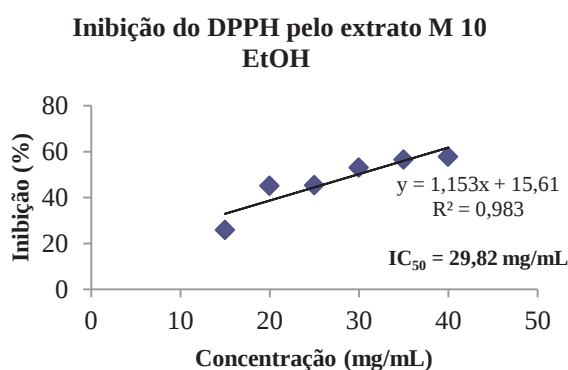


Gráfico 2.1 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato M10 EtOH

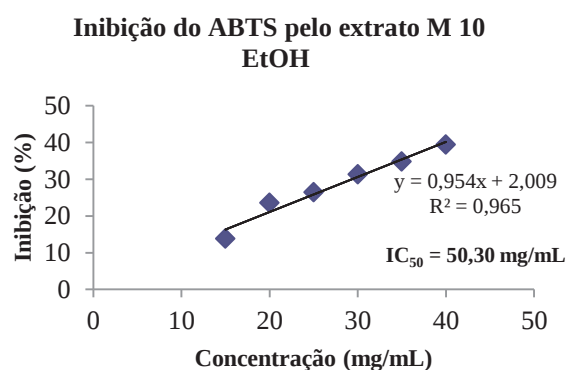


Gráfico 2.2 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato M10 EtOH

Inibição DPPH pelo extrato M 10 EtOH 70

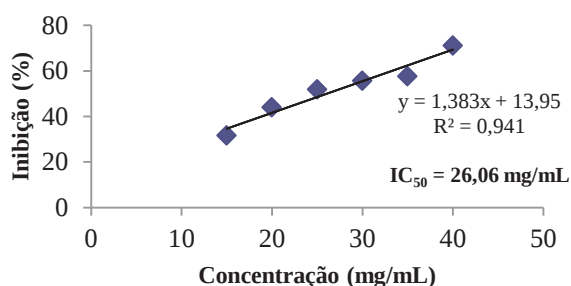


Gráfico 2.3 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato M10 EtOH 70°GL

Inibição ABTS pelo extrato M 10 EtOH 70

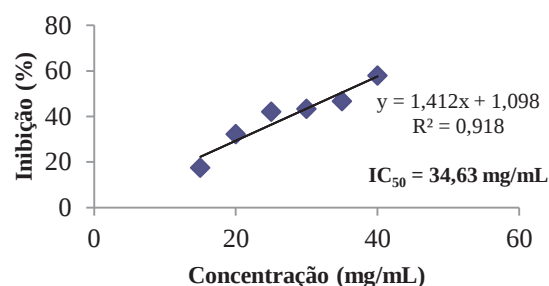


Gráfico 2.4 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato M10 EtOH 70°GL

Inibição do DPPH pelo extrato T 10 EtOH

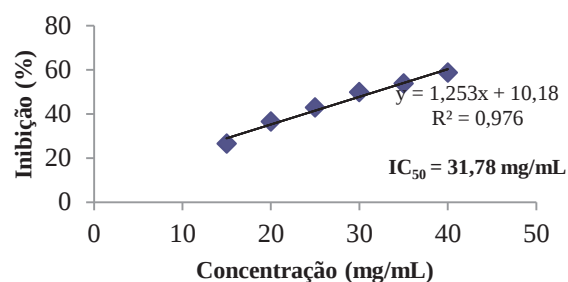


Gráfico 2.5 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato T10 EtOH

Inibição do ABTS pelo extrato T 10 EtOH

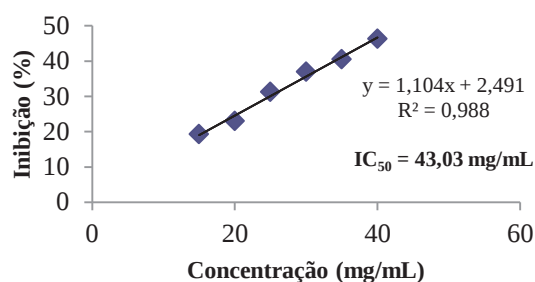


Gráfico 2.6 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato T10 EtOH

Inibição do DPPH pelo extrato T 10 EtOH 70

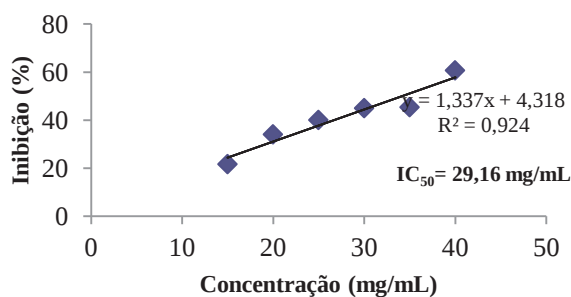


Gráfico 2.7 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato T10 EtOH 70°GL

Inibição do ABTS pelo extrato T 10 EtOH 70

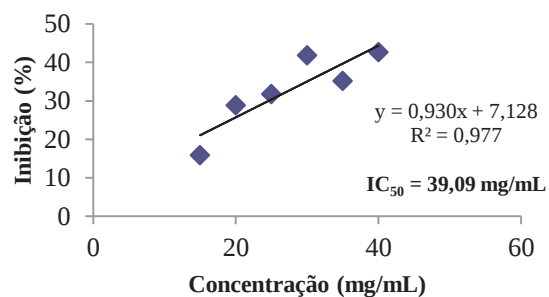


Gráfico 2.8 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato T10 EtOH 70°GL

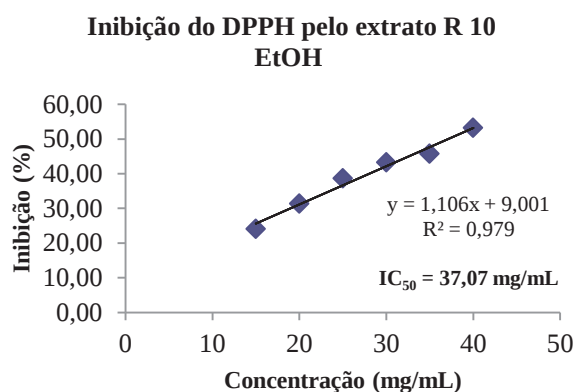


Gráfico 2.9 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato R10 EtOH

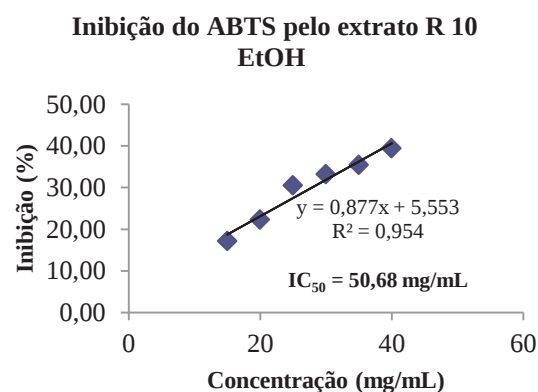


Gráfico 2.10 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato R10 EtOH

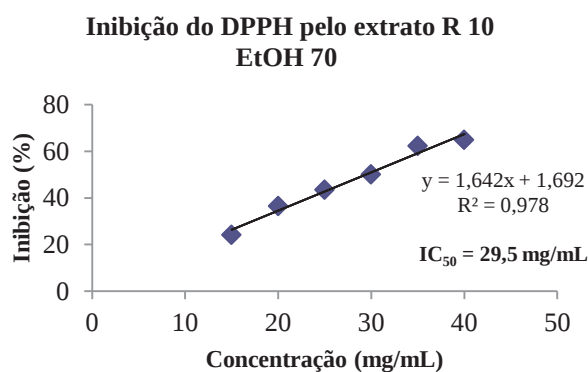


Gráfico 2.11 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato R10 EtOH 70°GL

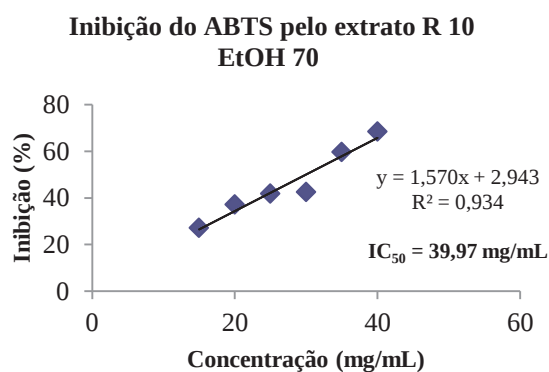


Gráfico 2.12 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato R10 EtOH 70°GL

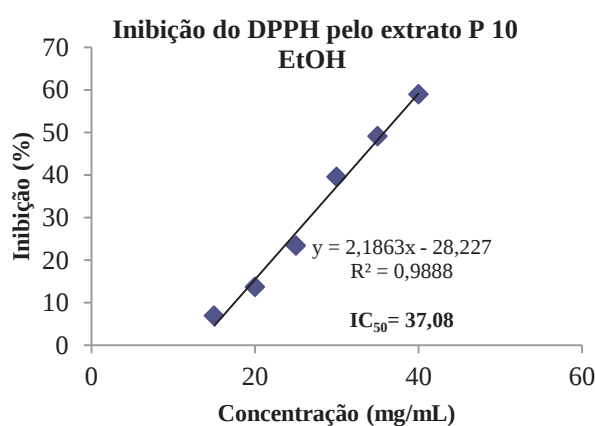


Gráfico 2.13 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato P10 EtOH

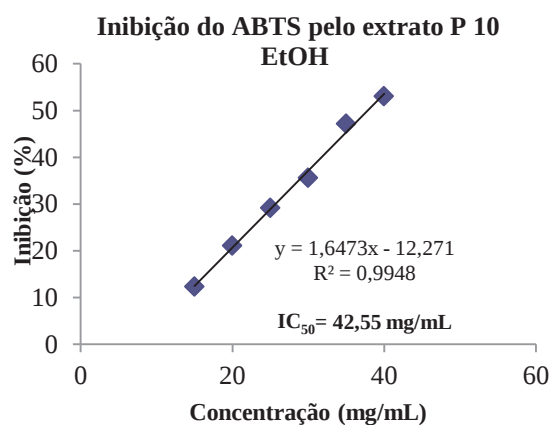


Gráfico 2.14 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato P10 EtOH

Tabela 2.9 Resultado da redução dos radicais DPPH• e ABTS• pelos extratos de *S. dulcis* obtidos por diferentes processos extrativos 2:10 (m/v) em diferentes solventes

Amostra	IC ₅₀ DPPH• (mg/mL) ^a	Correção IC ₅₀ diluição µg/mL ^b	IC ₅₀ ABTS• (mg/mL) ^a	Correção IC ₅₀ diluição µg/mL ^b
M 20 EtOH	28,85 ± 0,07	721,25	38,24 ± 0,41	382,4
M 20 EtOH 70	24,97 ± 0,34	624,25	29,23 ± 0,10	292,3
T 20 EtOH	30,07 ± 0,35	751,75	36,72 ± 0,20	367,2
T 20 EtOH 70	25,14 ± 0,15	628,50	30,15 ± 0,22	301,5
R 20 EtOH	30,77 ± 0,37	769,25	43,70 ± 0,30	437,0
R 20 EtOH 70	25,47 ± 0,40	636,75	31,21 ± 0,33	312,1
P 20 EtOH	28,19 ± 0,27	704,75	40,98 ± 0,07	409,8

^a concentração dos extratos em mg/mL na solução de partida

^b concentração real em µg/mL dos extratos na reação com os respectivos radicais DPPH• e ABTS• no ensaio

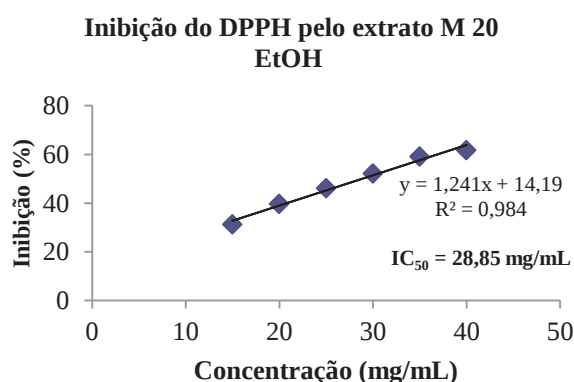


Gráfico 2.15 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato M20 EtOH

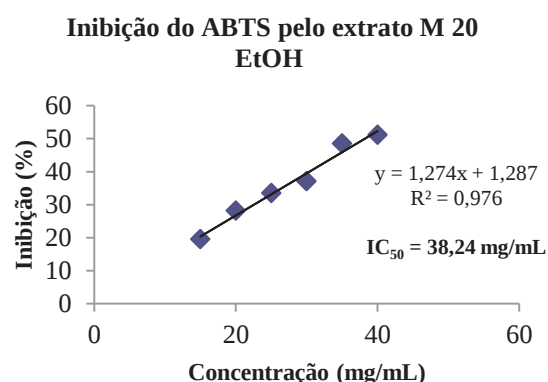


Gráfico 2.16 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato M20 EtOH

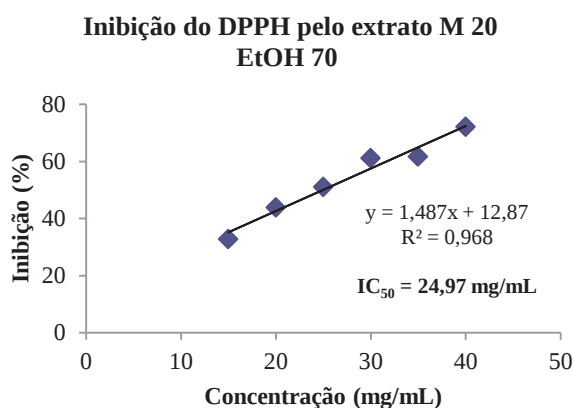


Gráfico 2.17 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato M20 EtOH 70°GL

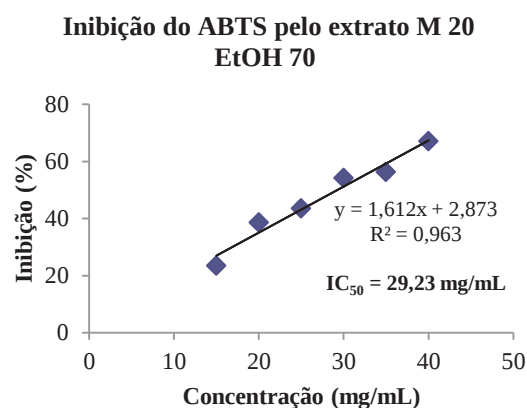


Gráfico 2.18 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato M20 EtOH 70°GL

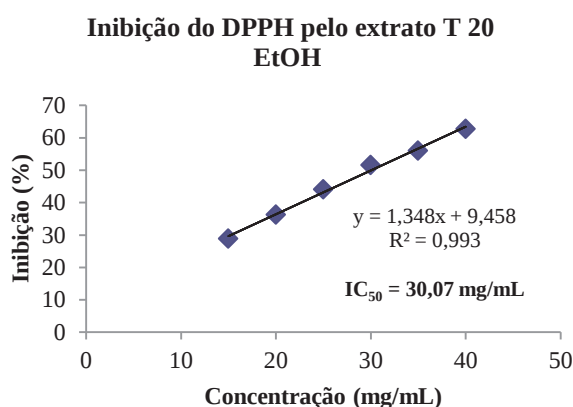


Gráfico 2.19 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato T20 EtOH

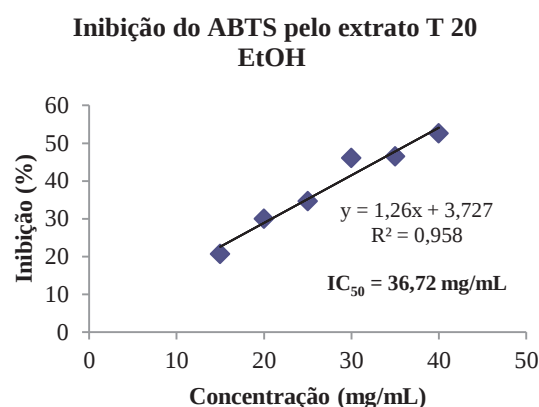


Gráfico 2.20 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato T20 EtOH

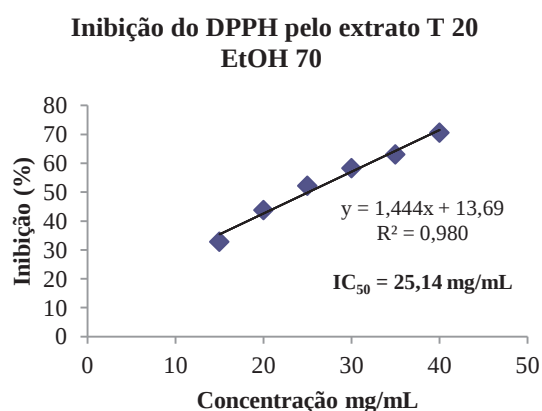


Gráfico 2.21 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato T20 EtOH 70°GL

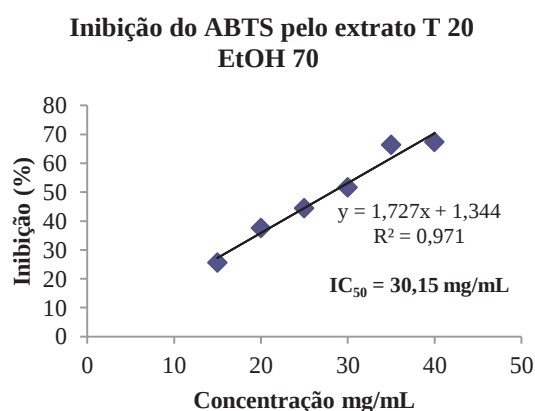


Gráfico 2.22 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato T20 EtOH 70°GL

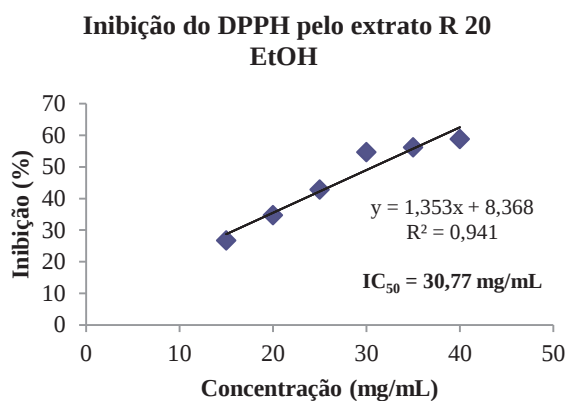


Gráfico 2.23 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato R20 EtOH

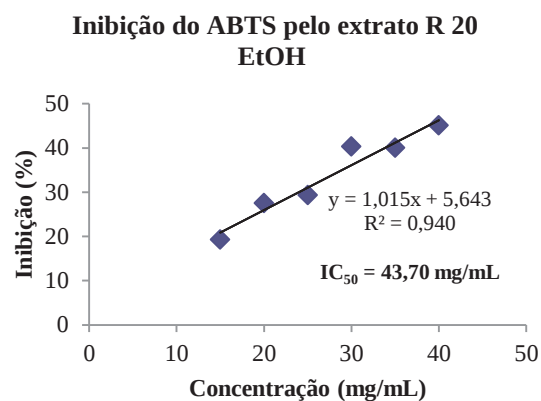


Gráfico 2.24 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato R20 EtOH

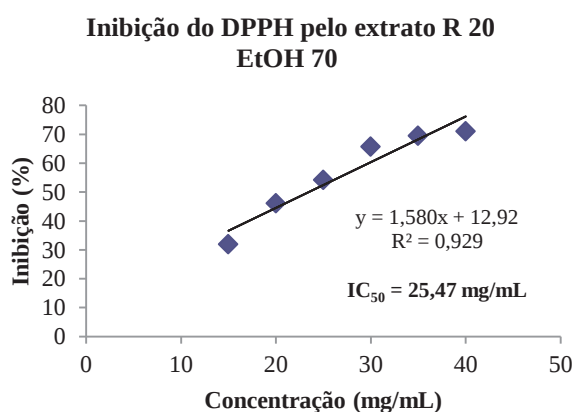


Gráfico 2.25 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato R20 EtOH 70°GL

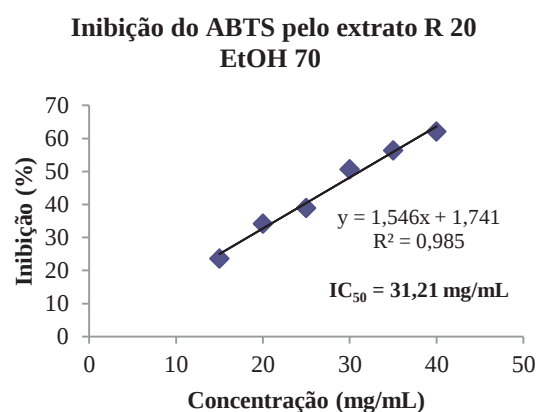


Gráfico 2.26 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato R20 EtOH 70°GL

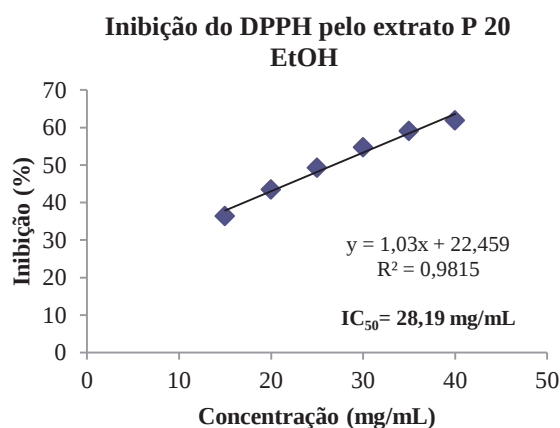


Gráfico 2.27 Inibição (%) do radical DPPH• pelo extrato P20 EtOH

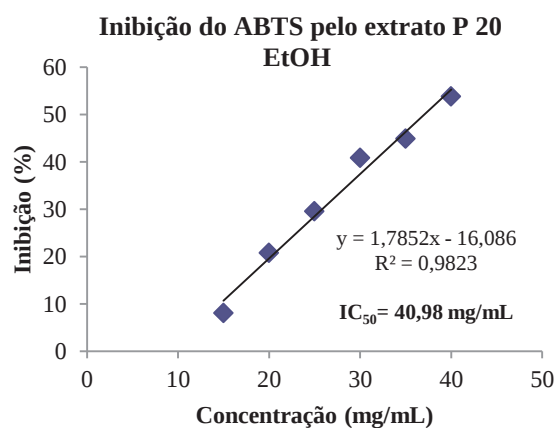


Gráfico 2.28 Inibição (%) do radical ABTS• pelo extrato P20 EtOH

Os resultados obtidos, quando comparados aos valores de IC_{50} obtidos em relação ao padrão de ácido ascórbico, são diferentes e superiores, uma vez que o padrão é um dos mais potentes antioxidantes existentes e que foi utilizado de forma pura, quando comparado aos extratos apresentados como misturas complexas, não sendo possível, sem a purificação e/ou isolamento adequado, conhecer a real concentração dos ativos antioxidantes.

IHA *et al.*, 2008 relatam que obtiveram resultado de IC_{50} igual 0,15 mg/mL para extrato obtido de *Psidium guajava* L. (goiaba), mostrando superioridade antioxidante aos valores encontrados para os extratos obtidos a partir da *Spondia dulcis*.

2.2.11 Determinações do teor de fenólicos totais

As leituras de absorvância da solução padrão de ácido gálico, de rutina e dos extratos foram realizadas em triplicata, portanto, os resultados apresentados são referentes à média dos valores das absorvâncias, para cada concentração (em $\mu\text{g/mL}$) utilizada nas leituras.

A Figura 2.12 apresenta as curvas analíticas construídas com diferentes concentrações das soluções padrão de ácido gálico e de rutina. Nas Tabelas 2.10 a 2.11 são demonstrados os valores obtidos nos ensaios de quantificação de compostos fenólicos totais equivalentes a ácido gálico e rutina.

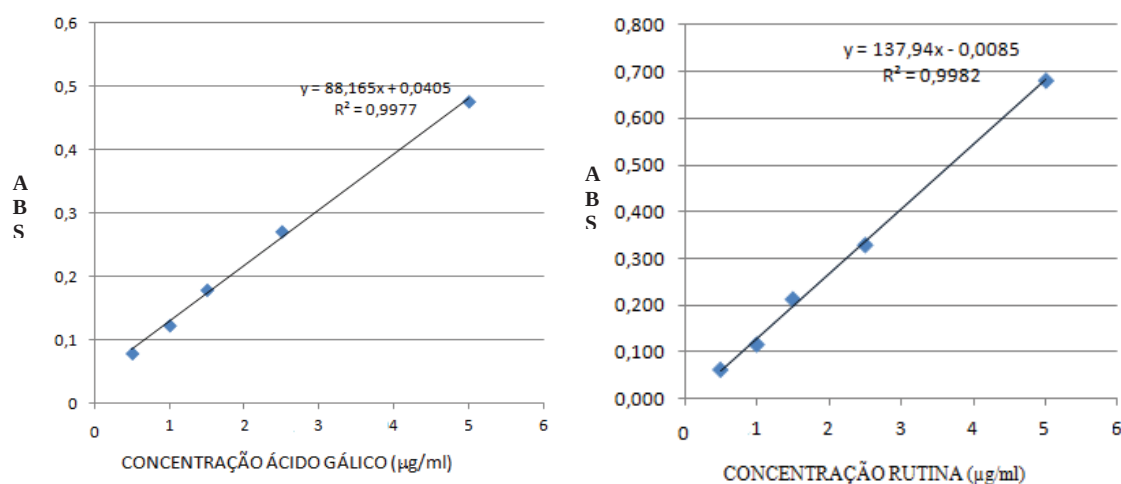


Figura 2.12 Curvas analíticas dos padrões de ácido gálico e rutina

Tabela 2.10 Teor de fenólicos totais equivalente à ácido gálico em µg /100 mg de extrato

Extrato (m/v)	1:10	1:20
M EtOH	178,21	179,48
M EtOH 70° GL	190,41	219,90
T EtOH	168,21	175,01
T EtOH 70° GL	202,94	205,17
R EtOH	148,49	193,74
R EtOH 70° GL	164,65	202,44
P EtOH	91,17	141,93

Tabela 2.11 Teor de fenólicos totais equivalente à rutina em µg / 100 mg de extrato

Extrato (m/v)	1:10	1:20
M EtOH	230,70	258,32
M EtOH 70° GL	342,00	390,26
T EtOH	286,58	287,69
T EtOH 70° GL	296,94	365,13
R EtOH	233,49	263,64
R EtOH 70° GL	237,68	268,51
P EtOH	161,12	179,48

Pesquisadores da Universidade Sains na Malásia (ISHAK *et al.*, 2005), determinaram os teores de fenólicos totais segundo o método descrito por Kaur e Kapoor (2002), para frutas *in natura* em três diferentes estágios de maturação e verificaram que a quantidade de fenólicos totais diminuiu com a maturidade, além de frutos maduros serem significativamente menos ácidos do que os verdes e verdes maduros e a quantidade de vitamina C ter aumentado. Os resultados foram expressos em microgramas de catecol/100 mg de compostos fenólicos totais (686, 338,171 µg/100 mg, respectivamente) e de Vitamina C (4,65-5,50-5,86 µg/100 mg).

LUXIMON-RAMMA *et al.* (2003) quantificaram no fruto fresco de *Spondias dulcis* (Hogplum) $105,0 \pm 43$ µg ácido gálico 100 mg⁻¹; $18,3 \pm 7$ µg quercetina 100 mg⁻¹; $16,7 \pm 13$ µg cloridrato de cianidina 100 mg⁻¹; $24,4 \pm 0$ µg ácido ascórbico 100 mg⁻¹, $0,6 \pm 1$ µmol Trolox 100 mg⁻¹ e $0,7 \pm 0$ µmol Fe(II) 100 mg⁻¹.

O elevado teor de fenólicos obtidos nas análises do extrato M20 EtOH 70 é próximo ao verificado por Franquin e colaboradores (2005), teor de fenólicos (~ 350 µg de ácido gálico Eq · 100 mg⁻¹), um nível mais elevado do que aqueles conhecidos para frutos ricos nestas substâncias como maçãs, por exemplo, e uvas vermelhas. Estes valores estão em desacordo completo com outras já publicados (frutas verde ~ 4 mg de ácido gálico Eq · 100 g⁻¹ de polpa), entretanto, Sacramento *et al.* (2007), Corthout *et al.* (1991) e Leon e Shaw (1990) relataram a presença de antivirais ésteres fenólicos do ácido caféico em uma espécie relacionada, *Spondias mombin* L.

Os teores de compostos bioativos, ácido ascórbico, fenólicos totais, flavonóides e carotenóides totais, foram determinados em polpas obtidas a partir de 18 frutas tropicais adquiridas no Brasil por BARRETO e colaboradores (2009). O grupo descreve a caixa-manga como fruto de elevada atividade anti-radical livre, avaliada pelo método ABTS. A atividade antioxidante mostrou alta correlação com compostos fenólicos totais e flavonóides; porém, a correlação encontrada foi muito pequena para ácido ascórbico e carotenóides totais (BARRETO *et al.*, 2009).

Lim *et al.* (2007) avaliaram o potencial antioxidante de nove frutos tropicais, dentre os quais o caixa-manga, que apresentou capacidade de inibir em 50% a atividade antioxidante do radical DPPH• na concentração de $9,9 \pm 1,9$ mg/mL, entretanto, não especifica exatamente qual a quantidade de material vegetal utilizado, se foi utilizado na forma *in natura* ou seca. O processo extrativo e o sistema solvente utilizado diferem bastante, entre outros detalhes, dos

empregados por nosso grupo. Os valores obtidos para os extratos obtidos em nossos experimentos com fruto seco são bastante superiores ao encontrado e relatados pelos pesquisadores malasianos.

Extratos etanólicos foram obtidos por maceração do fruto seco de caixa-manga, além de outras 10 frutas populares e investigadas por pesquisadores em Bangladesh quanto ao conteúdo de polifenóis, antioxidantes, anti-amilase, anti-glucosidase, e atividade anti-histamínica. O peso do extrato seco foi expresso em porcentagem do peso seco (% p) do pó em relação à massa seca de *S. dulcis* foi de 3,6% (peso seco), *S.dulcis* $261 \pm 0,4$ µg total fenólicos contido equivalente à ácido gálico/100 mg extrato e $91,5 \pm 0,3$ (%atividade do radical DPPH•) 0,2mg/mL, *S. dulcis* (hog-plum) inibiu completamente a atividade da α-glucosidase (HOSSAIN, 2008)

2.2.12 Determinação do teor de flavonóides totais

Foi identificada a presença de flavonóides na triagem fitoquímica, CCDC e CLAE nos extratos obtidos a partir da polpa de *S. dulcis*. A avaliação do teor de fenólicos totais não especifica uma única classe de substâncias fenólicas, uma vez que podem ser analisados por esta metodologia ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, taninos e flavonóides. O conteúdo total de flavonóides pode ser determinado por método colorimétrico usando cloreto de alumínio formando o complexo que pode ser determinado especificamente em 430 nm.

O teor de flavonóides no extrato M20 EtOH 70° GL foi calculado a partir da equação da reta obtida pela curva analítica do padrão de rutina. Foi determinado para o extrato o valor igual a $149,6 \pm 0,3$ µg de flavonóide equivalente à rutina por 100 mg de extrato correspondendo a um teor aproximado de 0,15% de rutina.

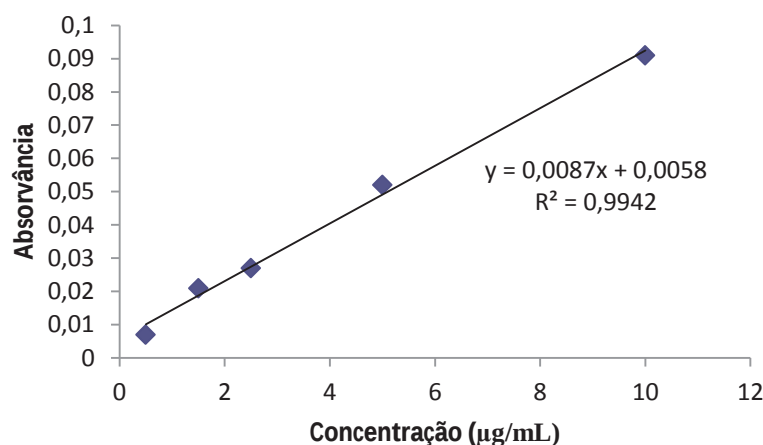


Gráfico 2.29 Curva analítica da solução padrão de rutina

2.2.13 Avaliação da citotoxicidade dos macerados obtidos de *S. dulcis*

A Figura 2.13 demonstra os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade dos extratos M10 EtOH 70° GL e M20 EtOH 70°GL. Diante dos resultados foi possível observar que nenhum dos extratos analisados neste ensaio apresentou efeito citotóxico nas concentrações analisadas. As curvas de viabilidade celular apresentaram porcentagem superior a 50 (IC₅₀), portanto, através dos resultados fornecidos pelo ensaio, é possível afirmar que os extratos não apresentaram toxicidade frente às células de macrófagos. É importante ressaltar que até o momento não existe dados publicados relacionados à citotoxicidade de extratos obtidos de *S. dulcis*.

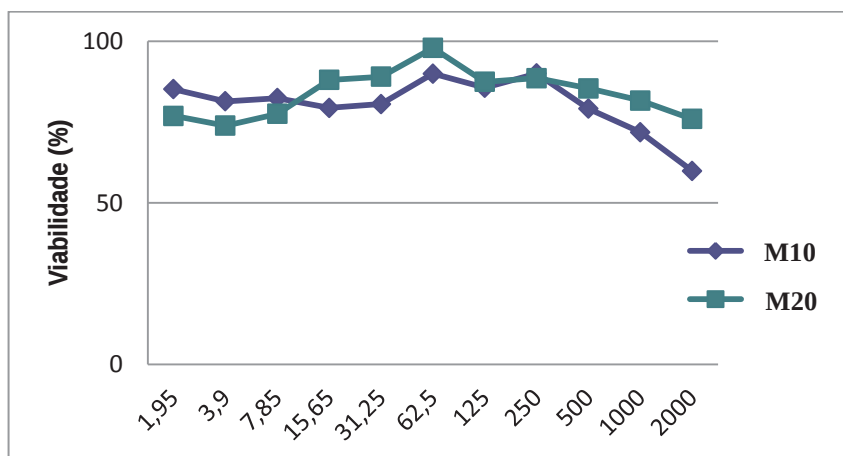


Figura 2.13. Avaliação da citotoxicidade dos extratos macerados com EtOH 70°GL.

2.2.14 Avaliação da mutagenicidade dos diferentes extratos obtidos de *S. dulcis* através do teste de micronúcleo

Segundo o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os riscos a serem avaliados para ingredientes de produtos cosméticos são do tipo irritativo, alergênico e sistêmico, este último, essencialmente por meio de sua absorção oral ou permeação. Na área cosmética, os animais podem ser utilizados para avaliar todos os riscos potenciais envolvidos, seja irritação, alergia ou efeitos sistêmicos a curto e longo prazo (ANVISA, 2011).

É importante ressaltar que os extratos obtidos de *Spondia dulcis* são os principais ingredientes ativos do cosmético e que, para todos os demais componentes da formulação já existem estudos relacionados à toxicidade e, portanto, não requerem avaliação. Os ingredientes de produtos cosméticos podem ser substâncias químicas, extratos de origem botânica ou animal, ou associação de ingredientes e, desta forma, devem fornecer dados básicos úteis para qualquer ingrediente que inclui, entre outros estudos, o estudo do potencial de efeito sistêmico, que cita o teste de mutagenicidade (ANVISA, 2011).

A escolha do teste de micronúcleo foi baseada na facilidade e rapidez com que o teste pode ser realizado, pois este ensaio utiliza sangue periférico de camundongos ao invés de células de medula óssea, por isso, não requer processamento de material biológico.

Esta técnica para análise de células micronucleadas de sangue periférico de camundongos foi descrita por Hayashi *et al.*, (1990) e utiliza lâminas précoradas com um corante fluorescente laranja de acridina (acridine orange). Este corante permite a identificação de reticulócitos jovens (eritrócitos policromáticos) por proporcionar coloração amarela ao DNA e vermelha ao RNA e a visualização destas células tornam-se facilitadas pois os reticulócitos são ricos em RNA em nível de citoplasma corando-se em vermelho e os micronúcleos que foram por ventura formados por alteração no DNA e permaneceram no citoplasma onde não deveria existir nenhum material genético se coram em amarelo e tornam-se muito evidentes nestas células. A Figura 2.14 mostra reticulócitos normais e reticulócitos micronucleado.

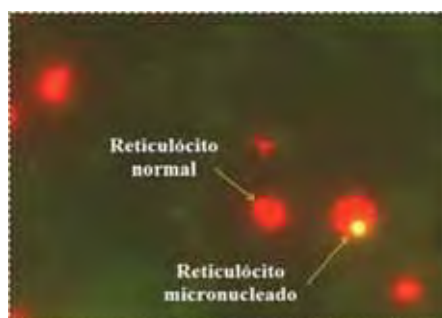


Figura 2.14 Reticulócito normal e reticulócito micronucleado (coloração: laranja de acridina)

O potencial mutagênico dos extratos de *S. dulcis* foi avaliado através do teste de micronúcleo em sangue periférico de camundongos. Após a análise citológica das lâminas, foram calculadas as frequências médias de células micronucleadas, bem como os desvios padrão para cada um dos grupos de tratamento. A partir destes resultados foi aplicado um teste de Análise de Variância (ANOVA). Nos casos em que $p < 0,05$, as médias de tratamentos foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico PRISMA. Os resultados podem ser visualizados na tabela 2.12.

Tabela 2.12 Número de células micronucleadas por animal, média e desvio padrão (SD)

Tratamentos (mg/Kg p.c.)	Animais										Média	SD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Controle +	44	31	53	49	22	47	66	68	38	52	47*	14,29
Controle –	2	0	1	2	1	0	1	1	0	0	0,8	0,78
M 10												
500	2	0	0	1	2	0	1	0	2	1	0,9	0,87
1500	2	1	1	1	1	0	1	2	0	1	1,0	0,66
2500	3	0	1	3	0	2	1	2	2	1	1,5	1,08
M 20												
500	2	1	0	1	1	0	1	1	2	1	1,0	0,66
1500	2	0	1	1	2	1	3	0	1	1	1,2	0,91
2500	2	2	1	1	2	2	1	3	1	2	1,7	0,67
T 20												
500	0	2	1	1	1	1	2	0	1	1	1,0	0,66
1500	3	1	0	1	2	0	1	1	2	2	1,3	0,94
2500	0	3	2	3	2	0	2	1	3	2	1,8	1,13
R 20												
500	1	3	0	3	0	2	1	3	2	0	1,5	1,26
1500	2	2	3	0	2	3	2	2	1	3	2,0	0,94
2500	3	2	3	2	3	4	3	3	2	2	2,7	0,67

Controle + (Controle Positivo): ciclofosfamida 50 mg/kg p.c.; Controle – (Controle Negativo): água;
 * $p \leq 0,001$.

Nográfico 2.30 estão representados os dados obtidos da formação de micronúcleos em animais expostos ao quimioterápico clássico ciclofosfamida. Como já esperado, os resultados corroboram com os dados da literatura, demonstrando o efeito mutagênico deste fármaco, expresso pelo aumento da incidência de micronúcleos, quando comparado aos grupos controle negativo e controle branco (* $p < 0,05$).

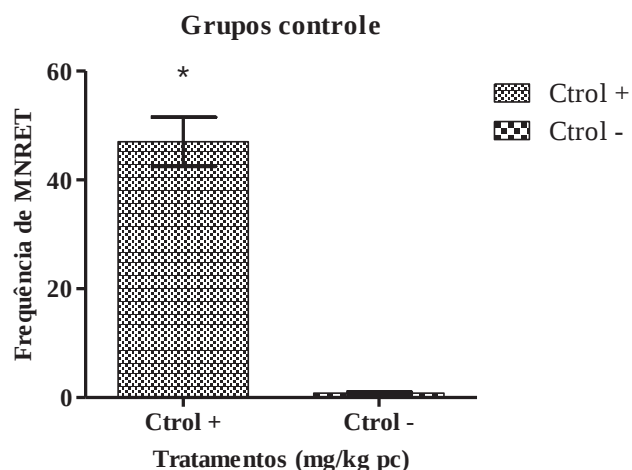


Gráfico 2.30 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com ciclofosfamida (controle positivo) e água (controle negativo). * $p < 0,05$

No gráfico 2.31 os resultados demonstram que o extrato *S. dulcis* obtido pelo processo de maceração 1:10 (m/v) em etanol 70° GL, nas diferentes concentrações administradas (500, 1500 e 2500 mg/kg) não induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de camundongos, quando comparado ao controle negativo e positivo.

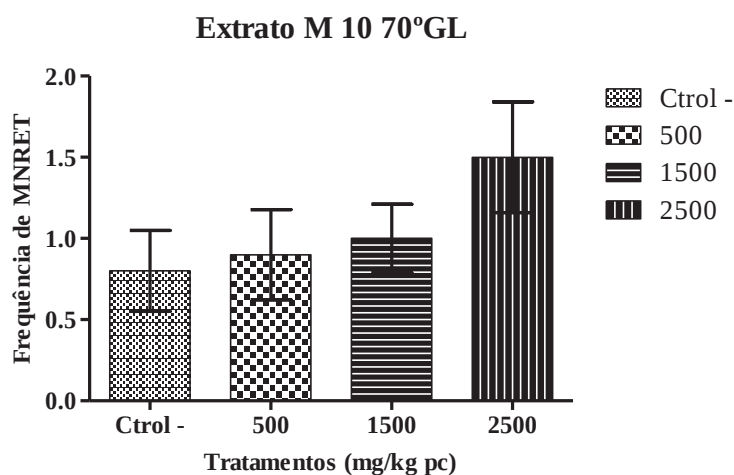


Gráfico 2.31 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por maceração 1:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70°GL.

Conforme mostrado no gráfico 2.32, os resultados indicaram que o extrato de *S. dulcis* obtido pelo processo de maceração 2:10 (m/v) em etanol 70° GL, nas diferentes concentrações administradas (500, 1500 e 2500 mg/kg) não apresentou significância estatística quando

comparado ao controle negativo e positivo, da mesma forma, que nenhuma diferença estatística foi detectada entre as concentrações administradas aos animais.

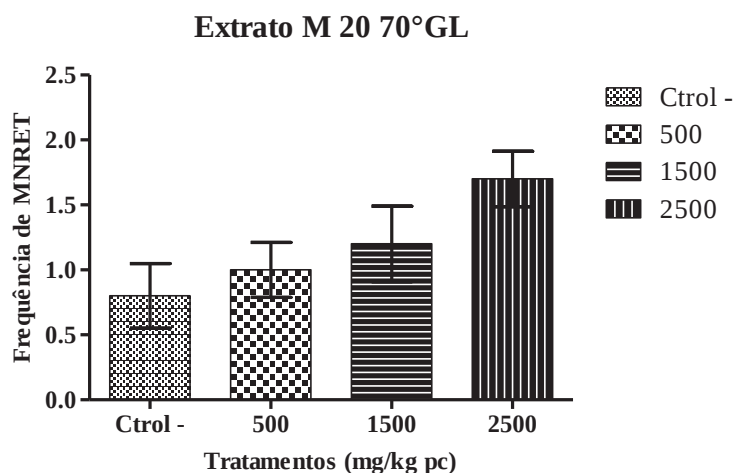


Gráfico 2.32. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por maceração 2:10(m/v) de droga vegetal em etanol 70°GL.

Como pode ser observado no gráfico 2.33, os resultados demonstram que o extrato de *S. dulcis* obtido pelo processo de turbólise 2:10 (m/v) em etanol 70°GL não foi capaz de induzir um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de camundongos nas diversas concentrações administradas (500, 1500 e 2500 mg/kg), quando comparados ao controle negativo. Os resultados apresentados não foram significativos quando comparado ao controle positivo, assim como não houve diferença estatística entre as doses administradas.

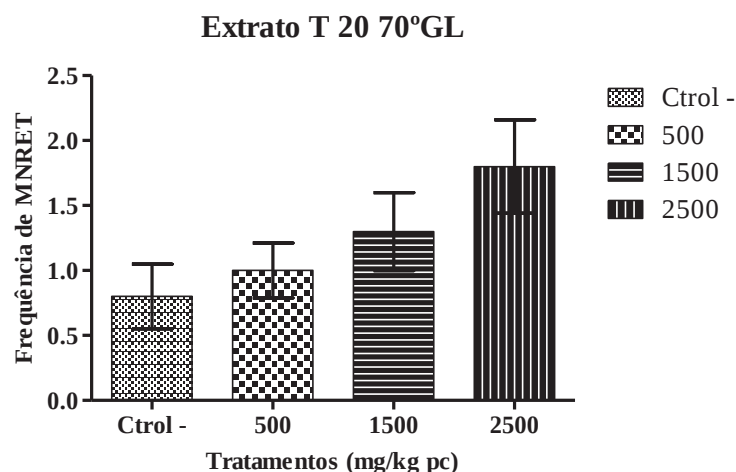


Gráfico 2.33 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por turbólise 2:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70°GL

No gráfico 2.34 os resultados demonstram que o extrato de *S. dulcis* obtido pelo processo de refluxo 2:10 (m/v) em etanol 70°GL, nas diferentes concentrações administradas (500, 1500 e 2500 mg/kg) induziu um aumento significativo na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de camundongos, quando comparado ao controle negativo nas concentrações de 1500 e 2500 mg/kg. Além disso, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$) na concentração de 2500 mg/kg em relação à concentração de 500 mg/kg. Os resultados apresentados não foram significativos quando comparados ao controle positivo.

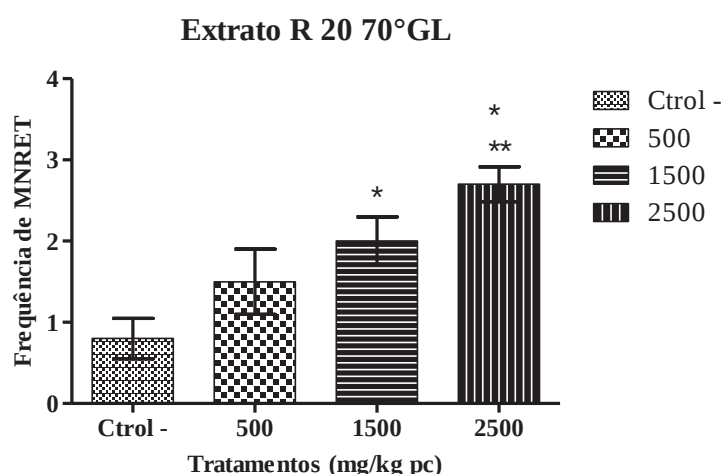


Gráfico 2.34. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com diferentes doses do extrato obtido por refluxo 2:10 (m/v) de droga vegetal em etanol 70°GL.

* $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo); ** $p < 0,05$ (em relação à dose de 500 mg/kg)

No gráfico 2.35, está demonstrada a frequência média de reticulócitos micronucleados dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20 na concentração de 500 mg/kg. Diante dos resultados foi possível observar que não houve diferença estatística entre todos os extratos e o grupo controle negativo, assim como não houve diferença estatística entre os extratos.

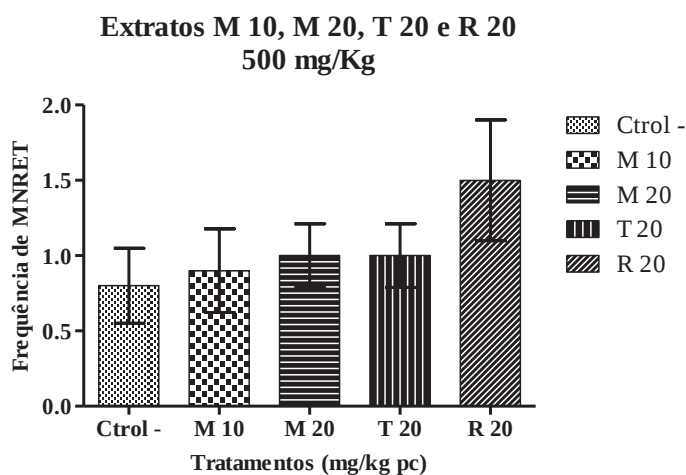


Gráfico 2.35 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20.

Os resultados que apresentam a frequência média de reticulócitos micronucleados dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20 na concentração de 1500 mg/kg, estão demonstrados no gráfico 2.36. Foi possível observar que houve diferença estatística (* $p < 0,05$ entre o extrato R 20 e o controle negativo, além disso, nota-se que não houve diferença significativa quando os extratos foram comparados entre si.

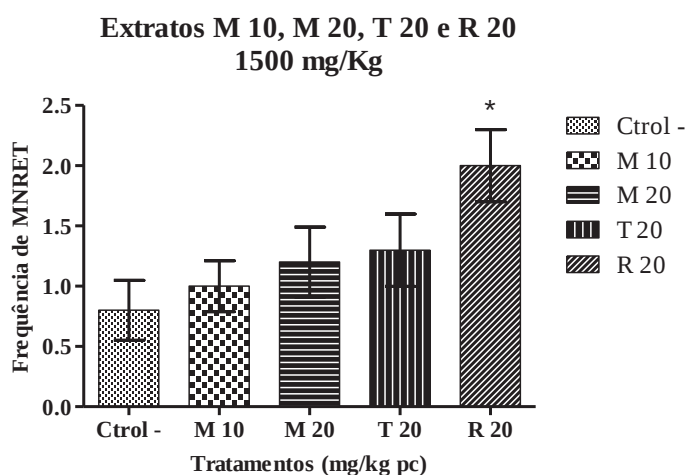


Gráfico 2.36 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 1500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20. * $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo)

No gráfico 2.37, está demonstrada a frequência média de reticulócitos micronucleados dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20 na concentração de 2500 mg/kg. Os resultados indicaram que o extrato R 20 induziu de forma significativa um aumento na incidência de micronúcleos, quando comparado ao grupo controle negativo (* $p < 0,05$) e ao extrato M 10 (** $p < 0,05$).

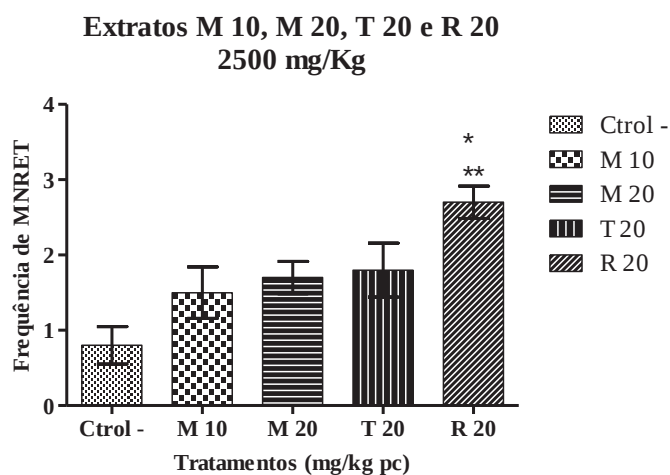


Gráfico 2.37. Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desviopadrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 2500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20.

* $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo); ** $p < 0,05$ (em relação ao extrato M 10)

O ensaio do micronúcleo é um método utilizado para avaliar a capacidade de substâncias em induzir danos cromossômicos em células em estágio de divisão (FENECH, 2005). Desta forma, como já era esperado, os resultados demonstraram que a frequência de micronúcleos nos grupos de camundongos que foram expostos à ação do agente genotóxico ciclofosfamida é significativamente maior em comparação ao grupo controle negativo, o que corrobora dados da literatura (RIBEIRO, 2003). Além disso, é possível verificar ainda que a exposição de animais normais às diferentes concentrações (500, 1500 e 2500 mg/kg) dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20 não induziu, de forma significativa, um aumento na incidência de micronúcleos, quando comparado ao grupo de animais tratados com ciclofosfamida (controle positivo).

Estes resultados sugerem que os extratos, nas condições experimentais avaliadas, não possuem um potencial significativo para induzir danos ao DNA, quando comparados ao grupo controle positivo e negativo, exceto o extrato R 20 na concentração de 2500 mg/kg, que apresentou significância estatística quando comparado ao controle negativo. Os extratos

avaliados não apresentaram diferença estatística entre si em nenhuma das concentrações utilizadas.

2.2.15 Escolha do extrato e otimização das condições de extração a partir de polpa seca de frutos de *S. dulcis*

Com o objetivo de se obter resultados mais conclusivos a respeito dos processos extrativos foi necessário realizar diferentes técnicas para otimização das condições necessárias na busca por eficiência, seletividade e reprodutibilidade.

A escolha do método de extração e do solvente extrator para o desenvolvimento do trabalho foi baseada nos resultados obtidos nos testes de atividade antioxidante pelos métodos de captura de radicais DPPH• e ABTS•(Figuras 2.15 e 2.16), quantificação do teor de compostos fenólicos equivalente a ácido gálico e rutina através do método de Folin Ciocalteu e da avaliação da mutagenicidade *in vivo* através do ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongo. A comparação dos resultados obtidos nos ensaios evidenciaram o método extrativo maceração 2:10 (m/v) utilizando sistema solvente etanol 70°GL como o mais eficiente em relação aos demais métodos (turbólise, refluxo e percolação), e foi escolhido para dar sequencia aos futuros ensaios de desenvolvimento do fitocosmético para avaliação da atividade cosmética, além de considerar o uso de solventes atóxicos, baixo custo, pequeno número de etapas.

O método empregado inicialmente nos processos extrativos foi a turbólise, que demonstrou eficiência em curto período e capaz de reduzir drasticamente o tamanho das partículas e, conseqüente, rompimento das células do vegetal em pequeno espaço de tempo, demonstrando efetiva dissolução dos constituintes presentes no fruto; entretanto, este processo pode apresentar inconvenientes, como presença de altos teores de açúcares e constituintes do material vegetal como pectina. Os extratos obtidos por este método, quando da análise fitoquímica, não apresentaram resultados conclusivos, o que levou à necessidade de serem particionados com n-butanol para separar os açúcares dos extratos e, conseqüentemente, a realização de novos testes para confirmação destas interferências.

O método descrito por Wagner e colaboradores (1984) para identificação por CCDC de flavonóides presentes em frutos e extraídos a partir da técnica de extração por refluxo foi modificado e utilizado para avaliar os extratos obtidos a partir da droga vegetal de frutos *S. dulcis*, e estendido aos demais métodos extrativos realizados. Foram obtidos resultados representativos quando da comparação das análises por cromatografia e espectrometria no UV, ficando demonstrado que a capacidade de extratividade e eficiência dos sistemas solventes empregados na obtenção dos extratos é bastante expressiva, denotando ser o álcool a 70°GL o solvente eletivo nos processos realizados, para obtenção dos compostos fenólicos e demais substâncias ativas existentes no fruto de *S. dulcis*.

Dos resultados obtidos comparando-se a capacidade antioxidante, nas Figuras 2.15 e 2.16, dos extratos analisados, foi possível delinear as análises de identificação dos compostos ativos responsáveis de acordo com atividade demonstrada. Em ambos os testes realizados, o extrato M20 EtOH 70°GL foi submetido a processos de purificação.

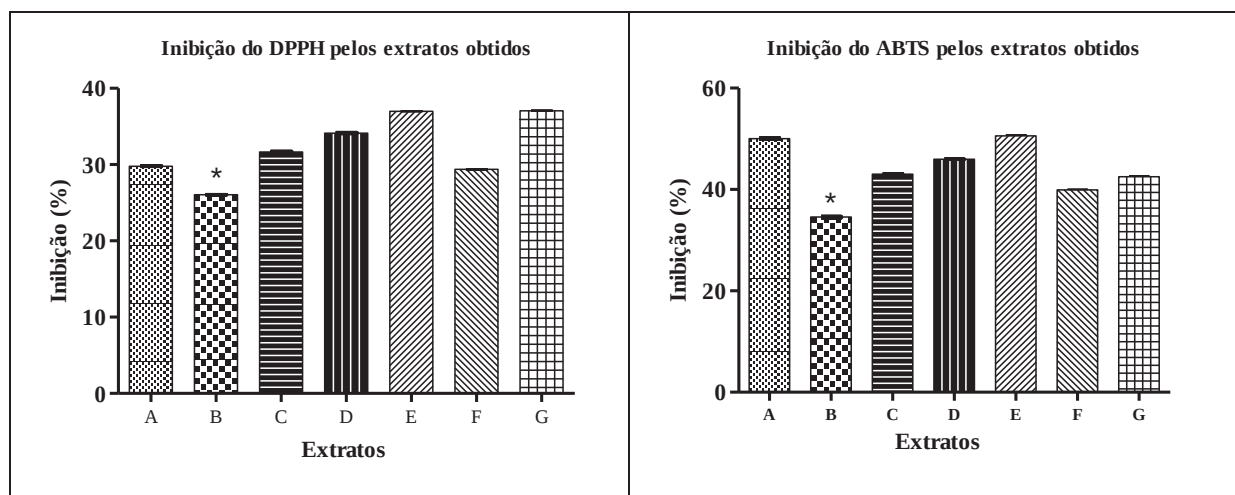


Figura 2.15 Inibição (%) dos radicais DPPH• (esquerda) e ABTS• (direita) pelos diferentes extratos obtidos a 1:10 (m/v); (onde A: M 10 EtOH; B: M 10 EtOH 70; C: T 10 EtOH; D: T 10 EtOH 70; E: R 10 EtOH; F: R 10 EtOH 70; G: P 10 EtOH); (*p < 0,05 em relação a todos os extratos, exceto o R 10 EtOH)

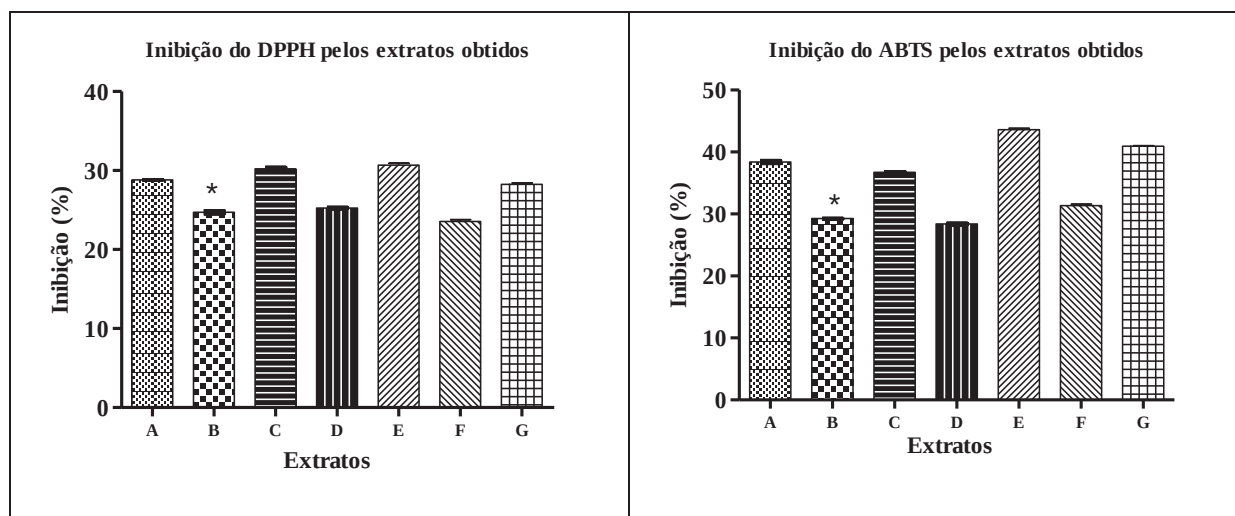


Figura 2.16 Inibição (%) dos radicais DPPH• (esquerda) e ABTS• (direita) pelos diferentes extratos obtidos a 2:10 (m/v); (onde A: M 20 EtOH; B: M 20 EtOH 70; C: T 20 EtOH; D: T 20 EtOH 70; E: R 20 EtOH; F: R 20 EtOH 70; G: P 20 EtOH); (* $p < 0,05$ em relação a todos os extratos, exceto o R 10 EtOH)

A partir das análises toxicológicas “*in vivo*” comparando os diferentes extratos foi demonstrado que apenas o obtido por refluxo apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo (água), fato que leva à exclusão deste processo (Figura 2.17). Diante dos resultados foi possível observar que o extrato obtido pelo processo de maceração apresentou menor incidência de reticulócitos micronucleados em todas as concentrações avaliadas em relação aos outros extratos, sendo o único a ser avaliado quanto à citotoxicidade, confirmando através deste teste sua atoxicidade. Portanto, os resultados obtidos nos ensaios realizados permitiram escolher o extrato obtido por maceração 2:10 (m/v) em etanol 70°GL para dar sequência nos ensaios futuros.

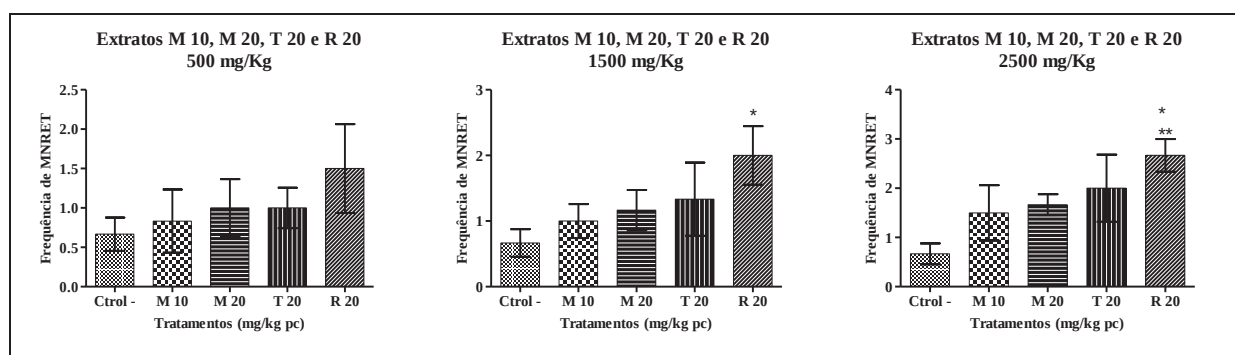


Figura 2.17 Frequência média de reticulócitos micronucleados (MNRET) e desvio padrão para 1000 células obtidas de camundongos tratados com 500, 1500 e 2500 mg/kg dos extratos M 10, M 20, T 20 e R 20. * $p < 0,05$ (em relação ao controle negativo); ** $p < 0,05$ (em relação ao extrato M 10)

Cabe ressaltar que todas as análises descritas por pesquisadores dos mais variados institutos de pesquisa do mundo, até o momento, são referentes ao fruto como alimento, buscando explorar a capacidade antioxidante como fonte importante de agentes promotores de saúde e, desta forma, incentivar o consumo do fruto de *S. dulcis*.

Uma planta, no entanto, especialmente na sua produção de metabólitos secundários, é bastante influenciada pelo ambiente. Assim, os metabólitos secundários em frutos cultivados no Brasil não podem ser idênticos aos dos mesmos frutos cultivados em outros países ou mesmo em diferentes regiões do mesmo país. No Brasil, apesar do consumo destes frutos, não há dados científicos disponíveis que amparem suas atividades fisiológicas.

Nesta primeira parte do trabalho, a idéia central foi explorar as potencialidades do fruto para o desenvolvimento de fitocosmético antioxidante e fotoprotetor, de comprovada eficácia, qualidade e segurança, até o momento não avaliada por nenhum outro grupo.

Visando a prospecção de forma a estabelecer uma cadeia sustentável para o cultivo desta planta, até então explorada por extrativismo, de forma a possibilitar a sustentabilidade da produção ao consumo de derivados, para os mais diversos fins, e não somente alimentar, podendo até, em função de outras atividades estudadas, propor o desenvolvimento de produtos auxiliares em variadas terapias.

Assim, o extrato M20 EtOH 70°GL foi adicionado a uma formulação, para avaliação da estabilidade e atividade cosméticas.

CAPÍTULO 3

Com base nos resultados relacionados à eficácia e segurança descritos no capítulo anterior, este capítulo irá tratar da avaliação da atividade cosmética incluindo atividade antioxidante e o fator de proteção solar de fitocosmético contendo o extrato selecionado, M20 EtOH 70° GL, nas concentrações de 5, 10 e 20% (m/m).

3.1 Material e métodos

3.1.1 Equipamentos

- Agitador Labortechnik® - mod RW 20 DZM.n
- Balança analítica Shimadzu® - mod AY 220
- Balança semi-analítica Gehaka® - mod B6 2000
- Balança semi-analítica Shimadzu® - mod BL 320H
- Centrífuga Centribio®
- Estufa termostatzada Quimis® - mod Q-316M2
- Espectrofotômetro Hitachi® - mod UV U-2001
- Geladeira Electrolux® - mod DC 46
- Peagômetro digital Gehaka® - mod PG 1800
- Reômetro Haake® - mod Rheostress RS-1
- Sonicador Sanders® - mod Soniclean 2

3.1.2 Reagentes

- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) (Sigma Aldrich®)
- Etanol (Chemis®)

3.1.3 Formulação proposta do fitocosmético

O sistema emulsionado proposto para preparação do fitocosmético contendo extrato mais ativo e seguro de cajá-manga está descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Composição percentual do creme base emulsionado

Matérias primas	% em peso
INCI	
Cetearyl Alcohol	6,00
Ceteareth-20	3,00
Cetyl Palmitate	3,00
Isopropyl Miristate	4,00
Tetrasodium EDTA	0,10
BHT	0,05
Phenoxyethanol and Methylparaben and Ethylparaben and Propylparaben and Butylparaben	0,20
Propylene Glycol	3,00
PEG-75 Lanolin	2,00
Aqua	q.s.p. 100,00

O extrato M20 EtOH 70° GL foi adicionado nas concentrações de 5, 10 e 20 % ao creme base.

3.1.3.1 Preparo do creme base

O creme base foi preparado da forma convencional; ou seja, aquecidas as fases aquosa e oleosa, em béqueres, separadamente, até a solubilização e/ou fusão dos componentes. Em seguida, a fase aquosa foi vertida na fase oleosa e o sistema mantido em agitação constante, em agitador a 500 rpm, até o resfriamento.

Os fitocosméticos foram obtidos logo após o preparo da emulsão pela adição do extrato de cajá-manga, até completa homogeneização, e identificados quantitativamente pela concentração exata de extrato incorporado por diluição geométrica ao creme, como CR cajá-manga 5, CR cajá-manga 10 e CR cajá-manga 20 para as preparações incorporadas de 5, 10 e 20% de extrato, respectivamente. Os fitocosméticos foram acondicionados nas embalagens, semelhantes às comerciais, para os estudos da estabilidade, atividade antioxidante e fotoprotetora.

3.1.4 Estudo da estabilidade

Os fitocosméticos foram submetidos a estresse térmico e sua estabilidade física foi determinada segundo o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA (BRASIL, 2004) e Isaac *et al.*, 2008.

As preparações fitocosméticas e o creme base foram submetidos inicialmente à estresse físico por centrifugação durante quinze minutos e, posteriormente, às condições de estresse térmico, avaliação macroscópica e do pH durante 15 dias consecutivos para avaliar a estabilidade preliminar das amostras.

Os ensaios para verificação de estabilidade acelerada, foram realizados por avaliação macroscópica, do pH e da densidade em intervalos de 1, 7, 15, 21, 30, 45, 60 e 90 dias, e viscosidade em intervalos de 1, 15, 30, 60 e 90 dias de análise das amostras em condições de estresse térmico (ISAAC, 2008). Nos resultados, para a emulsão ser considerada estável, não deverá existir variação maior que 10% (BRASIL, 2004).

3.1.4.1 Centrifugação

Em tubo de ensaio para centrífuga, cônico, graduado, de 10 mL de capacidade, foram pesados, em balança semianalítica, cerca de 5 g da amostra a ser analisada. As amostras foram submetidas a rotações crescentes de 1000, 2000 e 3000 rpm, em centrífuga, durante quinze

minutos em cada rotação, à temperatura ambiente (IDSON, 1988; IDSON, 1993a, 1993b; RIEGER, 1996). A cada ciclo de rotação foi avaliada visualmente a não ocorrência de separação de fases indicando estabilidade da amostra ensaiada.

3.1.4.2 Estresse térmico

Em embalagens adequadas para a realização do estudo, 50 g de amostra de cada fitocosmético foram acondicionados e submetidos a condições extremas de temperatura, estocadas em temperatura de congelador ($-5 \pm 2^\circ \text{C}$); de geladeira ($5 \pm 2^\circ \text{C}$); de ambiente ($\pm 2^\circ \text{C}$); de estufa termostatzada ($45 \pm 2^\circ \text{C}$), ciclos de congelamento e descongelamento, alternando temperaturas baixas e elevadas em intervalo de tempo de 24 horas e exposição indireta à luminosidade, para detecção de sinais de instabilidade. A não ocorrência de separação de fases deve ser indicativa de estabilidade do produto ensaiado.

3.1.4.3 Avaliação Macroscópica

As preparações fitocosméticas foram observadas macroscopicamente quanto à existência de alterações de características organolépticas e de separação de fases e em relação à amostra de creme base mantido como padrão (BRASIL, 2004; ISAAC *et al.*, 2008).

Os parâmetros macroscópicos analisados foram aspecto e cor visual das preparações fitocosméticas e o odor por análise sensorial. As preparações foram classificadas, em relação ao aspecto, à cor e odor em: sem alteração; levemente modificada e modificada.

3.1.4.4 Determinação do valor do pH

Os fitocosméticos foram dispersos em água destilada a 10% (p/p) e a determinação do pH foi realizada inserindo o eletrodo diretamente na dispersão, usando peagômetro digital

(BRASIL, 2004; DAVIS *et al.*, 1977, ISAAC, 1998, FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Os valores mantidos iguais ao encontrado na preparação no dia 01, foi usado como critério no teste de estabilidade e a variação dos resultados não deve ser maior que 10% (ISAAC *et al.*, 2008). As avaliações foram realizadas em triplicata.

3.1.4.5 Determinação e avaliação da densidade

A densidade específica, representada pela relação entre a massa da amostra e a massa da água a 20° C, foi determinada conforme a Farmacopéia Brasileira (1988), utilizando picnômetro, previamente pesado vazio, para determinação da m_{pv} . A massa da amostra foi obtida pela diferença entre a massa do picnômetro vazio e a massa do picnômetro contendo a amostra (m_{pa}).

3.1.4.6 Determinação e avaliação da viscosidade

As viscosidades dos fitocosméticos submetidos às condições de estresse foram determinadas por ensaio reológico de curva de fluxo, com taxa de cisalhamento de 0-100 (s^{-1}) tanto para curva ascendente, como também, para a descendente, por 120 segundos cada curva. A determinação do valor da viscosidade neste ensaio foi determinado no ponto de maior cisalhamento 100 (s^{-1}), sendo denominada, por este motivo, como viscosidade aparente. A curva de fluxo foi obtida utilizando sensor do tipo cone placa (C35/2°Ti) em reômetro HAAKE modelo RHEOSTRESS RS-1, por se tratarem de emulsões e os dados foram tratados pelo software Rheowin 3.5.1. Os testes foram realizados em intervalos de 1, 15, 30, 60 e 90 dias de vida de prateleira. O ensaio foi realizado a 32° C e em triplicata, sendo consideradas aceitáveis variações de até 10% para os resultados (ISAAC *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2004; GREGOLIN *et al.*, 2010).

Pela análise da área de histerese das amostras, foram determinadas a tixotropia, propriedade que indica o grau de recuperação das amostras após o cisalhamento.

3.1.5 Avaliação da atividade antioxidante dos fitocosméticos

A avaliação da atividade antioxidante dos fitocosméticos contendo diferentes concentrações (5, 10 e 20%) do extrato de *S. dulcis* foram realizadas pelo ensaio de DPPH• conforme metodologia descrita no item 2.1.12.2 do capítulo 02.

Para o ensaio, foram utilizados 5,0 g de cada uma das preparações fitocosméticas e do creme base diluídos em 10 mL de etanol. A partir desta solução foi avaliada e calculada a porcentagem de inibição da captura do radical DPPH•. As soluções foram preparadas tendo como base o valor do IC₅₀ encontrado na avaliação para o extrato M20 EtOH 70° GL e igual a 25 mg/mL. As concentrações finais das soluções preparadas, com relação à concentração do extrato incorporado aos fitocosméticos foram de 25, 50 e 100 mg/mL para os fitocosméticos incorporados de 5, 10 e 20 % de extrato, respectivamente. A concentração real do extrato no ensaio com DPPH•, foi de 0,625 mg/mL, 1,25 mg/mL e 2,5 mg/mL para cada fitocosmético avaliado.

3.1.6 Avaliação do fator de proteção solar dos fitocosméticos

Foram pesadas 0,50 g de amostras dos fitocosméticos (CR cajá-manga 5, CR cajá-manga 10 e CR cajá-manga 20), creme base, creme base adicionado de 5% de metoxicinamato de octilae fitocosmético CR cajá-manga 20 adicionado de 5% de metoxicinamato de octila. As amostras foram, separadamente, transferidas diretamente para o balão volumétrico de 100 mL onde inicialmente foram dispersadas em 30mL de etanol e levadas ao aparelho de ultrassom por 5 minutos e, posteriormente, o volume foi completado com o solvente. Foi transferida uma alíquota de 2,0 mL para o balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com etanol. As amostras foram homogeneizadas manualmente, obtendo amostras de concentração final de 0,2 mg/mL, sendo a concentração padronizada para o cálculo do FPS (MANSUR, 1986; GARCIA, 1990; BARTH, 2000). A Figura 3.1 ilustra a metodologia.

As amostras em solução foram analisadas em triplicata e as absorvâncias das soluções das amostras medidas em espectrofotômetro. Os espectros de absorção foram obtidos na banda de 190 para 400 nm usando uma cubeta de quartzo de 2 cm³. Foi utilizado etanol como branco e o creme base como controle. Nos dados de absorção obtidos na banda de 290 até 320nm, foram realizadas as leituras de absorvâncias a cada 5 nm, seguidos pela aplicação da equação de Mansur(MANSUR *et al.*, 1986).

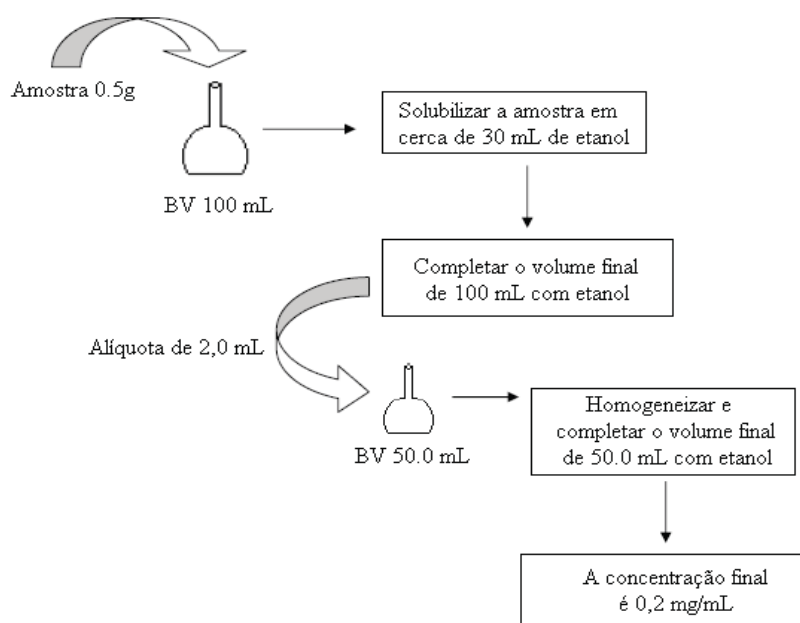


Figura 3.1 Ilustração da técnica de preparo de soluções amostras para a determinação do FPS

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Formulação

Para obtenção do creme base foi proposta uma formulação contendo 6,00% Cetearyl Alcohol (álcool cetearílico), 3,00% Cetareth-20 (álcool cetoestearílico etoxilado 20 OE), 3,00% Cetyl Palmitate (palmitato de cetila), 4,00% Isopropyl Miristate (miristato de isopropila), 0,10% Tetrasodium EDTA (edetato tetrasódico), 0,05% BHT (butil hidroxitolueno), 0,20% Phenoxyethanol and Methylparaben and Ethylparaben and Propylparaben and Butylparaben (Phenova®), 3,00% Propylene Glycol (propilenoglicol), 2,00% PEG-75 Lanolin (lanolina etoxilada), q.s.p. 100,00g Aqua (água destilada) que, após acertos nas concentrações dos agentes emulsivos e de consistência, foi obtida a formulação proposta neste estudo.

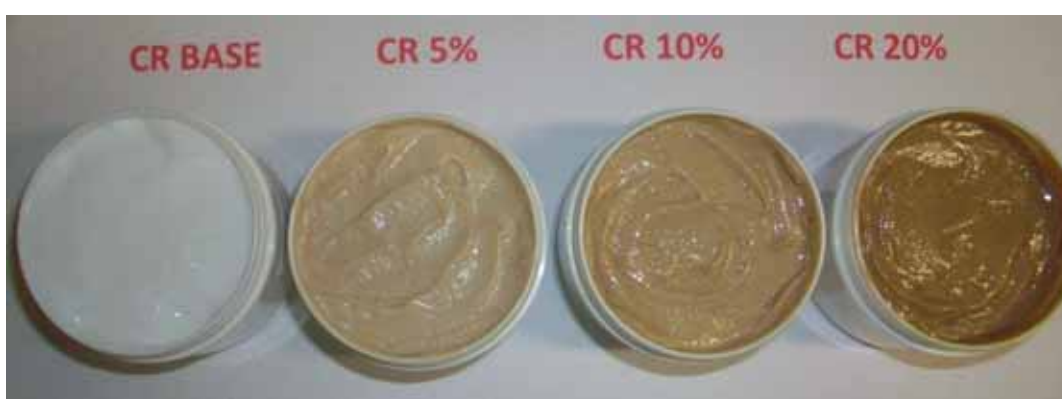
A formulação obtida é de caráter não-iônico apresentando pH 6,00, verificado imediatamente após o seu preparo, o que possibilitou a incorporação do extrato M 20 EtOH 70° GL (pH 2,52) nas diferentes concentrações. A concentração de 5% de extrato proposta inicialmente foi calculada em função dos resultados obtidos nas avaliações da atividade antioxidante.

A Tabela 3.2 mostra as médias, desvios padrão e variâncias dos valores obtidos nas avaliações do pH, densidade e viscosidade no intervalo de 1 a 90 dias para o creme base. Diante dos parâmetros analisados, é possível afirmar que o creme base manteve-se estável durante o período dos ensaios.

Tabela 3.2 Valores de pH, densidade (g/cm^3) e viscosidade (Pas) do creme base

Dia	pH	Densidade	Viscosidade
1	5,81	0,9787	1,79
7	5,78	0,9819	
15	5,80	0,9818	1,62
21	5,79	0,9827	
30	5,76	0,9889	1,46
45	5,71	0,9919	
60	5,62	0,9968	1,34
75	5,64	0,9974	
90	5,66	1,0129	1,35
DP	0,07	0,0111	0,17
VAR	0,00	0,0001	0,03

Os fitocosméticos foram obtidos um dia após o preparo do creme base em quantidade suficiente para a realização dos ensaios. Foram identificados conforme a quantidade de extratos adicionados como CR cajá-manga 5 (5% de extrato), CR cajá-manga 10 (10%) e CR cajá-manga 20 (20%), mantendo-se estáveis visivelmente à temperatura ambiente, pela não mudança de coloração, mesmo após adição de altas concentrações dos extratos, como pode ser observado na Figura 3.2.

**Figura 3.2** Aspecto do creme base e fitocosméticos após adição dos extratos

3.2.2 Estudo da estabilidade preliminar e acelerada

O teste de estabilidade preliminar consiste em estudar o produto na fase inicial de seu desenvolvimento, sendo utilizadas diferentes ferramentas, em um curto intervalo de tempo. Este teste é conhecido como teste de triagem, teste de estabilidade preliminar ou teste de curto prazo pode ser considerado um teste orientativo no desenvolvimento de produtos. Consiste em submeter a amostra a condições extremas de temperatura, objetivando acelerar processos de instabilidade, para auxiliar na triagem de formulações e não ser estimativo de vida útil do produto (BRASIL, 2004). O teste de estabilidade preliminar tem a duração de 15 dias, sendo a primeira avaliação realizada no tempo um (t_1), que corresponde a 24 após a manipulação, para que o produto possa adquirir a viscosidade e consistência real, após sua maturação (ISAAC *et al.*, 2008).

A estabilidade acelerada, também denominada estabilidade normal ou exploratória, tem como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

O teste de estabilidade acelerada foi conduzido por 90 dias, período em que as amostras foram submetidas a estresse térmico e exposição à radiação luminosa, e avaliadas em relação ao aspecto, cor, odor, valor de pH, densidade e viscosidade (BRASIL, 2004).

3.2.2.1 Centrifugação

Todas as formulações dos fitocosméticos foram estáveis quando submetidas ao estresse mecânico (centrifugação) em todos os ciclos, uma vez que não foi observada separação de fases.

3.2.2.2 Avaliação Macroscópica

Os caracteres organolépticos das formulações foram mantidos durante o período de 90 dias nas condições ensaiadas, exceto as formulações submetidas à temperatura de $45 \pm 2^\circ \text{C}$, as quais sofreram alteração da cor (escurecimento) (Figura 3.3).

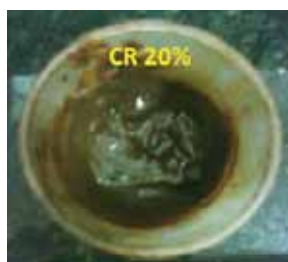


Figura 3.3 Aspecto do CR cajá-manga 20 submetido à temperatura de $45 \pm 2^\circ \text{C}$ após 90 dias

A Figura 3.4 ilustra o aspecto dos fitocosméticos mantidos à temperatura ambiente ($\pm 2^\circ \text{C}$) ao final do estudo (90 dias), observando que não houve alteração aparente em relação à Figura 3.2, confirmando a estabilidade macroscópica das preparações. É importante ressaltar que não foi observada separação de fases em nenhuma das condições de estresse as quais foram submetidas as amostras durante o estudo.



Figura 3.4 Aspecto do creme à temperatura ambiente ao final do prazo de estabilidade

3.2.2.3 Determinação do valor do pH

Por definição, o pH é o logaritmo negativo da concentração molar de íons hidrogênio e corresponde à acidez ou alcalinidade de uma solução. É determinado pela diferença de potencial entre dois eletrodos, o de referência e o de medida, imersos na amostra a ser analisada e depende da atividade dos íons de hidrogênio na solução (BRASIL, 2007).

De acordo com os valores obtidos nas análises de estabilidade preliminar de pH dos fitocosméticos, não foi verificada alterações entre as médias dos valores determinados durante os primeiros 15 dias deste ensaio, como mostrado nas Tabelas 3.3, 3.4 e 3.5 e nos Gráficos 3.1, 3.2 e 3.3. Entretanto, foram verificadas diferenças nos valores de pH entre os fitocosméticos obtidos e destes em relação ao creme base, o que pode ser justificado em função do caráter ácido do extrato (pH 2,52) e da concentração de extrato incorporado a cada preparação. As análises do estudo de estabilidade preliminar foram realizadas em triplicata e os valores encontrados constam dos anexos 2 a 7.

Tabela 3.3 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 5								
1	3,00	3,02	3,03	3,07	3,02	2,99	0,03	0,00
2	2,76	2,86	2,87	2,79	2,77	2,77	0,04	0,00
3	3,05	2,90	2,82	2,74	2,75	2,74	0,11	0,01
4	2,75	2,87	2,78	2,74	2,73	2,74	0,05	0,00
5	2,95	2,93	2,94	2,96	2,92	2,91	0,02	0,00
6	3,10	3,11	3,09	3,10	3,02	3,05	0,03	0,00
7	3,07	3,04	3,04	3,07	3,06	2,97	0,03	0,00
8	3,04	2,99	3,02	3,01	2,98	2,97	0,02	0,00
9	2,97	3,01	3,02	3,01	2,96	2,96	0,03	0,00
10	2,96	2,97	3,01	2,98	2,96	2,94	0,02	0,00
11	3,04	3,01	3,02	3,06	2,97	2,97	0,03	0,00
12	3,00	3,00	3,00	3,01	2,97	2,92	0,03	0,00
13	3,01	3,01	2,99	3,01	2,99	2,95	0,02	0,00
14	3,02	3,00	3,03	3,06	3,03	2,96	0,03	0,00
15	3,06	3,07	3,06	3,06	3,03	3,03	0,02	0,00
DP	0,10	0,07	0,09	0,12	0,10	0,09		
VAR	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01		

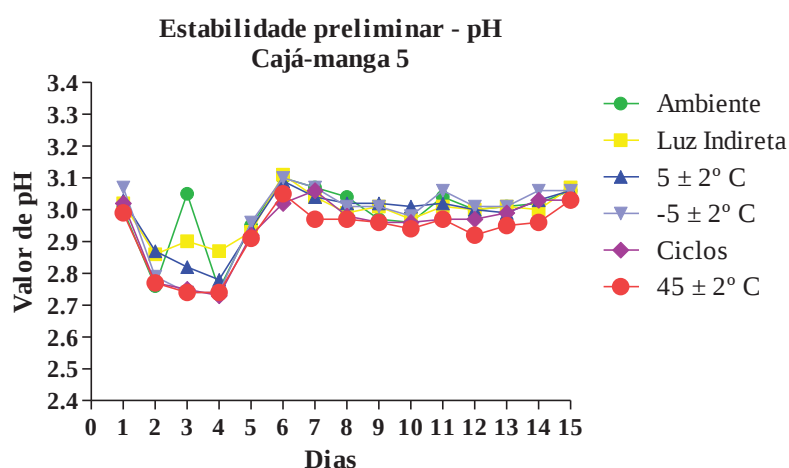
**Gráfico 3.1** Valores de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

Tabela 3.4 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 10								
1	2,87	2,88	2,85	2,90	2,89	2,84	0,02	0,00
2	2,88	2,95	2,97	2,93	2,94	2,90	0,03	0,00
3	2,85	2,92	2,93	2,91	2,91	2,89	0,03	0,00
4	2,83	2,93	2,92	2,91	2,91	2,86	0,03	0,00
5	2,83	2,85	2,85	2,83	2,81	2,82	0,01	0,00
6	2,96	2,96	2,94	2,96	2,98	2,91	0,02	0,00
7	2,92	2,92	2,93	2,91	2,91	2,88	0,02	0,00
8	2,86	2,87	2,87	2,91	2,87	2,83	0,02	0,00
9	2,86	2,84	2,81	2,89	2,86	2,80	0,03	0,00
10	2,83	2,84	2,85	2,88	2,83	2,78	0,03	0,00
11	2,87	2,87	2,89	2,90	2,88	2,82	0,03	0,00
12	2,86	2,85	2,87	2,84	2,85	2,81	0,02	0,00
13	2,82	2,83	2,83	2,86	2,85	2,78	0,03	0,00
14	2,89	2,88	2,89	2,89	2,90	2,84	0,02	0,00
15	2,90	2,92	2,91	2,92	2,89	2,87	0,02	0,00
DP	0,04	0,04	0,04	0,03	0,04	0,04		
VAR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

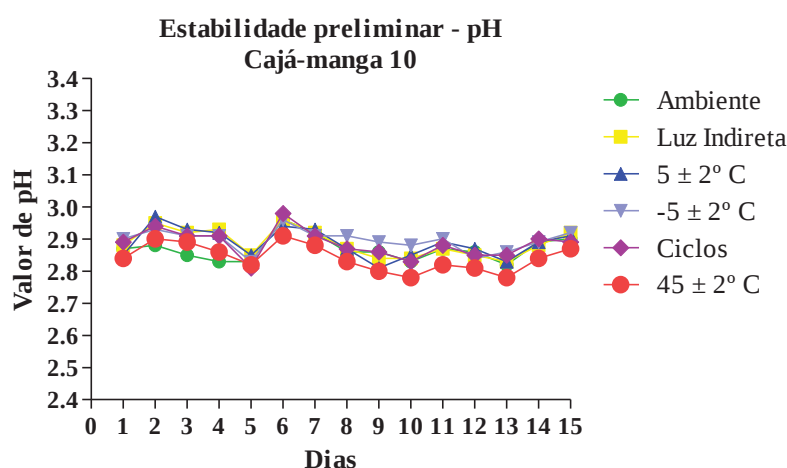
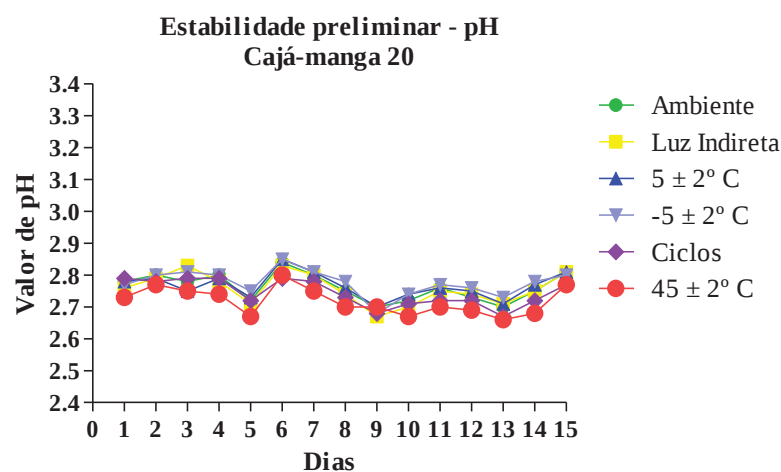
**Gráfico 3.2** Valores de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

Tabela 3.5 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 20								
1	2,78	2,76	2,78	2,77	2,79	2,73	0,02	0,00
2	2,80	2,79	2,79	2,80	2,78	2,77	0,01	0,00
3	2,78	2,83	2,75	2,81	2,79	2,75	0,03	0,00
4	2,80	2,78	2,79	2,80	2,79	2,74	0,02	0,00
5	2,72	2,71	2,73	2,75	2,72	2,67	0,02	0,00
6	2,84	2,83	2,85	2,85	2,79	2,80	0,02	0,00
7	2,80	2,80	2,81	2,81	2,78	2,75	0,02	0,00
8	2,75	2,74	2,76	2,78	2,73	2,70	0,02	0,00
9	2,70	2,67	2,70	2,68	2,68	2,70	0,01	0,00
10	2,72	2,70	2,74	2,74	2,71	2,67	0,02	0,00
11	2,76	2,75	2,76	2,77	2,72	2,70	0,02	0,00
12	2,73	2,74	2,75	2,76	2,72	2,69	0,02	0,00
13	2,70	2,71	2,71	2,73	2,67	2,66	0,02	0,00
14	2,75	2,75	2,77	2,78	2,72	2,68	0,03	0,00
15	2,81	2,81	2,81	2,80	2,77	2,77	0,02	0,00
DP	0,04	0,05	0,04	0,04	0,04	0,04		
VAR	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		

**Gráfico 3.3** Valores de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade preliminar

As quantidades de fitocosméticos de diferentes concentrações de extrato (5%, 10% e 20%) preparadas foram suficientes para os estudos preliminares e para dar continuidade aos estudos de estabilidade acelerada com duração de 90 dias, entretanto os valores de pH dos dias 1, 7 e 15 foram reunidos aos valores de pH na tabela onde estão descritos aqueles obtidos durante o estudo de estabilidade acelerada. As tabelas 3.6, 3.7 e 3.8 e os gráficos 3.4, 3.5 e 3.6 mostram as médias para os valores de pH. Pequenas variações foram observadas, entretanto não foram significativas, e não superiores a 10%, mostrando que os fitocosméticos são estáveis segundo à análise do pH nas diferentes condições de estresse às quais as amostras foram submetidas. As análises foram realizadas em triplicata e os valores encontrados constam dos anexos 8 a 13.

Tabela 3.6 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 5								
1	3,00	3,02	3,03	3,07	3,02	2,99	0,025	0,001
7	3,07	3,04	3,04	3,07	3,06	2,97	0,034	0,001
15	3,06	3,07	3,06	3,06	3,03	3,03	0,016	0,000
21	2,99	3,00	3,01	2,99	2,98	2,96	0,016	0,000
30	2,99	3,01	3,02	2,98	2,95	2,95	0,027	0,001
45	2,95	2,96	2,99	3,01	3,06	2,92	0,045	0,002
60	2,96	3,08	3,03	3,00	2,96	3,00	0,042	0,002
75	3,04	3,05	3,08	3,02	2,99	3,06	0,029	0,001
90	3,01	3,01	3,02	3,03	3,00	3,07	0,023	0,001
DP	0,039	0,035	0,025	0,032	0,038	0,048		
VAR	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002		

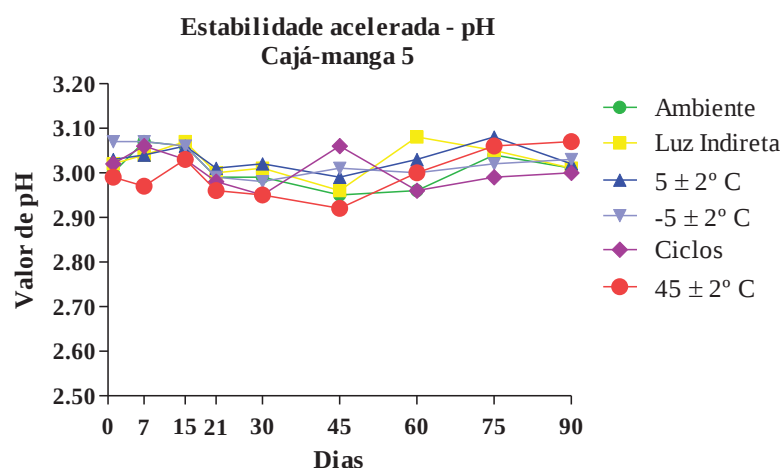


Gráfico 3.4 Valores de pH do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.7 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 10								
1	2,87	2,88	2,85	2,90	2,89	2,84	0,021	0,000
7	2,92	2,92	2,93	2,91	2,91	2,88	0,016	0,000
15	2,90	2,92	2,91	2,92	2,89	2,87	0,018	0,000
21	2,89	2,92	2,88	2,86	2,91	2,79	0,043	0,002
30	2,84	2,86	2,89	2,84	2,83	2,81	0,025	0,001
45	2,86	2,84	2,85	2,86	2,80	2,78	0,031	0,001
60	2,87	2,89	2,92	2,75	2,84	2,83	0,054	0,003
75	2,86	2,89	2,96	2,95	2,90	2,89	0,035	0,001
90	2,89	2,91	2,94	2,97	2,93	2,92	0,025	0,001
DP	0,023	0,027	0,037	0,062	0,041	0,045		
VAR	0,001	0,001	0,001	0,004	0,002	0,002		

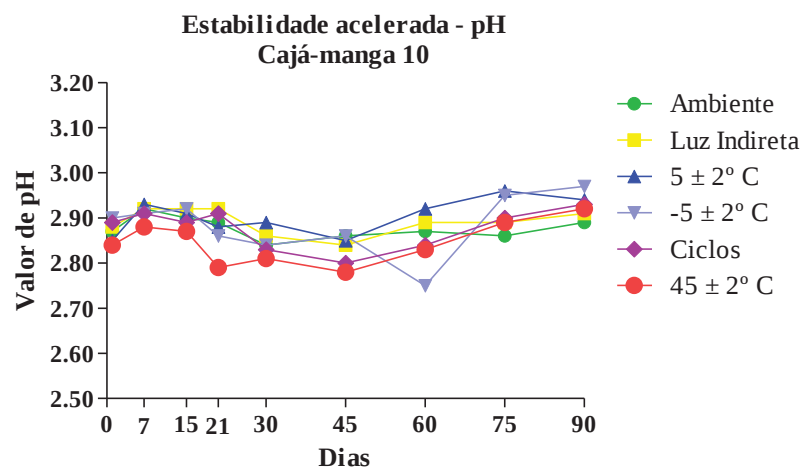


Gráfico 3.5 Valores de pH do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.8 Valores médios de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 20								
1	2,78	2,76	2,78	2,77	2,79	2,73	0,020	0,000
7	2,80	2,80	2,81	2,81	2,78	2,75	0,021	0,000
15	2,81	2,81	2,81	2,80	2,77	2,77	0,018	0,000
21	2,74	2,73	2,76	2,75	2,73	2,68	0,025	0,001
30	2,74	2,74	2,76	2,76	2,71	2,69	0,026	0,001
45	2,72	2,72	2,74	2,74	2,67	2,66	0,032	0,001
60	2,81	2,80	2,79	2,79	2,77	2,73	0,026	0,001
75	2,82	2,81	2,85	2,79	2,90	2,78	0,040	0,002
90	2,80	2,80	2,88	2,79	2,85	2,82	0,032	0,001
DP	0,035	0,035	0,043	0,022	0,066	0,049		
VAR	0,001	0,001	0,002	0,001	0,004	0,002		

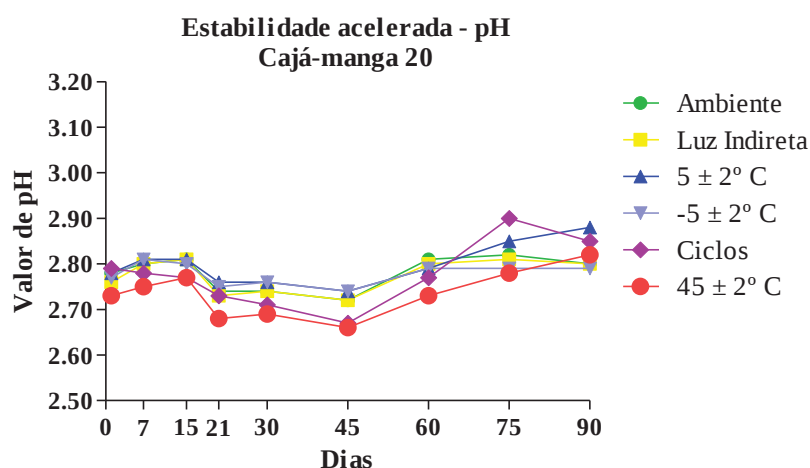


Gráfico 3.6 Valores de pH do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

3.2.2.4 Determinação e avaliação da densidade

Densidade de massa (ρ) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988) ou densidade absoluta (BRASIL, 2007) é uma propriedade física de cada substância. O valor é calculado pela relação entre determinada massa da substância e o volume ocupado por essa massa, tomando como unidade o grama por centímetro cúbico (g/cm^3) (BRASIL, 2004; BRASIL, 2007).

A densidade relativa é a relação entre a densidade absoluta da amostra e a densidade absoluta de uma substância usada como padrão. Quando a água é utilizada como substância padrão, a densidade determinada é a densidade específica (BRASIL, 2007).

As médias dos valores de densidade específica dos fitocosméticos estão mostrados nas tabelas 3.9, 3.10 e 3.11 e nos gráficos 3.7, 3.8 e 3.9 e indicaram que todas as preparações foram estáveis, apresentando pequenas variações dos valores de densidade durante os 90 dias de análise e os valores, em triplicata, de cada análise, constam dos anexos 14 a 19.

Tabela 3.9 Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 5								
1	0,9679	0,9447	0,9671	0,9533	0,9509	0,9679	0,0094	0,0000
7	0,9802	0,9526	0,9782	0,9674	0,9863	0,9619	0,0116	0,0001
15	0,9794	0,9790	0,9772	0,9915	0,9844	0,9840	0,0048	0,0000
21	0,9878	0,9804	0,9813	0,9850	1,0088	0,9713	0,0115	0,0001
30	0,9915	0,9822	0,9865	0,9740	0,9834	0,9639	0,0090	0,0000
45	0,9811	0,9802	0,9932	0,9762	0,9998	0,9829	0,0082	0,0000
60	0,9954	1,0114	1,0060	1,0118	0,9996	0,9511	0,0209	0,0004
75	0,9753	0,9251	0,9043	1,0221	0,9701	0,9638	0,0377	0,0014
90	1,0146	0,9807	1,0052	0,9695	1,0141	1,0179	0,0185	0,0003
DP	0,0128	0,0241	0,0287	0,0207	0,0186	0,0183		
VAR	0,0002	0,0006	0,0008	0,0004	0,0003	0,0003		

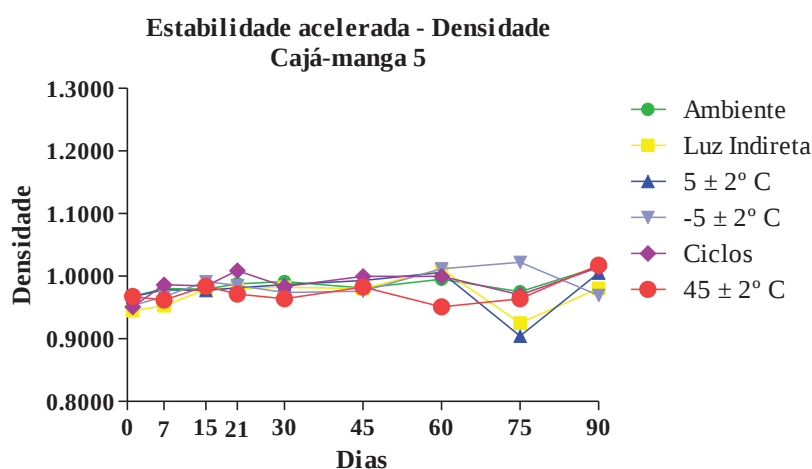
**Gráfico 3.7** Valores de densidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.10 Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 10								
1	0,9952	0,9956	0,9922	1,0012	1,0316	1,0033	0,0132	0,0002
7	1,0000	0,9786	1,0030	1,0015	1,0108	1,0027	0,0099	0,0001
15	0,9990	0,9772	0,9986	0,9932	0,9834	0,9971	0,0083	0,0001
21	1,0122	0,9894	1,0022	0,9907	1,0040	1,0526	0,0212	0,0005
30	1,0117	0,9869	0,9884	0,9524	0,9529	0,9920	0,0214	0,0005
45	1,0021	1,0135	1,0730	1,0059	1,0076	1,0105	0,0245	0,0006
60	1,0072	1,0047	0,9952	0,9630	0,9709	0,9890	0,0768	0,0059
75	1,0023	0,9864	0,9614	1,0403	1,0275	0,9688	0,0289	0,0008
90	1,0180	1,0283	1,0227	0,9971	1,0507	0,9542	0,0302	0,0009
DP	0,0577	0,0160	0,0287	0,0238	0,0292	0,0260		
VAR	0,0033	0,0003	0,0008	0,0006	0,0009	0,0007		

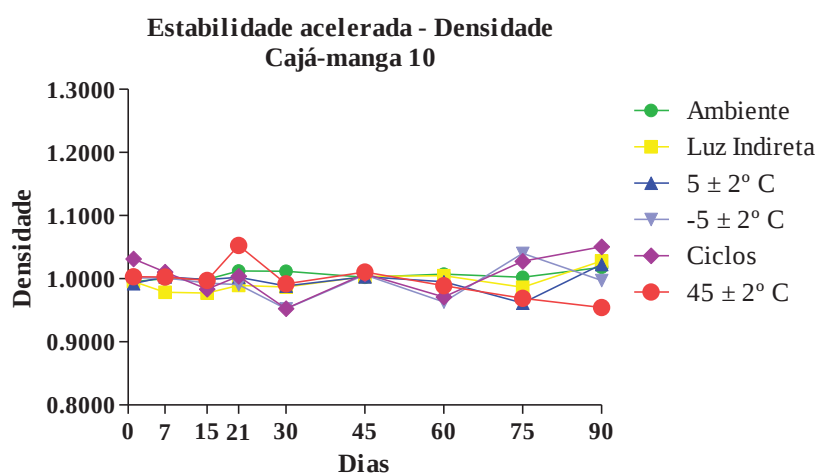
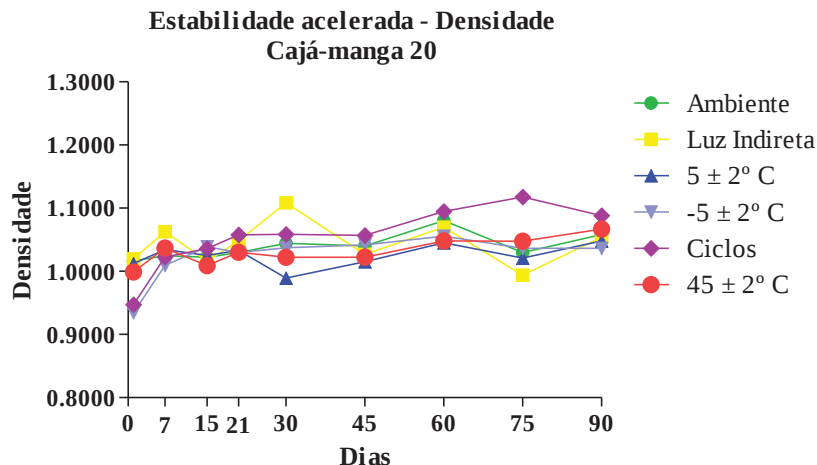


Gráfico 3.8 Valores de densidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.11 Valores médios de densidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 20								
1	1,0164	1,0198	1,0121	0,9344	0,9473	0,9988	0,0343	0,0012
7	1,0248	1,0629	1,0345	1,0094	1,0226	1,0368	0,0165	0,0003
15	1,0223	1,0159	1,0253	1,0388	1,0361	1,0091	0,0105	0,0001
21	1,0296	1,0482	1,0330	1,0297	1,0576	1,0301	0,0109	0,0001
30	1,0444	1,1084	0,9893	1,0372	1,0584	1,0223	0,0362	0,0013
45	1,0402	1,0268	1,0153	1,0420	1,0570	1,0224	0,0489	0,0024
60	1,0802	1,0697	1,0454	1,0555	1,0949	1,0482	0,0178	0,0003
75	1,0296	0,9141	1,0209	1,0365	1,1177	1,0475	0,0599	0,0036
90	1,0583	1,0539	1,0481	1,0363	1,0883	1,0670	0,0162	0,0003
DP	0,0190	0,0507	0,0469	0,0338	0,0467	0,0199		
VAR	0,0004	0,0026	0,0022	0,0011	0,0022	0,0004		

**Gráfico 3.9** Valores de densidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

3.2.2.5 Determinação e avaliação da viscosidade

A viscosidade é a expressão da resistência de um material aforças que causem deformação ou escoamento, ou seja, a viscosidade expressa o deslocamento de parte das

moléculas do material analisado sobre moléculas vizinhas. A propriedade oposta da viscosidade é denominada fluidez; assim, é possível dizer que a viscosidade é a resistência do material, em fluir. A viscosidade depende das características físicoquímicas e das condições de temperatura do material (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; BRASIL, 2007).

Como observado nas Tabelas 3.12, 3.13 e 3.14 e Gráficos 3.10, 3.11 e 3.12 pequeno desvio padrão e variância da viscosidade aparente, durante o estudo, ocorreu para a condição de estresse térmico nos ciclos de congelamento e descongelamento, possivelmente devido a erros na determinação, uma vez que não foram observadas alterações significativas nas demais condições. Os fitocosméticos podem ser considerados estáveis segundo este ensaio. Os valores em triplicata de cada análise constam dos anexos 20 a 25.

Tabela 3.12 Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 5								
1	1,54	1,25	1,51	1,67	1,70	1,55	0,15	0,02
15	1,43	1,13	1,45	1,47	1,12	1,65	0,19	0,04
30	1,41	1,06	1,40	1,30	1,16	1,67	0,20	0,04
60	1,35	1,27	1,26	1,48	1,28	1,49	0,10	0,01
90	1,32	1,07	1,15	1,35	1,18	1,42	0,12	0,02
DP	0,08	0,09	0,13	0,13	0,21	0,09		
VAR	0,01	0,01	0,02	0,02	0,05	0,01		

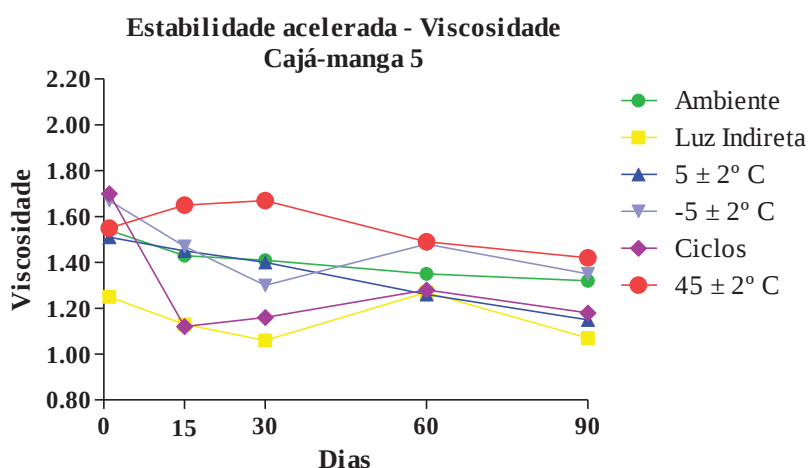


Gráfico 3.10 Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 5% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.13 Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 10								
1	1,44	1,45	1,54	1,55	1,70	1,80	0,13	0,02
15	1,43	1,01	1,41	1,37	1,06	1,57	0,20	0,04
30	1,42	1,10	1,35	1,59	1,19	1,72	0,21	0,05
60	1,23	1,21	1,15	1,29	1,14	1,72	0,20	0,04
90	1,20	1,05	1,09	1,16	1,13	1,57	0,17	0,03
DP	0,11	0,16	0,17	0,16	0,23	0,09		
VAR	0,01	0,02	0,03	0,03	0,05	0,01		

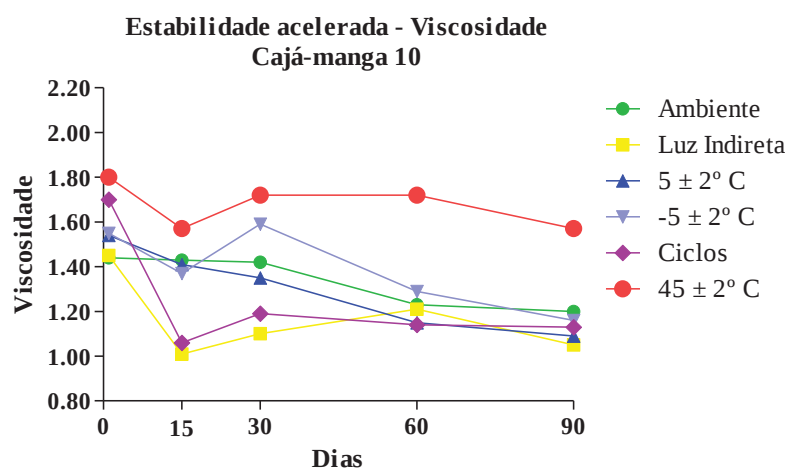


Gráfico 3.11 Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 10% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Tabela 3.14 Valores médios de viscosidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Dia	Ambiente	Luz ind.	5 ± 2° C	-5 ± 2° C	Ciclos	45 ± 2° C	DP	VAR
CR cajá-manga 20								
1	1,35	1,35	1,46	1,17	1,80	1,98	0,28	0,08
15	1,34	1,06	1,33	1,22	1,23	1,66	0,18	0,03
30	1,36	1,12	1,26	1,37	1,21	1,73	0,19	0,04
60	1,22	1,09	1,15	1,51	1,04	1,38	0,16	0,03
90	1,16	1,03	1,05	1,25	1,01	1,61	0,21	0,04
DP	0,08	0,11	0,14	0,12	0,28	0,19		
VAR	0,01	0,01	0,02	0,01	0,08	0,04		

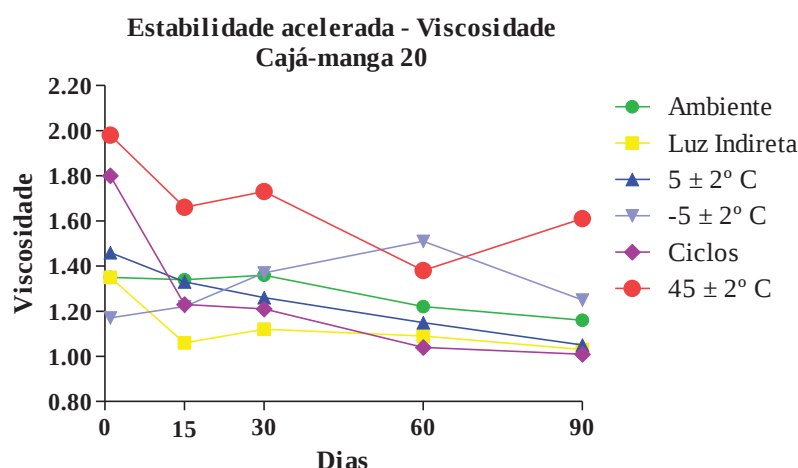


Gráfico 3.12 Valores de viscosidade do fitocosmético contendo 20% de extrato no ensaio de estabilidade acelerada

Na análise da área de histerese das amostras, foram determinadas a tixotropia, propriedade que indica o grau de recuperação das amostras após o cisalhamento (Gráfico 3.13).

Se o sistema não se recupera ou se recupera lentamente, isto pode representar a liberação de ativos, que estariam biodisponíveis para permeação na pele. Ao contrário, a imediata recuperação representa menor liberação de ativos, o que representa sua baixa biodisponibilidade para permear a pele.

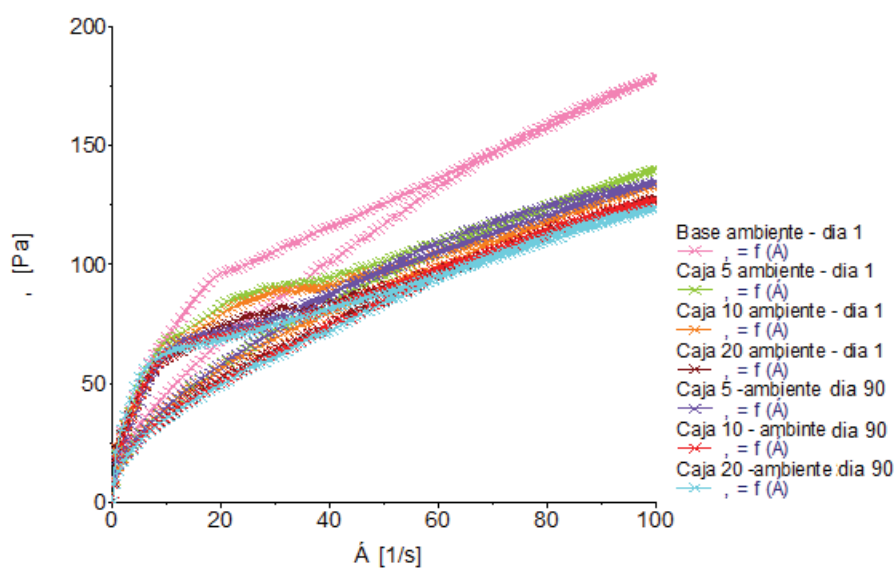


Gráfico 3.13 Reograma da curva de fluxo do creme base e fitocosméticos no dia 1 e fitocosméticos no dia 90

3.2.3 Avaliação da atividade antioxidante dos fitocosméticos

Os fitocosméticos adicionados do extrato antioxidante mais ativo foi submetido à avaliação de atividade antioxidante através do ensaio do DPPH•, visando confirmar a eficácia dos extratos quando incorporados nas preparações. As diferentes concentrações do extrato nas preparações teve como princípio investigar possíveis interferências quando da incorporação do extrato na base, entretanto, foi verificado que todas as amostras apresentaram porcentagem de inibição do radical DPPH• em ordem crescente segundo a concentração utilizada, sendo assim, é observado que a preparação contendo 5% de extrato foi suficiente para garantir a inibição de 50% do radical, reproduzindo os resultados obtidos nas avaliações do extrato M20 EtOH 70° GL, concentraçãode atividade na análise de 0,651 mg/mL.

A Tabela 3.15 e o Gráfico 3.14 mostram os valores de absorvância utilizados para o cálculo da porcentagem de inibição do radical DPPH• obtida nos ensaios com os fitocosméticos e creme base.

Tabela 3.15 Valores de absorvância e porcentagem de inibição no ensaio de atividade antioxidante dos fitocosméticos

	Absorvância (nm)	Inibição (%)
DPPH•	0,573	0,00
Creme base	0,547	4,60
Creme cajá 5	0,240	58,17
Creme cajá 10	0,156	72,72
Creme cajá 20	0,075	86,97

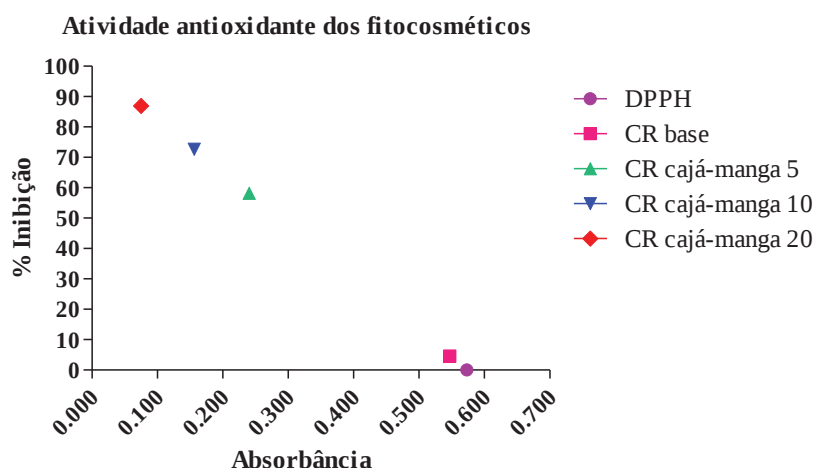


Gráfico 3.14 Valores de absorvância e porcentagem de inibição no ensaio de atividade antioxidante dos fitocosméticos

3.2.4 Avaliação do fator de proteção solar dos fitocosméticos

Mansur e colaboradores (1986) realizaram ensaios de avaliação *in vivo* e *in vitro* para determinação de fator de proteção solar (FPS). Os autores comprovaram, através dos resultados obtidos, correlação aceitável entre os valores encontrados de FPS dos filtros solares e bronzeadores, apresentados na forma de emulsão, em testes em humanos e nos ensaios espectrofotométricos. O FPS estimado por espectrofotometria de absorção no ultravioleta fornece resultados que avalia o filtro de acordo com a altura, largura e localização da sua curva de absorção dentro do espectro no ultravioleta. Portanto, para avaliarmos um protetor solar pela espectrofotometria, não basta vermos a curva de absorção, é necessário calcular o fator de proteção solar (MANSUR *et al.*, 1986).

Entre todos os ensaios *in vitro* para determinação do FPS, o ensaio de análise por espectrofotometria de UV consiste em um processo simples, rápido, barato e sem riscos, através do qual se pode conhecer o espectro de absorção de filtro solar e calcular o seu fator de proteção. Esse método tem grande aplicação na previsão do fator de proteção antes de se realizarem os testes *in vivo*, reduzindo, assim, os riscos em seres humanos.

Os resultados obtidos nos ensaios de determinação do valor de FPS dos fitocosméticos CR cajá-manga 5, CR cajá-manga 10 e CR cajá-manga 20 estão descritos na Tabela 3.16. Os valores de absorvância e os cálculos do fator de proteção encontrados para cada

fitocosmético, creme base, creme base incorporado de 5% de metoxicinamato de octila e fitocosmético CR cajá-manga 20 incorporado de 5% de filtro metoxicinamato de octila na banda de absorção entre 290-320 nm são mostrados nos anexos 26 a 31.

Tabela 3.16 Valores de fator de proteção solar do creme base e fitocosméticos

Fitocosméticos	Valores de FPS
Creme base	0,069
Creme cajá-manga 5%	0,463
Creme cajá-manga 10%	0,792
Creme cajá-manga 20%	1,821

Ramos e colaboradores (1996) prepararam soluções a 10% de diferentes extratos vegetais secos (*Hamamelis virginiana*, *Rhamnus purshiana*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Matricaria recutita*, *Aesculus hippocastanum*) e obtiveram baixos valores de FPS. A incorporação de 2% de metoxicinamato de octila (FPS 4) em cada solução de extrato promoveu aumento do fator de proteção solar quando comparado aos FPS encontrados para os extratos individualmente, concluindo que a mistura de extratos com filtro sintético pode resultar em sinergismo de ação quanto à fotoproteção.

Com base neste estudo, o fitocosmético CR cajá-manga 20 (maior valor de FPS) foi incorporado de 5,0% de metoxicinamato de octila. Os valores aproximados de FPS obtidos para o creme base adicionado de 5,0% de filtro e utilizado como padrão foi igual a 10 e para o fitocosmético adicionado de filtro foi igual a 12. Os antagonistas de radicais livres são substâncias bem conhecidas por suas propriedades antioxidantes. Sua presença atenua ou suprime as reações químicas devidas às radiações solares que não foram filtradas. Sozinhos, eles não são suficientemente protetores, mas eles acompanham freqüentemente os filtros. São especialmente: o α -tocoferol, o β -caroteno, os flavonóides e os extratos ou óleos vegetais que os contêm (PEYREFITTE *et al.*, 1998). De acordo com esses resultados, foi possível observar que extratos incorporados a cosméticos contendo filtros sintéticos podem contribuir para a diminuição dos filtros sintéticos na formulação. Entretanto, nota-se que o extrato foi utilizado em alta concentração para a obtenção de um FPS de baixo valor.

CAPÍTULO 4

4.1 CONCLUSÃO

- ✓ O material vegetal foi identificado como *Spondias dulcis* PARKINSON;
- ✓ Foram obtidos 14 extratos por diferentes métodos extrativos, utilizando como solventes etanol e etanol 70° GL, apresentando maiores rendimentos os extratos R 10 EtOH 70° GL, M 10 EtOH 70° GL e M 20 EtOH 70° GL;
- ✓ A atividade antioxidante dos 14 extratos de pH ácido e a absorvidade na região do ultravioleta deve-se à presença de compostos fenólicos, rutina e ácido clorogênico, identificados no ensaio de triagem e técnicas cromatográfica (CCD) e espectrofotométrica;
- ✓ Os extratos obtidos por maceração com EtOH 70° GL não foram citotóxicos e não possuem potencial significativo para induzir danos ao DNA;
- ✓ A presença de rutina e ácido clorogênico foi confirmada nos cromatogramas obtidos por CLAE-UV para o extrato M 20 EtOH 70° GL;
- ✓ O extrato M 20 EtOH 70° GL apresentou maior atividade antioxidante e foi escolhido para o desenvolvimento do fitocosmético por apresentar maior segurança e eficácia;
- ✓ Foram desenvolvidos fitocosméticos adicionados de extrato de frutos de *S. dulcis* com potencialidade pouco explorada e nunca estudada para tal finalidade;
- ✓ A atividade antioxidante do extrato M 20 EtOH 70° GL foi confirmada nos fitocosméticos adicionados de 5, 10 e 20% de extrato;
- ✓ O estudo da estabilidade mostrou que os fitocosméticos, em todas as concentrações e o creme base apresentaram estabilidade durante o período de avaliação e sob condições extremas;
- ✓ Foi verificada baixa atividade fotoprotetora dos fitocosméticos mas a possibilidade de associação com filtros de origem sintética de forma sinérgica;
- ✓ Os ensaios de atividade cosmética mostraram que os fitocosméticos foram ativos possibilitando sua utilização na prevenção do envelhecimento cutâneo.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLE, M. H. ;SINGH R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.SAntioxidant activity of the extracts from Dillenia indicafruits. *Food Chem.*, v.90, p.891-896, 2005.

AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Botanical antioxidants for chemoprevention of photocarcinogenesis. *Front. Biosci.*, v.1, p.784-792, 2002.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN JR., L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 2000. p.516-518.

AMER, M.I.; RUBIOLO, A.C. Influencia delproceso de congelaciónenlavariación de la vitamina C durante elalmacenamiento de frutillas congeladas In: **Congreso Ibero-Americano de Ingenieria de Alimentos**. Bahía Blanca - Argentina. Anais, 1998.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commuly consumed in Brazil end estimated by the brazilian population. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 1124-1131, 2004.

ARNAIZ, R.R. **Las Toxinas Ambientales e Sus Efectos Genéticos**. 2.ed. México: IEPSA, 1997, 95 p.

ARORA, R.; NAIR, M.G.; TRASBURG, G.M. Structure–activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*,v. 24, n. 9, p. 1355-1363, 1998.

ARTS,M.J.T.J.;HAENEN, G.R.M.M.; VOSS,H.P.; BAST, A.Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein. *Food Chem. Toxicol.*, v. 39, p. 787–791, 2001.

AZIZAH, A. H.; RUSLAWATTI, N. M.; TEE, T. S. Extraction and caracterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chem.*, v. 64, n. 2, p. 199-202, 1999.

BARBOSA, W.C.; NAZARÉ, R.F.R.; HASHIMOTO, K. Bromatological and technological study of the graviola and caja.EMBRAPA. *Boletim de Pesquisa*, v. 32, p.15, 1981.

BARREIROS, L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Quim.Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BARRETO G. P.M.; BENASSIB, M.T.; MERCADANTE, A.Z. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 10, p. 1856-1861, 2009

BARROSO, G. M. et al. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. 2. ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 2002. v. 1, 309p.

BARTH, A. L. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos. [Dissertação]. Faculdade de Farmácia, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2000.

BASU, S. Some structural studies on degraded *Spondias dulcis* gum. **Carbohydr.Res**, v. 81, p. 200-201, 1980.

BASU, S.; RAO, C.V.N. Structural investigation on degraded *Spondias dulcis* gum. **Carbohydr.Res.**, v. 94, p.215-24, 1981.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BLACK, J. Biological performance of material. In: **Fundamentals of Biocompatibility**, New York: Marcel Dekker, 1992.

BLOIS, H. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature.**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licanialicaniaeflora*. **J. Ethnopharmacology**, v. 79, p.379-81, 2002.

BRAND- WILLIAM, W.; CUVELIER, M.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Brasília, 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Cosméticos. RDC Nº 343, de 13 de dezembro de 2005. Brasília, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência Geral de Cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para avaliação da segurança de produtos cosmético. 2003. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/guia/index.html>>. Acesso em 25 de agosto de 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento técnico sobre protetores solares em cosméticos. Resolução RDC Nº237, de 22 de agosto de 2002. Disponível em: <http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=18298&word=>. Acesso em 28 agosto de 2011.

BRASIL. Diário Oficial da União – DOU. Brasília, 08/10/1999.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BUCHHOLZ, G.; EHMANN, B.; WELLMANN, E. Ultraviolet light inhibition of phytochrome-induced flavonoid biosynthesis and DNA photolyase formation in mustard cotyledons. *Plant Physiol.*, v. 108, n. 1, p. 227-234, 1995.

BORS, W.; MICHEL, C.; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials: A pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol.Med.*, v. 19, n. 1, p. 45-52, 1995.

BUCHLI, L. Radicais livres e antioxidantes. *Cosmet. Toiletr.*, v. 14, n. 2 p. 54-57, 2002.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; O'NEIL, J.; CRAWFORD, S.; MORECROFT, I.; MCPHAIL, D.B.; LISTER, C.; MATTHEWS, D.; MACLEAN, M.R.; LEAN, M.E.; DUTHIE, G.G.; CROZIER, A. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolic content of red wines. *J. Agric. Food Chem.*, v. 48, n. 2, p. 220-230, 2000.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1991.

BURT, S. Essential Oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.*, v.94, p. 223 – 253, 2004.

BURTON, G.W.; TRABER, M.G.; ACUFF, R.V.; WALTERS, D.N.; KAYDEN, H.; HUGHES, L.; INGOLD, K.U. Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.67, p.669-84, 1998.

CADAHÍA, E.; CONDE, E.; SIMÓN, B. F.; GARCIA-VALLEJO, M. C. Changes in tannic composition of reproduction cork *Quercus suber* throughout industrial processing. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 6, p. 2332-2336, 1998.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing end regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, p. 179-189, 2000.

CARMELLO, S. M.; MACHADO, S. R.; GREGÓRIO, E. A. Ultrastructural aspects of the secretory duct development in *Lithraeamolleoides* (Vell.) Engl. (Anacardiaceae). *Rev. Bras. Bot.*, v. 18, p. 95-103, 1995.

CAROLLO, C.A. Análise fitoquímica e avaliação dos efeitos dos tipos de adubação, da radiação solar e do estresse hídrico, no acúmulo de metabólitos secundários em espécies do gênero *Mikania*. [Tese]. **Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP**, Ribeirão Preto, 2008

CARVALHO, V. L. G.; PACHIONI, V. M. Controle microbiológico em cosméticos. *Aerosol Cosmet.*, n.36, p.10-12, 1989.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 21, n. 1, p. 1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. *Lancet*, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.

CESARINI, J. P.; MICHEL, L.; MAURETTE, J.M.; ADHOUTE, H.; BÉJOT, M. Immediate effects of UV radiation on the skin: modification by an antioxidant complex containing carotenoids. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, v. 19, n. 4, p. 182-189, 2003.

CHANDLER, G.; GOOSEM, S. Aspects of rainforest regeneration III. The interaction of phenols, light and nutrients. *New Phytologist*, v. 92, n. 3, p. 369-380. 1982

CHANG, H.; SANDER, C.S.; MÜLLER, C.S.; ELSNER, P.; THIELE, J.J. Detection of poly(ADP-ribose) by immunocytochemistry: a sensitive new method for the early identification of UVB- and H₂O₂-induced apoptosis in keratinocytes. *Biol. Chem.*, v.383, p.703-708, 2002.

CHARLET, E. **Cosmética para farmacêuticos**. Zaragoza: Acribia, 1996, 192p.

CHAUDHARY, A.K.; NOKUBO, M.; REDDY, G.R.; YEOLA, S.N.; MORROW, J.D.; BLAIR, I.A.; MARNETT, L.J. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, v.265, p.1580-2, 1994.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 2005. 735p.

CHOI, Y. M.; NOH, D. O.; CHO, S. Y.; SUH, H. J.; KIM, K. M.; KIM, J. M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Lebensm. Wiss. Technol.*, v.39, p.756-761, 2006.

CLYDESDALE, G.J.; DANDIE, G.W.; MULLER, H.K. Ultraviolet light induced injury: immunological and inflammatory effects. *Immunol. Cell Biol.*, v.79, p.547-68, 2001.

COELHO, L. C. S. Protetor solar: desenvolvimento farmacotécnico e avaliação da eficácia e segurança. [Dissertação]. **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2005.

COHEN, S.M.; ROUSSEAU, M.E.; ROBINSON, E.H. Therapeutic use of Selected Herbs. *Holist. Nurs. Pract.*, v.14, n.3, p.59-68, 2000.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCIA-VALLEJO, M. C.; SIMÓN, B. F. Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different spanish provenances. *J. Agric. Food Chem.*, v. 46, n. 8, p. 3166-3171, 1998.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids- chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J. Nutr. Biochem*, v. 7, p. 66-76, 1996.

CORDOVA, C.A.; SIQUEIRA, I.R.; NETTO, C.A.; YUNES, R.A.; VOLPATO, A.M.; CECHINEL FILHO, V.; CURI-PEDROSA, R.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. Protective properties of butanolic extract of the *Calendula officinalis* L. (marigold) against lipid peroxidation of rat liver microsomes and action as free radical scavenger. **Redox Rep.**, v.7, p.95-102, 2002.

CORTHOUT, J.; PIETERS L. A.; CLAEYS, M.; VANDENBERGHE, D. A.; VLIETINCK, A. J. Antiviral ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry**, v.30, n.4, p. 1129-1130, 1991.

COSTA, A.F. **Farmacognosia III: Farmacognosia Experimental**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, 992p.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 6.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002.

CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. **J. Agric. Food Chem.**, v. 45, p. 590-595, 1997.

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.

DÄR, A. **Tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1981. p.141-142, 144-152, 366.

DA SILVA, J.; HEUSER, V.; ANDRADE, V. Biomonitoramento Ambiental. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. In: DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcanace, 2003. p167-178..

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

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutr.Rev.**, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibition of mutagenesis and carcinogenesis. **Mut.Res.**, v.402, p. 151-158, 1998.

DE LA SIENRAA, E.; ARMIENTAB, M.A.; GONSEBATT, M.E. Potassium dichromate increases the micronucleus frequency in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Environ. Pollut.*, v. 126, 2003.

DIFFEY, B.L. Indices of protection from in vitro assay of sunscreens. In: LOWE, N. J.; SHAATH, M. A.; PATHAK, M. A. **Sunscreens Development, Evaluation, and Regulatory Aspects**. New York: Marcel Dekker, p. 589-600, 1997.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.*, v. 17, p. 505-512, 2006.

DINIZ, D. J. C. Contribuição da tecnologia digital no estudo da insolação nas edificações. [Monografia]. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2002.

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plant extracts containing phenolic compounds. *Food Chem.*, v. 97, p. 654-660, 2006.

D'LEON, L.F.P. Estudos de estabilidade de produtos cosméticos. *Cosmet. Toiletr.*, v. 13, p. 54-64, 2001.

DOOMS-GOOSSENS, A. Cosmetics as Causes of Allergic Contact Dermatitis. *Cutis*, v. 52, p. 316-320, 1993

DRAELOS, D. Z. **Cosméticos em Dermatologia**. 2ed. Rio de Janeiro: Revinter. 1999. 245-254 p.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 82, p. 377-390, 1944.

EMBRAPA. Fruticultura de Sequeiro: uma janela para o desenvolvimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006. Disponível em: <http://www.cpatsa.embrapa.br:8080/public_electronica/downloads/INT73.pdf>. Acessado em 16-12-2010)

ENGLER, A. **Anacardiaceae: Anatomisches Verhalten**. Leipzig: Die Natürlichen Pflanzenfamilien Bd, 1896. p. 139-140.

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

EWALD, C. *et al.* Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. ***Food Chem.***, v. 64, p. 231-235, 1999.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic Press, 1979. 302p.

FALKENBERG, M.B. Quinonas. In: SIMÕES, C.M.O. et al.(Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/ UFRGS/ Ed. da UFSC, 2004. p.657-684.

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2 ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2001, pt 2.

FERREIRA, A. Controle de qualidade: da matéria-prima ao fitoterápico. ***Revista Racine***, v.72, p.68-78, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. ***Mutat. Res.***, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. ***Methods Mol. Med.***, v.111, p. 3-32, 2005.

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

FISHER, A.A. **Contact Dermatitis**, 2.ed. Philadelphia: Lea &Febiger, 1995.

FISHER, G.J; XU, Y. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. ***J. Dermatol. Sci.***, v. 1, S1-S8, 2005.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 153-158, 2007.

FORMAN, L.L.; SHAW, H.K.A. The Genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in Tropical Asia. **Kew Bull.**, v. 21, n. 1, p1-19, 1967.

FRANCO, S. L. Própolis: otimização do processo extrativo, controle de qualidade e obtenção de forma farmacêutica sólida. [Tese]. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara. 152f, 2001.

FRANKE, A. A.; COONEY, R.V.; CUSTER, L.J.; MORDAN, L.J.; TANAKA, Y. Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 48, p. 439-237, 1998.

FRANQUIN, S.; MARCELIN, O.; AURORE, G.; REYNES, M.; BRILLQUET, J.M. Physicochemical characterisation of the mature-green Golden apple (*Spondias cytherea* Sonnerat). **Fruits**, v.60, p.203-210, 2005

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 76, n. 12, p.1445-1447, 1999.

GARCIA, S.; SANTOS, E. P. Avaliação do FPS de produtos comerciais por método in vitro. **Rev. Bras. Farm.**, v. 71, n. 4, p. 99, 1990.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GELEIJSE, J.M.; LAUNER, L.J.; HOFMAN, A.; POLS, H.A.P.; WITTEMAN, J.C.M. The flavonoids may protect against atherosclerosis. **Arch. Inter. Med.**, v. 159, p. 2.170-2.174, 1999.

GIORDANI, R.B.; PAGLIOSA, L.B.; HENRIQUES, A.T.; ZUANAZZI, J.A.S. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (AMARYLLIDACEAE). **Quim. Nova**, v.31, n.8, p 2042-2046, 2008.

GRAHAM O.S., WICKHAM L.D., MOHAMMED M., Growth, development and quality attributes of miniature Golden apple fruit (*Spondias cytherea* Sonn). Part I: Fruit growth and development to maturity, **Food Agric. Environ.** v.2, p. 90–94, 2004.

GIL, M. I.; HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Changes in strawberry anthocyanins and other polyphenols in response to carbon dioxide treatments. *J. Agric. Food Chem.*, v. 45, n. 5, p. 1662-1667, 1997.

GITZ, D. C.; LIU, L.; MCCLURE, J. W. Phenolic metabolism, growth and UV-B tolerance in phenylalanine ammonia lyase inhibited red cabbage seedlings. *Phytochemistry*, v. 49, n. 2, p.377-386, 1998.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, v. 30, p. 374-81, 2007.

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira**. 13. ed. São Paulo: NOBEL, 2007. 446 p

GOMES, A.J.; LUNARDI, C.N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A.C. The antioxidant action of Polypodium leucotomos extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.34, p.1487-94, 2001.

GOUADO, I.; ABA EJOH, R.; SOMÉ ISSA, T.; SCHWEIGERT, F.J.; TCHOUANGUEP, M.F. Carotenoids content of some locally consumed fruits and yams in Cameroon. *Pakistan Journal of Nutrition*, v. 6, p. 497-501, 2007.

GRAY, D.E.; PALLARDY, S.G.; GARRET, H.E.; ROTTINGHAUS, G.E. *Planta Med.*, v. 69, p. 1024, 2003.

GREGOLIM, M.T.; CHIARI, B.G.; RIBEIRO, H.M.; ISAAC, V.L.B. Caracterização reológica de géis hidrofílicos. In: **25º Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2008, São Paulo. CD-Rom.

GUEDES, M. C. Antocianinas: pigmento natural ou remédio?.*Rev. Cien.*,v.2, n.2, p. 71- 73, 2004.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre- Florianópolis: Editora da Universidade, 2001. p.13-40.

GUTIÉRREZ G. O. et al. 1D- and 2D-NMRspectroscopy studies of the polysaccharide gumfrom *Spondias purpurea* var. *Lutea*. *Food Hydrocolloids*, v. 19, p. 37-43, 2005.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 35, n. 1-2, p. 7-20, 1995.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals Biology and Medicine**. 3 ed. New York: Oxford Science Publications, 2000. 936p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford University Press: Oxford, 2007.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, p. 845-850, 1994.

HARALAMPUS-GRYNAVISKI, N.; RANSOM, C.; YE, T.; RÔZANOWSKA, M.; WRONA, M.; SARNA, T.; SIMON, J.D. Photogeneration and quenching of reactive oxygen species by urocanic acid. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p.3461-8, 2002

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504. 2000.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environ. Mol. Mutagen**, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNDI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mut. Res.**, v. 245, 1990.

HECK, D.E.; VETRANO, A.M.; MARIANO, T.M.; LASKIN, J.D. UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 278 p.22432-6, 2003.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, M. D.; TUCKER, J. D.; VANPRAIS, PH.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as a index of Cytogenetic Damage: past, present and future. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 18, 1991

HENRIQUES, C.; ALIAGA, C. LISI, E. Formation and decay of the ABTS derived radical cation: a comparison of different preparations procedures. *Int. J. Chem. Kinet.*, v.34, n.12, p.659-665, 2002.

HERRERO, M. et al. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chem.*, v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.

HERTOG, M.G.L. Epidemiological evidence on potential health properties of flavonoids. *Proc. Nutr. Soc.*, v. 55, p. 385-397, 1996.

HOEBEE, B; STOPPELAAR, J. M. The isolation of rat chromosome probes and their application in cytogenetic tests. *Mutat. Res.*, n. 372, 1996, p.205-210.

HOSSAIN, S.J.; TSUJIYAMA, I.I.; TAKASUGI, M.; ISLAM, M.A.; BISWAS, R.S.; AOSHIMA, H. Total phenolic content, antioxidant, anti-amylase, anti-glucosidase and antihistamine release activities of Bangladesh. *Fruit Science Food. Technol. Res.*, v. 14, n. 3, p.261-268, 2008

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 6, p. 1841, 2005.

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

IBÁÑEZ, E. et al. Supercritical fluid extraction and fractionation of different preprocessed rosemary plants. *J. Agric. Food Chem.*, v. 47, n. 4, p.1400-1404, 1999.

ICHILHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. *Toxicol.*, v.189, p.21-39, 2003

IDSON, B. Stability testing of emulsions. *Drug Cosmet. Ind.*, v. 103, n.12,1988, p.35-8.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. I *Drug Cosmet. Ind.*, v. 142, n.1, 1993a, p. 27-8.

IDSON, B. Stability testing of emulsions. II *Drug Cosmet. Ind.*, v. 142, n.2, 1993b, p. 38-43.

IHA, S. M. *et. al.* Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. **Rev. J. Phar.** v.18, n. 3, p. 387-393, 2008.

ISAAC, V.L.B. Desenvolvimento, estabilidade e liberação in vitro de preparações lipolíticas. [Tese] **Faculdade de Ciências Farmacêuticas** - USP, São Paulo, 1998.

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

ISAAC,VLB, MIGLIOLI,KQ, SOUZA, TM, MOREIRA,RRD, ANDREO, MA, WILEGAS, V. Potencial atividade antioxidante do extrato dos frutos de cajá-manga (*Spondias lutea*). **XVII Congresso Latino Americano e Ibérico de Químicos Cosméticos**, Cusco, Peru, 2005, CR-ROM.

ISHAK, S.A.; NORAYATI, I.; HANISAH, A.M.N.A. Some physical and chemical properties of ambarella (*Spondiascytherea* Sonn.) In three different stages of maturity. **J Food Compost Anal**, v. 18, p.819-827, 2005.

JÁCOME, R.L.R.; OLIVEIRA, A.B.O.; RASLAN, D.S.; MULLER, A.; WAGNER, H. Análise de naftoquinonas em extratos brutos de raízes de *Zeyheria montana* M. (Bolsa-de-pastor). **Quim. Nova**, v.22, p.175-177, 1999.

JANICK, J.; PAULL, R.E. **The Encyclopedia of Fruit e Nuts**. London: British Library, UK, 2008, p. 29-31, 180 p.

JAYAPRAKASAM, B. *et. al.* Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 1, p. 28-31, 2005.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. ed. São Paulo: Editora Nacional, 2002. 777 p.

JULKUNEM-TIITO, R. Phenolic constituents in the leaves of northern willows, methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, n. 2, p. 213-217, 1985.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidant properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chem.**, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

JUNG, C. H.; SEOG, H.M.;CHOI, I.W.;PARK, M.W.; CHO, H.Y.Antioxidant properties of various solvent extracts from wild ginseng leaves. *LWT - Food Sci. Technol.*, v. 36, n. 3, p. 266-274, 2006.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, v.51, n. 3, p. 628-633, 2003.

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.

KATCH, F. I.; McARDLE, W. D. **Nutrição, Exercício e Saúde**. 4. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1996.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Int J Food Sci Technol*, v. 37, p. 153–161, 2002.

KIM, S. Y.;JEONG, S.M.; PARK, H.P.; NAM, K.C.; AHN, D.U.; LEE, S.C.Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. *Food Chem.*, v. 97, n. 3, p. 472-479, 2006.

KISHI, M.; HORINGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutat. Res.*, v. 278, 1992

KNEKT, P.;JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; MAATELA, J.Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit. Med. J.*, v.312, p.478-481, 1996.

KNEKT, L.G.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, M.; HELLOVAARA, L.; TEPPPO, E.; PUKKALA, A.; AROMA, A. Dietary Flavonoids and the Risk of Lung Cancer and Other Malignant Neoplasms. *Am. J. Epidemiol.*, v. 146, n. 3, p. 223-230, 1997.

KORKINA, L.G.; AFANAS'EV, I.B. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. In: SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 151-179.

KOHEN, R.; FANBERSTEIN, D.; TIROSH, O. Reducing equivalents in the aging process. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, v.24, p.103-23, 1997

KRAUS, T.E.C.; DAHLGREN, R.A.; ZASOSKI, J.Z. Tannins in nutrient dynamics of forest ecosystem - a review. **Plant and Soil**, v. 256, p.41-66, 2003.

KUHN, A.; FEHSEL, K.; LEHMANN, P.; KRUTMANN, J.; RUZICKA, T.; KOLB-BACHOFEN, V. Aberrant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV irradiation in cutaneous lupus erythematosus. **J. Invest. Dermatol.**, v.111, p.149-53, 1998.

KURODA, Y.; HARA, Y. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. **Mutat. Res.**, v. 436, p. 69-97, 1999.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Cien. Tecnol. Alim.**, v.25, n.4, p.726-732, 2005.

LAGE, B. L.; CADAHÍA, B. P.; FELPETO, J.M. Influencia de determinados polimorfismos de enzimas metabólicas en la genotoxicidad del estireno. Departamento de Biología Celular y Molecular Universidade da Coruña. **An. R. Acad. Nac. Farm.**, 2004.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A. G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **J. Food Engin.**, v. 71, n. 2, p. 214-222, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 1995.

LEON, J.; SHAW, P. E. *Spondias*: the red mombin and related fruits. In: NAGY, S.; SHAW, P. E.; WARDONSKI, F. W. (Ed.). **Fruits of tropical and subtropical origin**: composition, properties and uses. Lake Alfred: Florida Science Source, 1990. p. 117-126 p.

LEVIN, D.A. Plant phenolics: An ecological perspective. **Am. Nat.**, v.105, n.942, p.157-181, 1971.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

LIM, Y.Y.; LIM, T.T.; TEE, J.J. Antioxidant properties of several tropical fruits: A comparative study. **Food Chem.**, v.103, p.1003-1008, 2007.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A.; LIMA, D. E. S. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. **Sci. Agric.**, v. 59, n. 3, 2002.

LINTON, S.; DAVIES, M.J.; DEAN, R.T. Protein oxidation and ageing. **Exp. Gerontol.**, v.36, p.1503-18, 2001.

LORAY, Z. Vitamina C: antioxidante e protetor de colágeno. **Rev. Cosm. Estet.**, v. 7, n. 4, p. 15-17, 1999.

LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. **J Sci Food Agric.**, v.83, p.496-502, 2003. DOI: 10.1002/jsfa.1365

MACHADO, S. R.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. Estrutura e desenvolvimento de canais secretores em frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Acta Bot. Bras.**, v. 15, p. 189-195, 2001.

MADDEN, J. M.; JACKSON G. J. Cosmetic preservation and microbes: viewpoint of the Food and Drug Administration. **Cosmet. Toiletr.**, v.96, n.10, p.75-7, 1981.

MANSUR J. S. BREDER, M.N.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **An. Bras. Derm.**, v. 61, n. 4, p. 121-124, 1986.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. I. Antioxidant activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chem.**, v. 58, n. 3, p. 245- 248, 1997.

MARTINEZ-FLORES, S.S. **O Neem – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção**. 1ed. Londrina: Iapar, 2002.

MARTÍNEZ, M.; LEÓN, G.P.; SANABRIA, L.; BELTRÁN, O.; IGARTUBURU, J.M.; BAHSAS, A. Structural features of an arabinogalactan gum exudates from *Spondias dulcis* (Anacardiaceae). **Carbohydr. Res.**, v. 338, p. 619-624, 2003

MATSUI, T.; EBUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; FUKUI, K.; SUGITA, K.; TERAHARA, N.; MATSUMOTO, K. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki can be achieved through the α -glucosidase inhibitory action. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 25, p. 7244-7248, 2002.

MAU, J. L.; TSAI, S. Y.; TSENG, Y. H.; HUANG, S. J. Antioxidant properties of methanolic extracts from *Ganoderma tsugae*. **Food Chem.**, v. 93, n. 4, p. 641-649, 2005.

MAZZA, G.; KAY, C.D.; COTTREL, T.; HOLUB, B.J. Absorption of anthocyanins from blueberries and serum antioxidant status in human subjects. **J.Agric. FoodChem.**, v.50, p.7731-7737, 2002.

METCALFE, C. F.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses**. Oxford:Clarendon Press, 1950. v. 1. 724p.

MILLER, N. J.; RICE-EVANS, C. A.; DAVIES, M. J.; GOPINATHAN, V.; MILNER, A.A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clin. Sci.**, v. 84, p.407-412, 1993.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência**. São Paulo: Editora Unesp, 1996. p. 69-86.

MIRELES-ROCHA, H.; GALINDO, I.; HUERTA, M.; TRUJILLO-HERNÁNDEZ, B.; ELIZALDE, A.; CORTÉS-FRANCO, R. UVB photoprotection with antioxidants: effects of oral therapy with d-alpha-tocopherol and ascorbic acid on the minimal erythema dose. **ActaDerm.Venereol.** v.82, p.21-4, 2002.

MODAK, B.; CONTRERAS, M.L.; GONZÁLES-NILO, F.; TORRES, R. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from the resinous exudate of *Heliotropium sinuatum*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.15, n.2, p.309-312, 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH•) for estimating antioxidant activity. **J. Sci. Technol.** v.26, n.2, 2004, p. 211-19.

MONTAGNER, S.; COSTA, A. Bases biomoleculares do fotoenvelhecimento. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 3, p. 263-269, 2009.

MONTANARI JR., I. **Aspectos da produção comercial de plantas medicinais nativas**. 2002. Disponível no site: <http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/index.html>. Acesso em 28 de novembro de 2010.

MONTENEGRO, M.A.; NAZARENO, M.A.; DURANTINI, E.N.; BORSARELLI, C. D. Singlet molecular oxygen quenching ability of carotenoids in a reverse-micelle membrane mimetic system. **Photochem.Photobiol.**, v.75, p.353-61, 2002.

MONTORO, P.; BRACA, A.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids isolated from different plant species. **Food Chem.**, v. 92, p. 349-355, 2005.

MOURE, A. et al. Evaluation of extracts from *Gevuina avellana* hulls as antioxidants. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 9, p. 3890-3897, 2000.

MUSCHIETTI, L.V.; MARTINO, V.S. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. In: YUNES, R.A.; CECINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Itajaí: Univali, 2007. p. 183-207.

NABEYRAT, E.; JONES, G.E.; FENWICK, P.S.; BARNES, P.J.; DONNELLY, L.E. Mitogen-activated protein kinases mediate peroxynitrite-induced cell death in human bronchial epithelial cells. **Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.**, v.284, p.L1112-20, 2003.

NAKAISHI, H.; MATSUMOTO, H.; TOMINAGA, S.; HIRAYAMA, M. Effects of black currant anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. **Altern. Med. Rev.**, v. 5, n. 6, p. 553-562, 2000.

NESSA, F.; ISMAIL, Z.; MOHAMED; N.; HARIS, M.R.H.M. Free radical-scavenging activity of organic extracts and of pure flavonoids of *Blumea balsamifera* DC leaves. **Food Chem.**, v. 88, n. 2, p. 243-252, 2004.

NETO, J. X. A.; MEDEIROS, F. P. M.; MELO, A. J. M.; SILVA, J. C.; DANTAS, J.P. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. **Rev. Biol. Ciênc. Terra**. v. 5, 2005

NICOLETTI, M. A.; ORSINE, E. M. A.; ZAMUR, J.; TORTAMANO, N. Aspectos do emprego de fitoterápicos na higienização oral. Parte 1: Óleos essenciais. **Cosmet. Toiletr.**, v. 9, n. 5, p. 30-34, 1997.

NORTHUP, R.R.; YU, Z.; DAHLGREN, R.A.; VOGT, K.A. Polyphenol control of nitrogen release from pinne litter. **Nature**, v. 377, p.227-229, 1995.

NORTHUP, S.J. "Mammalian cell culture models in Handbook of Biomaterials Evaluation" In: **Scientific, technical and clinical testing of implant material**, Ed.: A.F. von Recun, p. 209-225, 1986.

NUUTILA, A. M.; KAMMIOVIRTA, K.; OKSMAN-CALDENTY, K. M. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chem.**, v.76, p. 519-525, 2002.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTONS, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur. J. Biochem.**, 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. **Toxicol. Lett.**, v. 102, p. 569-573, 1998.

OKIDA, F. *et al.* Estudo da prevalência de casos de câncer da pele e análise da eficácia da proteção solar na prevenção de lesões causadas por radiação ultravioleta em uma amostra da população. **An. Bras. Dermatol.**, v. 76, n. 4, p. 403-412, 2001.

OLIVEIRA, *et al.* Protetores solares, radiações e pele. **Cosmet.Toiletr.** (ed. Port.), v. 16, n. 2, p. 68-72, 2004.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais de antioxidantes. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PANNALA, A.S.; CHAN, S.T.; O'BRIEN, J.P.; RICE-EVANS, A.C. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.282, n.5, p.1161-1168, 2001.

PERES, L.E.P. **Metabolismo Secundário**. Disponível no site: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acesso em 28 de agosto de 2011.

PEYREFITTE, G.; MARTINI, C. M.; CHIVOT, M. **Cosmetologia/ Biologia Geral/ Biologia da Pele Estética Cosmética**. 1ed. São Paulo: Andrei, 1998. 329-424p.

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

PODDA, M.; WEBER, C.; TRABER, M.G.; PACKER, L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinones. *J. Lipid. Res.*, v.37, p.893-901, 1996.

PÓVOA FILHO, H. **Radicais livres em distúrbios neurológicos e no envelhecimento.** In: **Radicais livres em patologia humana.** Rio de Janeiro: Imago, 1995.

PÓVOA, L. G.; PÓVOA FILHO, H. **Radicais livres** (Generalidade) In: **Radicais livres em Patologia Humana.** Rio de Janeiro: Imago, p. 163-182, 1995.

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

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica.** 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1996. v.1, p.1113-1115, 1127.

QUIROGA, M.I.; GUILLOT, C.F. **Cosmética Dermatológica Prática.** 5.ed. Buenos Aires: Atheneu, 1987.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R. (Eds.). **Mutagenese Teratogenese e Carcinogenese: métodos e critérios de avaliação.** Ribeirão Preto: **Revista Brasileira de Genética**, 1991.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v.39, p.603-613, 2001.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHOHORN, S. E. **Biologia vegetal.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 906 p.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 26, n. 9-10, p 1231-1237, 1999.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagenese Ambiental.** Editora da ULBRA, Edição Única, 173-198, 2003.

RIBEIRO, R. P. et al. Avaliação do fator de proteção solar (FPS) in vitro de produtos comerciais e em fase de desenvolvimento. *Infarma*, v. 16, n. 7-8, p. 85-88, 2004.

RIBEIRO, R. P. Desenvolvimento e validação da metodologia de análise do teor de filtros solares e determinação do fps *in vitro* em formulações fotoprotetoras comerciais.[Dissertação]. Faculdade de Farmácia, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2004.

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. *Inter. J. Cosmet. Sci.*, v. 26, n.2, p. 47-59, 2004.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia aplicada a dermoestética**. 1 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.270p.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICHARDSON, S.J.; PRESS, M.C.; PARSONS, A.N.; HARTLEY, S.E. How do nutrients and warming impact on plant communities and their insect herbivores? A 9-year study from a subarctic heath. *J Ecol*, v. 90, n.3, p.544-556, 2002.

RIEGER, M.M. Teste de estabilidade para macroemulsões. *Cosmet. Toiletr.*, v.8, n.5, p. 47-53, 1996.

ROBARDS, K. *et. al.* Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, v. 66, n.4, p. 401-436, 1999.

ROCHA, L.O.; SOARES, M.M.S.R.; CORRÊA, C.L. Análise da contaminação fúngica em amostras de *Cassia acutifolia* Delile (sene) e *Pneumus boldus* (Molina) Lyons (boldo-do-chile) comercializadas na cidade de Campinas. *Rev Bras Cien Farmac*, v. 40, p. 521-527, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; KIMURA, M. Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). *Ciênc. Tecnol. Alim.*, v. 9, n. 2, p. 148-162, 1989.

ROPKE, C.D.; MEIRELLES, R.R.; DA SILVA, V.V.; SAWADA, T.C.; BARROS, S.B. Pothomorphe umbellata extract prevents alpha-tocopherol depletion after UV-irradiation. **J.Photochem. Photobiol.**, v.78, p.436-9, 2003.

ROSEN, C. F.; Topical and systemic photoprotection. **Dermatol. Ther.**, v. 16, p. 8-15, 2003.

ROY, C. R.; GIES, H. P.; TOOMEY, S. The solar UV radiation environment: measurement techniques and results. **J.Photochem. Photobiol.**, v. 31, p. 21-27, 1995.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS ^{•+}. Comunicado técnico. **Embrapa**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fortaleza, 2007.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; CALIXTO, F.D.S. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH[•]. Comunicado técnico. **Embrapa**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Fortaleza, 2007.

RUVOLO JÚNIOR, E. C. Proteção solar: comparação dos métodos de determinação por estes em humanos (in vivo), FDA, COLIPA, SAA. **Cosmetics On Line**, v.19, n.105, p.37-46, 1997.

SACRAMENTO, C. K.; MATOS, C. B.; SOUZA, C. N.; BARRETTO, W. S.; FARIA, J. C. Características físicas, físico-químicas e químicas de cajás (*Spondias mombin* L.) oriundos de diversos municípios da região sudeste da Bahia. **Magistra**, v. 19, n. 4, p. 283-289, 2007.

SACRAMENTO, C.K. do; SOUZA, F.X. **Cajá (*Spondias mombin* L.)**. Jaboticabal: Funep, 2. 42 p. (Série Frutas Nativas, 4), 2000.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 2001.

SÁNCHEZ, G. M.; DELAPORTE, R. H. **Sol e Saúde : Fotoproteção**. 1ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

SÁNCHEZ-MORENO, J.A.; LARRAURI, E.; SAURA, F.; CALIXTO. Um procedimento para medir a eficiência anti-radicalar de polifenóis. **J. Ciênc. Alim. Agric.**, v.76, p. 270-276, 1998.

SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; THADEO, M.; MEIRA, R.M.S.A; ASCENSÃO, L. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* forst. F. (Anacardiaceae) **Rev. Arv.**, v.30, n.3, p.481-489, 2006.

SANTOS S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: Simões, C.M.O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 2a ed. Porto Alegre: Ed. da UFRGS/UFSC, p. 517-544, 2000.

SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; BATISTA, F.; SANTOS, L.R.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H.D.; SERAPHIN, J.C. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 552-556, 2006.

SANTOS, E. P. et al. In vitro and in vivo determinations of sun protection factors of sunscreen lotions with octylmethoxycinnamate. **Int. J. Cosmetol. Scie.**, v. 21, p. 1-5, 1999..

SAYRE, R.M; AGIN, P.P; LEEVE, G.J; MARLOWE, E. A comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of suncreening formulas. **Photochem. Photobiol.** v.29, p. 559–566, 1979.

SCALFI, L; FOGLIANO, V; PENTANGELO, A; GRAZIANI, G; GIORDANO, I; RITIENI, A. Antioxidant activity and general fruit characteristics in different ecotypes of Corbarini small tomatoes. **J. Agric. Food Chem.**, v.48, p.1363–1366, 2000.

SCHARFFETTER-KOCHANKE, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Exp. Gerontol.**, v. 35, p.307-16, 2000.

SCHNITZLER, J. P. *et al.* Tissue localization of UV-B screening pigments and chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. **New Phytol.**, v. 132, p. 247-258, 1996.

SCHRAMM, D.D.; GERMAN, J.B. Potential effects of flavonoids on the etiology of vascular disease. **J. Nutr. Biochem.**, v.9, p.560-66, 1998.

SEERAM, N. P. *et al.* Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. **Phytomed.**, v. 8, n. 5, p. 362-369, 2001.

SEREJO, J. A. S. *et al.* **Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas**. Brasília (DF): Embrapa Informação Tecnológica, 2009

SHAIJI, F; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 281-319.

SHAW, H. K.A.; FORMAN, L. L.: The genus *Spondias* L. (Anacardiaceae) in tropical Asia. **Kew Bull.**, v. 21, n. 1, p. 1-20, 1967.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, E. L. *et al.* Quercetin metabolites inhibit copper ion-induced lipid peroxidation in rat plasma. **FEBS Lett.**, v.430, n. 3, p.405-408, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFSC, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.. **Farmacognosia: da planta a medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, 2004.

SIMONSEN, L.; JORGENSEN, A.; BENFELDT, E.; GROTH, L. Differentiated in vivo skin penetration of salicylic compounds in hairless rats measured by cutaneous microdialysis. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.21, p.379-88, 2004.

SINGLETON V.L., ROSSI J., Colorimetry of total phenols with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, **Am. J. Enol. Viticult.**, v.16, p.144–158, 1965.

SLESINSKI, R. S.; GUZZIE, P. J. Review of recent advances in the development and application of the micronucleus test. In: BALLANTYNE, B. **Perspectives in basic and applied toxicology**. London: John Wrieth, 1988.

SLOMINSKI, A.; PISARCHIK, A.; SEMAK, I.; SWEATMAN, T.; WORTSMAN, J.; SZCZESNIEWSKI, A.; SLUGOCKI, G.; MCNULTY, J.; KAUSER, S.; TOBIN, D.J.; JING, C.; JOHANSSON, O. Serotonergic and melatonergic systems are fully expressed in human skin. **FASEB J.** v.16, p.896-8, 2002. Epub 2002 Apr 23.

SMITH, M.L.; CHEN, I.T.; ZHAN, Q.; O'CONNOR, P.M.; FORNACE, A.J. JR. Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of u.v.-type DNA damage. **Oncog.**, v.10, p.1053-9, 1995.

SOUZA, F.X.de, SOUZA, F.H.L., FREITAS, J.B.S., ROSETTI, A.G. Aspectos morfológicos da unidade de dispersão de cajazeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n. 1, p. 215-220, 2000.

SOUZA, V. M. **Ativos Dermatológicos: Um Guia dos Novos Ativos Dermatológicos Utilizados na Farmácia de Manipulação, para Médicos e Farmacêuticos**. 2 ed. São Paulo: Tecnopress, 2004.

STAPLETON, A. E.; WALBOT, V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of UV radiation damage. **Plant. Physiol.**, v.105, p.881-889, 1994.

STICHER, O. Quality of Ginkgo preparations. **Plant.Med.**, v. 59, p. 2-11, 1993.

STOKES, R. Project sunscreen protection. In: GABARD, B.; ELSNER, P.; SURBER, C.; TREFFEL, P., (Eds). Dermatopharmacology of topical preparations. Berlin: **Springer**, 2000. cap. 21, p.365-382.

STREILEIN, J. W. *et. al.* Immune surveillance and sunlight-induced skin cancer. **Immunol. Today**, v. 15, p. 174-179. 1994.

SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes Micronucleus Assay in Europe. An international survey. **Mutat. Res.**, v. 392, 1997.

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. **Toxicol.**, v.22, p.760-770, 2008.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. **Biomed Pharmacother.**, v.58, p.100-10, 2004

TERAO, J.; PISKULA, M. K. Flavonoids and membrane lipid peroxidation inhibition. **Nutr.**, v.15, n. 10, p.790-791, 1999.

TERMENTZI, A.; KEFALAS, P.; KOKKALOU, E. Antioxidant activities of various extracts and fractions of *Sorbus domestica* fruits at different maturity stages. **Food Chem.**, v. 98, n. 4, p. 599-608, 2006.

TOLEDO, C. E. M. Estudos anatômico, químico e biológico de cascas e extratos obtidos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville, Leguminosae).[Dissertação].Faculdade de Ciências Farmacêuticas - **Universidade Estadual Paulista**, Araraquara, 2002.

TOMAINO, A.;CIMINO, V.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, PASQUALE, A.; SAIJA, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chem.**, v.89, n. 4, p. 549-554, 2005.

TRICHOPOULOU, A.;VASILOPOULOU, E.; HOLLMAN, P.; CHAMALIDES, C.H.; FOUFA, E.Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. **Food Chem.**, v. 70, p. 319-323, 2000.

TSUDA, T.;WATANABE, M.; OHSHIMA, K.; YAMAMOTO, A.; KAWAKISHI, S.; OSAWA, T.Antioxidants components isolated from the seed of tamarind (*Tamarindus indica* L.). **J. Agric. Food Chem.**,v. 42, n. 12, p. 2671 2674, 1994.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome Aberrations, Micronuclei, Aneuploidy, Sister Chromatid Exchanges and cancer risk assessment. **Mutat. Res.**, v. 365, 1996

TYLER, V.E. Phytomedicines: Back to the future. **J. Nat. Prod.**,v.62, p. 1589-1592, 1999.

UNITED STATES PHARMACOPEIA – The National Formulary – 25th edition, NF 20, S2, Rochville, 2002, CDROM.

URSINI, F.; MAIORINO, M.; MORAZZONI, P.; ROVERI, A.; PIFFERI, G. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 16, n. 5, p. 547-553, 1994.

VALFRÉ, H. Fitocosmética. **Cosmet. Toiletr.**, v.2, p.9-14, 1990.

VAN ACKER, F.A.A.; SCHOUTEN, O.; HAENEN, G.R.; VAN DER VIJGH, W.J.F.; BAST, A. Flavonoids can replace α -tocopherol as an antioxidant. **FEBS Lett.**, v. 473, p. 145-148, 2000.

VAN ACKER, S.A.; VAN DEN BERG, D.J.; TROMP, M.N.; GRIFFIOEN, D.H.; VAN BENNEKOM, W.P.; VAN DER VIJGH, W.J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; SILVA, M. A. M.; GOULART, M. O. F. Pró-antioxidantes e antioxidantes de baixo peso molecular oriundos da dita: estrutura e função. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, v. 31, n. 3, p. 95-118, 2006.

VEKIARI, S. A.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C. D. Oreganoflavonoids as lipidantioxidants. *J. Am. Oil Chem.Soc.*, v. 70, n. 5, p. 483-487, 1993.

VENNING, F. D. The ontogeny of thelaticiferous canals in the Anacardiaceae. *Am. J. Bot.*, v. 35, p. 637-644, 1948.

VOIGT, R.; BORNSCHEIN, M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. Zaragoza: Acribia, 1982. p.496-513, 769.

WAGNER, H.; BLADT S.; ZGAINSKI, E.M.; **Plant drug analysis**, New York-Tokyo: Springer-Verlag, 1984.

WARGOVICH, MJ.; WOODS, C.; HOLLIS, DM.; ZANDER, ME. Herbals, cancer prevention and health. *J. Nutr.*, v.131, p. 30345-30346, 2001.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E.L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: CALIXTO, J.B.; WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis, a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiol.*, v.126, p.485-493, 2001.

WILKINSON, J.B. Harry's cosmeticology. 7.ed. New York: Chemical, 1982.

YANG, C.S.; LANDAU, J.M.; HUANG, M.T.; NEWMARK, H.L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu.Rev. Nutr.*, v. 21, p. 381-406, 2001.

YASUI, H.; SAKURAI, H. Chemiluminescent detection and imaging of reactive oxygen species in live mouse skin exposed to UVA. *Biochem.Biophys. Res.Comm.*, v.269, p.131-6, 2000.

YILMAZ, Y; TOLEDO, R.T. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 2, p. 255-260, 2004.

YOCHUM, L.; KUSHI, L.H.; MEYER, K.; FOLSOM, A.R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **Am. J. Epidemiol.**, v. 149, n. 10, p. 943-949, 1999.

YOUNG, Y. S.; WOOSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **J. Clin. Pathol.**, v.54, n. 3, p. 176-186, 2001.

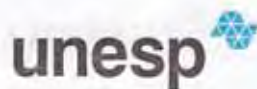
YOUNGSON, R. **Como combater os radicais livres: o programa de saúde dos antioxidantes**. Rio de Janeiro: Campus Ltda, 1995. 151p.

YUNES, R.A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal**. São Paulo: Argos, 2001. p. 317-346.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6a ed., Porto Alegre: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, p. 577-614, 2007.

ZUCCHI, T. M. A. D; POLI, P; DE MELLO, M. A; ZUCCHI, T. D; ZUCCHI, F. D; DE CASTRO, V. L. S. S. Biomarcadores: Sentinelas Ambientais. In: Binsfeld, P. C. (organizador). **Biossegurança em Biotecnologia**. Rio de Janeiro: Interciência, 2004, 367 p.

Anexo 01.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



Protocolo CEP/FCF/CAR nº 31/2010

Pesquisador: JOSÉ RICARDO SOARES DE OLIVEIRA

Orientador: Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac

Projeto: Padronização de extrato de *Spondia lutea* L. ("cajá-manga")
(Anacardiaceae) e determinação da atividade cosmética de sistema
emulsionado

Parecer nº 16/2011 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, considerou o protocolo para uso de animais na pesquisa "Padronização de extrato de *Spondia lutea* L. ("cajá-manga") (Anacardiaceae) e determinação da atividade cosmética de sistema emulsionado", apresentado pelo acadêmico José Ricardo Soares de Oliveira, sob orientação da Profa. Dra. Vera Lucia Borges Isaac do Departamento de Fármacos e Medicamentos, estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em dezembro de 2011, em formulário próprio para esse fim.

Araraquara, 08 de agosto de 2011.



Prof. Dr. CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Anexo 02. Valores de pH dos fitocosméticos em temperatura ambiente (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
Temperatura Ambiente															
Dias → Amostras↓	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	3,02	2,75	3,01	2,74	2,95	3,10	3,07	3,07	2,96	2,96	3,06	2,99	2,99	3,00	3,07
Cajá 5 ^b	3,01	2,76	3,04	2,74	2,94	3,12	3,08	3,00	2,97	2,96	3,06	3,01	3,01	3,03	3,06
Cajá 5 ^c	2,98	2,76	3,10	2,77	2,95	3,09	3,07	3,04	2,99	2,95	3,01	3,01	3,04	3,04	3,05
Cajá 5	3,00 ±	2,76 ±	3,05 ±	2,75 ±	2,95 ±	3,10 ±	3,07 ±	3,04 ±	2,97 ±	2,96 ±	3,04 ±	3,00 ±	3,01 ±	3,02 ±	3,06 ±
(M± DP)	0,02	0,01	0,05	0,02	0,01	0,02	0,01	0,04	0,02	0,01	0,03	0,01	0,03	0,02	0,01
Cajá 10 ^a	2,89	2,86	2,84	2,85	2,85	2,93	2,93	2,86	2,86	2,83	2,88	2,86	2,83	2,87	2,91
Cajá 10 ^b	2,89	2,90	2,84	2,80	2,83	2,97	2,92	2,86	2,84	2,83	2,87	2,86	2,80	2,90	2,91
Cajá 10 ^c	2,84	2,88	2,87	2,85	2,80	2,97	2,92	2,86	2,87	2,85	2,87	2,86	2,83	2,90	2,89
Cajá 10	2,87 ±	2,88 ±	2,85 ±	2,83 ±	2,83 ±	2,96 ±	2,92 ±	2,86 ±	2,86 ±	2,83 ±	2,87 ±	2,86	2,82 ±	2,89 ±	2,90 ±
(M± DP)	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,02	0,01	0	0,02	0,02	0,01	0	0,02	0,02	0,01
Cajá 20 ^a	2,79	2,82	2,78	2,80	2,73	2,84	2,81	2,75	2,70	2,72	2,77	2,74	2,71	2,75	2,80
Cajá 20 ^b	2,77	2,80	2,80	2,80	2,72	2,84	2,80	2,75	2,71	2,72	2,75	2,73	2,71	2,76	2,81
Cajá 20 ^c	2,79	2,79	2,76	2,80	2,72	2,83	2,80	2,75	2,69	2,71	2,76	2,73	2,68	2,75	2,81
Cajá 20	2,78 ±	2,80 ±	2,78 ±	2,80 ±	2,72 ±	2,84 ±	2,80 ±	2,75±	2,70 ±	2,72 ±	2,76 ±	2,73 ±	2,70 ±	2,75 ±	2,81 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0,02	0	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01

José Ricardo Soares de Oliveira

Anexo 03. Valores de pH dos fitocosméticos com incidência de luz indireta (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
Luz indireta															
Dias → Amostras↓	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	3,02	2,88	2,91	2,84	2,96	3,09	3,00	3,00	2,96	2,95	3,02	3,01	3,04	3,01	3,06
Cajá 5 ^b	3,05	2,86	2,89	2,88	2,92	3,12	3,07	3,01	3,01	2,96	3,00	3,00	3,00	3,01	3,09
Cajá 5 ^c	3,0	2,85	2,90	2,89	2,92	3,11	3,06	2,96	3,02	2,99	3,00	3,00	3,00	2,99	3,05
Cajá 5	3,02 ±	2,86 ±	2,90 ±	2,87 ±	2,93 ±	3,11 ±	3,04 ±	2,99 ±	3,01 ±	2,97 ±	3,01 ±	3,00 ±	3,01 ±	3,0 ±	3,07 ±
(M± DP)	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	0,01	0	0,02	0,01	0,02
Cajá 10 ^a	2,88	2,94	2,93	2,92	2,85	2,94	2,91	2,86	2,85	2,84	2,86	2,86	2,83	2,90	2,93
Cajá 10 ^b	2,86	2,96	2,91	2,93	2,85	2,96	2,91	2,87	2,82	2,83	2,87	2,84	2,82	2,88	2,91
Cajá 10 ^c	2,89	2,95	2,93	2,93	2,85	2,99	2,93	2,87	2,84	2,84	2,87	2,85	2,83	2,85	2,91
Cajá 10	2,88 ±	2,95 ±	2,92 ±	2,93 ±	2,85 ±	2,96 ±	2,92 ±	2,87 ±	2,84 ±	2,84 ±	2,87 ±	2,85	2,83 ±	2,88 ±	2,92 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0	0	0,02	0,01	0	0,01	0	0	0,01	0	0,02	0,01
Cajá 20 ^a	2,76	2,80	2,81	2,78	2,69	2,84	2,80	2,74	2,68	2,71	2,75	2,74	2,71	2,76	2,80
Cajá 20 ^b	2,75	2,80	2,85	2,78	2,71	2,84	2,80	2,74	2,66	2,69	2,75	2,74	2,71	2,76	2,81
Cajá 20 ^c	2,77	2,78	2,83	2,79	2,72	2,82	2,80	2,75	2,67	2,70	2,76	2,73	2,70	2,72	2,81
Cajá 20	2,76 ±	2,79 ±	2,83 ±	2,78 ±	2,71 ±	2,83 ±	2,80 ±	2,74	2,67 ±	2,70 ±	2,75 ±	2,74 ±	2,71 ±	2,75 ±	2,81 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,02	0	0,01	0,01	0	0	0,01	0,01	0	0	0	0,02	0

José Ricardo Soares de Oliveira

Anexo 04. Valores de pH dos fitocosméticos em geladeira (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
5 ± 2° C															
Dias → Amostras↓	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	3,00	2,85	2,81	2,71	2,92	3,09	3,07	3,01	2,99	3,00	3,02	3,00	2,97	3,05	3,07
Cajá 5 ^b	3,04	2,88	2,83	2,80	2,96	3,10	2,98	3,01	3,02	3,01	3,02	2,99	2,99	3,03	3,07
Cajá 5 ^c	3,04	2,89	2,81	2,84	2,95	3,09	3,08	3,04	3,04	3,01	3,01	3,00	3,01	3,02	3,05
Cajá 5	3,03 ±	2,87 ±	2,82 ±	2,78 ±	2,94 ±	3,09 ±	3,04 ±	3,02 ±	3,02 ±	3,01 ±	3,02 ±	3,00 ±	2,99 ±	3,03 ±	3,06 ±
(M± DP)	0,02	0,02	0,01	0,05	0,02	0	0,04	0,01	0,02	0	0	0	0,02	0,01	0,01
Cajá 10 ^a	2,83	2,95	2,93	2,92	2,85	2,96	2,93	2,88	2,80	2,87	2,89	2,86	2,82	2,89	2,92
Cajá 10 ^b	2,86	2,97	2,93	2,92	2,85	2,96	2,92	2,87	2,80	2,85	2,89	2,87	2,83	2,89	2,92
Cajá 10 ^c	2,85	2,98	2,93	2,93	2,86	2,91	2,94	2,87	2,83	2,84	2,89	2,87	2,85	2,88	2,90
Cajá 10	2,85 ±	2,97 ±	2,93 ±	2,92 ±	2,85 ±	2,94 ±	2,93 ±	2,87 ±	2,81 ±	2,85 ±	2,89 ±	2,87	2,83 ±	2,89 ±	2,91 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0	0	0	0,02	0,01	0	0,01	0,01	0	0	0,01	0	0,01
Cajá 20 ^a	2,77	2,10	2,78	2,79	2,74	2,85	2,81	2,76	2,71	2,75	2,79	2,74	2,73	2,77	2,81
Cajá 20 ^b	2,77	2,77	2,72	2,79	2,73	2,85	2,81	2,76	2,70	2,73	2,77	2,77	2,69	2,76	2,81
Cajá 20 ^c	2,80	2,79	2,76	2,79	2,73	2,86	2,81	2,76	2,69	2,74	2,76	2,75	2,72	2,77	2,81
Cajá 20	2,78 ±	2,79 ±	2,75 ±	2,79 ±	2,73 ±	2,85 ±	2,81 ±	2,76	2,70 ±	2,74 ±	2,76 ±	2,75 ±	2,71 ±	2,77 ±	2,81 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0,02	0	0	0	0	0	0,01	0,01	0	0,01	0,02	0	0

José Ricardo Soares de Oliveira

Anexo 05. Valores de pH dos fitocosméticos em congelador (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
-5 ± 2° C															
Dias → Amostras↓	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	3,07	2,79	2,74	2,71	2,96	3,10	3,07	3,01	2,99	2,98	3,09	3,02	3,04	3,04	3,05
Cajá 5 ^b	3,06	2,80	2,76	2,78	2,96	3,09	3,07	3,03	3,03	2,96	3,05	3,00	3,02	3,08	3,06
Cajá 5 ^c	3,08	2,77	2,73	2,73	2,95	3,12	3,08	3,01	3,01	2,99	3,04	3,02	2,98	3,05	3,07
Cajá 5	3,07 ±	2,79 ±	2,74 ±	2,74 ±	2,96 ±	3,10 ±	3,07 ±	3,01 ±	3,01 ±	2,98 ±	3,06 ±	3,01 ±	3,01 ±	3,06 ±	3,06 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,03	0	0,01	0	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,02	0,02	0,01
Cajá 10 ^a	2,90	2,93	2,91	2,89	2,84	2,99	2,92	2,92	2,91	2,88	2,89	2,83	2,89	2,87	2,89
Cajá 10 ^b	2,91	2,92	2,90	2,92	2,82	2,98	2,90	2,90	2,89	2,85	2,91	2,85	2,85	2,90	2,91
Cajá 10 ^c	2,89	2,95	2,91	2,92	2,83	2,96	2,90	2,90	2,87	2,90	2,90	2,85	2,85	2,90	2,95
Cajá 10	2,90 ±	2,93 ±	2,91 ±	2,91 ±	2,83 ±	2,96 ±	2,91 ±	2,91 ±	2,89 ±	2,88 ±	2,90 ±	2,84 ±	2,86 ±	2,89 ±	2,92 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,02
Cajá 20 ^a	2,77	2,82	2,80	2,80	2,80	2,85	2,82	2,78	2,68	2,74	2,77	2,76	2,73	2,78	2,77
Cajá 20 ^b	2,77	2,80	2,81	2,80	2,72	2,85	2,81	2,78	2,69	2,74	2,77	2,75	2,73	2,79	2,82
Cajá 20 ^c	2,78	2,78	2,81	2,79	2,72	2,86	2,80	2,77	2,67	2,73	2,78	2,77	2,73	2,76	2,82
Cajá 20	2,77 ±	2,80 ±	2,81 ±	2,80 ±	2,75 ±	2,85 ±	2,81 ±	2,78 ±	2,68 ±	2,74 ±	2,77 ±	2,76 ±	2,73 ±	2,78 ±	2,80 ±
(M± DP)	0	0,02	0,01	0	0,04	0	0,01	0	0,01	0	0	0	0	0,01	0,02

José Ricardo Soares de Oliveira

Anexo 06. Valores de pH dos fitocosméticos nos ciclos de congelamento e descongelamento (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
Dias → Amostras↓	Ciclos														
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	3,03	2,75	2,75	2,74	2,92	3,06	3,03	2,98	2,98	2,94	2,98	2,95	3,01	2,99	3,04
Cajá 5 ^b	3,03	2,77	2,75	2,74	2,92	2,99	3,07	2,98	2,96	2,97	2,97	3,00	3,02	3,03	3,01
Cajá 5 ^c	3,01	2,78	2,76	2,72	2,92	3,02	3,08	2,97	2,95	2,98	2,95	2,95	2,94	3,08	3,04
Cajá 5	3,02 ±	2,77 ±	2,75 ±	2,73 ±	2,92 ±	3,02 ±	3,06 ±	2,98 ±	2,96 ±	2,96 ±	2,97 ±	2,97 ±	2,99 ±	3,03 ±	3,03 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0,03	0,02	0	0,01	0,02	0,01	0,02	0,04	0,04	0,01
Cajá 10 ^a	2,88	2,92	2,90	2,90	2,81	2,92	2,91	2,85	2,88	2,82	2,87	2,86	2,82	2,95	2,88
Cajá 10 ^b	2,91	2,95	2,89	2,91	2,81	2,94	2,92	2,90	2,86	2,83	2,83	2,83	2,85	2,85	2,88
Cajá 10 ^c	2,87	2,94	2,93	2,91	2,81	3,07	2,90	2,85	2,85	2,83	2,94	2,86	2,88	2,90	2,91
Cajá 10	2,89 ±	2,94 ±	2,91 ±	2,91 ±	2,81 ±	2,98 ±	2,91 ±	2,87 ±	2,86 ±	2,83 ±	2,88 ±	2,85 ±	2,85 ±	2,90 ±	2,89 ±
(M± DP)	0,02	0,01	0,02	0	0	0,07	0,01	0,02	0,01	0	0,05	0,01	0,02	0,04	0,01
Cajá 20 ^a	2,78	2,79	2,80	2,79	2,71	2,80	2,78	2,72	2,68	2,70	2,72	2,70	2,67	2,72	2,78
Cajá 20 ^b	2,80	2,78	2,77	2,79	2,73	2,80	2,78	2,72	2,69	2,70	2,73	2,73	2,70	2,72	2,77
Cajá 20 ^c	2,78	2,77	2,79	2,78	2,73	2,78	2,78	2,74	2,66	2,72	2,70	2,72	2,65	2,73	2,77
Cajá 20	2,79 ±	2,78 ±	2,79 ±	2,79 ±	2,72 ±	2,79 ±	2,78 ±	2,73 ±	2,68 ±	2,71 ±	2,72 ±	2,72 ±	2,67 ±	2,72 ±	2,77 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0	0

José Ricardo Soares de Oliveira

Anexo 07. Valores de pH dos fitocosméticos nos ciclos de congelamento e descongelamento (estabilidade preliminar)

Valores de pH															
45 ± 2° C															
Dias → Amostras↓	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°
Cajá 5 ^a	2,98	2,76	2,74	2,73	2,92	3,05	2,98	2,99	2,96	2,95	2,95	2,92	2,95	2,96	3,06
Cajá 5 ^b	3,01	2,77	2,75	2,73	2,88	3,05	2,94	2,96	2,97	2,93	2,95	2,91	2,96	2,96	3,03
Cajá 5 ^c	2,98	2,79	2,72	2,75	2,92	3,04	3,00	2,96	2,94	2,94	3,00	2,94	2,94	2,96	2,99
Cajá 5	2,99 ±	2,77 ±	2,74 ±	2,74 ±	2,91 ±	3,05 ±	2,97 ±	2,97 ±	2,96 ±	2,94 ±	2,97 ±	2,92 ±	2,95 ±	2,96 ±	3,03 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0	0,03
Cajá 10 ^a	2,82	2,88	2,88	2,87	2,83	2,92	2,89	2,82	2,80	2,80	2,81	2,80	2,77	2,82	2,88
Cajá 10 ^b	2,86	2,90	2,89	2,87	2,81	2,91	2,87	2,83	2,81	2,77	2,84	2,83	2,76	2,85	2,87
Cajá 10 ^c	2,85	2,91	2,91	2,83	2,83	2,90	2,89	2,84	2,80	2,78	2,82	2,80	2,80	2,84	2,86
Cajá 10	2,84 ±	2,90 ±	2,89 ±	2,86 ±	2,82 ±	2,91 ±	2,88 ±	2,83 ±	2,8 ±	2,78 ±	2,82 ±	2,81 ±	2,78 ±	2,84 ±	2,87 ±
(M± DP)	0,02	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01
Cajá 20 ^a	2,74	2,77	2,75	2,72	2,67	2,81	2,76	2,70	2,69	2,68	2,70	2,70	2,65	2,71	2,76
Cajá 20 ^b	2,72	2,75	2,75	2,72	2,66	2,81	2,75	2,70	2,70	2,66	2,70	2,69	2,67	2,62	2,77
Cajá 20 ^c	2,73	2,79	2,75	2,79	2,67	2,78	2,74	2,70	2,70	2,67	2,70	2,69	2,66	2,70	2,78
Cajá 20	2,73 ±	2,77 ±	2,75 ±	2,74 ±	2,67 ±	2,80 ±	2,75 ±	2,70 ±	2,70 ±	2,67 ±	2,70 ±	2,69 ±	2,66 ±	2,68 ±	2,77 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0	0,03	0	0,01	0,01	0	0	0,01	0	0	0,01	0,04	0,01

Anexo 08. Valores de pH dos fitocosméticos em temperatura ambiente (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
Temperatura ambiente									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	3,02	3,07	3,07	3,01	2,99	2,95	2,98	3,05	3,01
Cajá 5 ^b	3,01	3,08	3,06	3,02	2,98	2,95	2,93	3,0	3,03
Cajá 5 ^c	2,98	3,07	3,05	2,95	3,0	2,95	2,96	3,06	2,99
Cajá 5	3,00 ±	3,07 ±	3,06 ±	2,99 ±	2,99 ±	2,95±	2,96±	3,04±	3,01±
(M± DP)	0,02	0,01	0,01	0,04	0,01	0	0,03	0,03	0,02
Cajá 10 ^a	2,89	2,93	2,91	2,87	2,83	2,85	2,88	2,85	2,87
Cajá 10 ^b	2,89	2,92	2,91	2,9	2,84	2,86	2,86	2,85	2,91
Cajá 10 ^c	2,84	2,92	2,89	2,89	2,86	2,86	2,86	2,89	2,88
Cajá 10	2,87 ±	2,92 ±	2,90 ±	2,89 ±	2,84 ±	2,86±	2,87±	2,86±	2,89±
(M± DP)	0,03	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02
Cajá 20 ^a	2,79	2,81	2,80	2,74	2,74	2,7	2,82	2,83	2,79
Cajá 20 ^b	2,77	2,80	2,81	2,74	2,75	2,72	2,82	2,83	2,81
Cajá 20 ^c	2,79	2,80	2,81	2,73	2,73	2,73	2,78	2,81	2,79
Cajá 20	2,78 ±	2,80 ±	2,81 ±	2,74 ±	2,74 ±	2,72±	2,81±	2,82±	2,80±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01

Anexo 09. Valores de pH dos fitocosméticos com incidência de luz indireta (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
Luz indireta									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	3,02	3,0	3,06	2,99	3,04	2,95	3,18	3,06	3,01
Cajá 5 ^b	3,05	3,07	3,09	3,01	3,01	2,97	3,03	3,03	3,02
Cajá 5 ^c	3,0	3,06	3,05	2,99	2,99	2,95	3,02	3,07	3,01
Cajá 5	3,02 ±	3,04 ±	3,07 ±	3,00 ±	3,01 ±	2,96 ±	3,08 ±	3,05 ±	3,01 ±
(M± DP)	0,02	0,03	0,02	0,01	0,03	0,01	0,09	0,02	0,01
Cajá 10 ^a	2,88	2,91	2,93	2,93	2,88	2,84	2,87	2,87	2,89
Cajá 10 ^b	2,86	2,91	2,91	2,89	2,85	2,85	2,90	2,92	2,93
Cajá 10 ^c	2,89	2,93	2,91	2,95	2,86	2,83	2,90	2,89	2,90
Cajá 10	2,88 ±	2,92 ±	2,92 ±	2,92 ±	2,86 ±	2,84 ±	2,89 ±	2,89 ±	2,91 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,03	0,02	0,01	0,02	0,03	0,02
Cajá 20 ^a	2,76	2,80	2,80	2,72	2,72	2,72	2,8	2,8	2,85
Cajá 20 ^b	2,75	2,80	2,81	2,73	2,75	2,7	2,78	2,83	2,74
Cajá 20 ^c	2,77	2,80	2,81	2,73	2,74	2,73	2,81	2,81	2,82
Cajá 20	2,76 ±	2,80 ±	2,81 ±	2,73 ±	2,74 ±	2,72 ±	2,80 ±	2,81 ±	2,80 ±
(M± DP)	0,01	0	0	0,01	0,02	0,02	0,02	0,02	0,06

Anexo 10. Valores de pH dos fitocosméticos em geladeira (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
5 ± 2° C									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	3,0	3,07	3,07	3,0	3,0	2,99	3,02	3,08	3,03
Cajá 5 ^b	3,04	2,98	3,07	3,01	3,02	2,99	3,03	3,08	2,99
Cajá 5 ^c	3,04	3,08	3,05	3,03	3,04	2,98	3,05	3,08	3,04
Cajá 5	3,03 ±	3,04 ±	3,06 ±	3,01 ±	3,02 ±	2,99 ±	3,03 ±	3,08 ±	3,02 ±
(M± DP)	0,02	0,04	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0	0,03
Cajá 10 ^a	2,83	2,93	2,92	2,87	2,98	2,85	2,93	2,94	2,95
Cajá 10 ^b	2,86	2,92	2,92	2,88	2,87	2,85	2,92	2,96	2,93
Cajá 10 ^c	2,85	2,94	2,90	2,90	2,90	2,85	2,92	2,97	2,95
Cajá 10	2,85 ±	2,93 ±	2,91 ±	2,88 ±	2,89 ±	2,85 ±	2,92 ±	2,96 ±	2,94
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0	0,01	0,02	0,01
Cajá 20 ^a	2,77	2,81	2,81	2,76	2,76	2,74	2,82	2,85	2,88
Cajá 20 ^b	2,77	2,81	2,81	2,75	2,77	2,74	2,73	2,85	2,87
Cajá 20 ^c	2,80	2,81	2,81	2,76	2,76	2,74	2,82	2,84	2,88
Cajá 20	2,78 ±	2,81 ±	2,81 ±	2,76 ±	2,76 ±	2,74 ±	2,79 ±	2,85 ±	2,88
(M± DP)	0,01	0	0	0,01	0,01	0	0,05	0,01	0,01

Anexo 11. Valores de pH dos fitocosméticos em congelador (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
-5 ± 2° C									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	3,07	3,07	3,05	3,02	3,02	3,02	3,0	3,01	3,05
Cajá 5 ^b	3,06	3,07	3,06	2,97	2,89	2,99	3,0	3,04	3,02
Cajá 5 ^c	3,08	3,08	3,07	2,97	2,94	3,03	3,01	3,01	3,02
Cajá 5	3,07 ±	3,07 ±	3,06 ±	2,99 ±	2,98 ±	3,01 ±	3,00 ±	3,02 ±	3,03 ±
(M± DP)	0,01	0	0,01	0,03	0,04	0,02	0,01	0,02	0,02
Cajá 10 ^a	2,90	2,92	2,89	2,89	2,86	2,86	2,75	2,95	2,97
Cajá 10 ^b	2,91	2,90	2,91	2,85	2,84	2,86	2,75	2,95	2,97
Cajá 10 ^c	2,89	2,90	2,95	2,85	2,83	2,87	2,75	2,95	2,96
Cajá 10	2,90 ±	2,91 ±	2,92 ±	2,86 ±	2,84 ±	2,86 ±	2,75 ±	2,95 ±	2,97 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02	0,01	0	0	0,02
Cajá 20 ^a	2,77	2,82	2,77	2,76	2,76	2,74	2,79	2,77	2,79
Cajá 20 ^b	2,77	2,81	2,82	2,74	2,74	2,74	2,81	2,81	2,80
Cajá 20 ^c	2,78	2,80	2,82	2,76	2,79	2,73	2,78	2,79	2,78
Cajá 20	2,77 ±	2,81 ±	2,80 ±	2,75 ±	2,76 ±	2,74 ±	2,79 ±	2,79 ±	2,79 ±
(M± DP)	0	0,01	0,02	0,01	0,03	0,01	0,02	0,02	0,01

Anexo 12. Valores de pH dos fitocosméticos nos ciclos de congelamento e descongelamento (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
Ciclos									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	3,03	3,03	3,04	2,98	3,00	2,96	2,93	3,07	3,02
Cajá 5 ^b	3,03	3,07	3,01	2,96	3,00	3,22	2,99	2,87	2,99
Cajá 5 ^c	3,01	3,08	3,04	2,99	2,86	2,99	2,96	3,02	3,00
Cajá 5	3,02 ±	3,06 ±	3,03 ±	2,98 ±	2,95 ±	3,06 ±	2,96 ±	2,99 ±	3,00 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0,01	0,02	0,08	0,14	0,03	0,1	0,02
Cajá 10 ^a	2,88	2,91	2,88	2,92	2,84	2,8	2,86	2,91	2,93
Cajá 10 ^b	2,91	2,92	2,88	2,86	2,82	2,81	2,83	2,92	2,9
Cajá 10 ^c	2,87	2,90	2,91	2,95	2,84	2,79	2,84	2,88	2,97
Cajá 10	2,89 ±	2,91 ±	2,89 ±	2,91 ±	2,83 ±	2,80 ±	2,84 ±	2,90 ±	2,93 ±
(M± DP)	0,02	0,01	0,01	0,05	0,01	0,01	0,02	0,02	0,04
Cajá 20 ^a	2,78	2,78	2,78	2,73	2,72	2,68	2,78	2,90	2,81
Cajá 20 ^b	2,80	2,78	2,77	2,71	2,71	2,66	2,77	2,91	2,89
Cajá 20 ^c	2,78	2,78	2,77	2,74	2,71	2,68	2,77	2,89	2,86
Cajá 20	2,79 ±	2,78 ±	2,77 ±	2,73 ±	2,71 ±	2,67 ±	2,77 ±	2,90 ±	2,85 ±
(M± DP)	0,01	0	3,04	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04

Anexo 13. Valores de pH dos fitocosméticos em estufa (estabilidade acelerada)

Valores de pH									
45 ± 2° C									
Dias → Amostras↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	2,98	2,98	3,06	2,99	2,93	2,91	3,0	3,06	3,08
Cajá 5 ^b	3,01	2,94	3,03	2,96	2,95	2,92	3,0	3,03	3,05
Cajá 5 ^c	2,98	3,0	2,99	2,94	2,97	2,94	3,0	3,09	3,08
Cajá 5	2,99 ±	2,97 ±	3,03 ±	2,96 ±	2,95 ±	2,92 ±	3,0 ±	3,06 ±	3,07 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0,03	0,03	0,02	0,02	0	0,03	0,02
Cajá 10 ^a	2,82	2,89	2,88	2,8	2,8	2,79	2,85	2,89	2,93
Cajá 10 ^b	2,86	2,87	2,87	2,79	2,82	2,79	2,83	2,91	2,9
Cajá 10 ^c	2,85	2,89	2,86	2,79	2,81	2,77	2,81	2,88	2,92
Cajá 10	2,84 ±	2,88 ±	2,87 ±	2,79 ±	2,81 ±	2,78 ±	2,83 ±	2,89 ±	2,92 ±
(M± DP)	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,02
Cajá 20 ^a	2,74	2,76	2,76	2,6	2,69	2,67	2,73	2,79	2,81
Cajá 20 ^b	2,72	2,75	2,77	2,74	2,7	2,66	2,74	2,76	2,83
Cajá 20 ^c	2,73	2,74	2,78	2,69	2,69	2,66	2,73	2,79	2,81
Cajá 20	2,73 ±	2,75 ±	2,77 ±	2,68 ±	2,69 ±	2,66 ±	2,73 ±	2,78 ±	2,82 ±
(M± DP)	0,01	0,01	0,01	0,07	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01

Anexo 14. Valores de densidade dos fitocosméticos em temperatura ambiente (estabilidade acelerada)

Densidade									
Temperatura ambiente									
Dias →	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Amostras ↓									
Cajá 5 ^a	0,9677	0,9806	0,9793	0,9875	0,9913	0,9815	0,9952	0,9744	1,0152
Cajá 5 ^b	0,9701	0,9798	0,9797	0,9881	0,9918	0,9807	0,9949	0,9770	1,0139
Cajá 5 ^c	0,9659	0,9801	0,9791	0,9878	0,9915	0,9812	0,9962	0,9746	1,0148
Cajá 5	0,9679	0,9802	0,9794	0,9878	0,9915	0,9811	0,9954	0,9753	1,0146
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0017	0,0003	0,0002	0,0002	0,0002	0,0003	0,0006	0,0012	0,0005
Cajá 10 ^a	0,9957	1,0003	0,9988	1,0140	1,0117	1,0023	1,1872	1,0003	1,0179
Cajá 10 ^b	0,9952	0,9987	0,9992	1,0109	1,0113	1,0019	1,1864	1,0027	1,0187
Cajá 10 ^c	0,9948	1,0010	0,9989	1,0117	1,0120	1,0021	1,1879	1,0013	1,0173
Cajá 10	0,9952	1,0000	0,9990	1,0122	1,0117	1,0021	1,1872	1,0023	1,0180
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0010	0,0002	0,0013	0,0003	0,0002	0,0006	0,0007	0,0006
Cajá 20 ^a	1,0164	1,0252	1,0260	1,0297	1,0451	1,0400	1,0810	1,0290	1,0587
Cajá 20 ^b	1,0159	1,0234	1,0180	1,0289	1,0432	1,0409	1,0793	1,0301	1,0572
Cajá 20 ^c	1,0168	1,0259	1,0230	1,0301	1,0449	1,0398	1,0802	1,0298	1,0590
Cajá 20	1,0164	1,0248	1,0223	1,0296	1,0444	1,0402	1,0802	1,0296	1,0583
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0011	0,0033	0,0005	0,0009	0,0005	0,0007	0,0005	0,0008

Anexo 15. Valores de densidade dos fitocosméticos com incidência de luz indireta
(estabilidade acelerada)

Densidade									
Luz indireta									
Dias → Amostras ↓	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Cajá 5 ^a	0,9447	0,9528	0,9794	0,9803	0,9822	0,9803	1,0116	0,9254	0,9807
Cajá 5 ^b	0,9441	0,9522	0,9791	0,9810	0,9818	0,9798	1,0111	0,9249	0,9802
Cajá 5 ^c	0,9452	0,9528	0,9785	0,9798	0,9825	0,9805	1,0114	0,9251	0,9811
Cajá 5	0,9447	0,9526	0,9790	0,9804	0,9822	0,9802	1,0114	0,9251	0,9807
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0003	0,0004	0,0005	0,0002	0,0003	0,0002	0,0002	0,0004
Cajá 10 ^a	0,9955	0,9867	0,9772	0,9893	0,9870	1,0138	1,0048	0,9864	1,0287
Cajá 10 ^b	0,9950	0,9861	0,9769	0,9891	0,9866	1,0131	1,0043	0,9862	1,0279
Cajá 10 ^c	0,9963	0,9630	0,9774	0,9897	0,9872	1,0137	1,0051	0,9865	1,0282
Cajá 10	0,9956	0,9786	0,9772	0,9894	0,9869	1,0135	1,0047	0,9864	1,0283
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0005	0,0110	0,0002	0,0002	0,0002	0,0003	0,0003	0,0001	0,0003
Cajá 20 ^a	1,0197	1,0663	1,0161	1,0485	1,1084	1,0271	1,0698	0,9143	1,0535
Cajá 20 ^b	1,0201	1,0668	1,0153	1,0479	1,1080	1,0265	1,0702	0,9139	1,0552
Cajá 20 ^c	1,0195	1,0557	1,0162	1,0481	1,1089	1,0268	1,0692	0,9142	1,0531
Cajá 20	1,0198	1,0629	1,0159	1,0482	1,1084	1,0268	1,0697	0,9141	1,0539
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0051	0,0004	0,0002	0,0004	0,0002	0,0004	0,0002	0,0009

Anexo 16. Valores de densidade dos fitocosméticos em geladeira (estabilidade acelerada)

Densidade									
5 ± 2° C									
Dias →	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Amostras ↓									
Cajá 5 ^a	0,9671	0,9784	0,9775	0,9813	0,9860	0,9931	1,0061	0,9048	1,0056
Cajá 5 ^b	0,9673	0,9780	0,9768	0,9818	0,9873	0,9937	1,0056	0,9037	1,0047
Cajá 5 ^c	0,9669	0,9782	0,9773	0,9809	0,9863	0,9929	1,0062	0,9045	1,0052
Cajá 5	0,9671	0,9782	0,9772	0,9813	0,9865	0,9932	1,0060	0,9043	1,0052
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0002	0,0003	0,0004	0,0006	0,0003	0,0003	0,0005	0,0004
Cajá 10 ^a	0,9925	1,0030	0,9988	1,0027	0,9884	1,0730	0,9955	0,9614	1,0226
Cajá 10 ^b	0,9921	1,0027	0,9982	1,0021	0,9888	1,0727	0,9943	0,9611	1,0229
Cajá 10 ^c	0,9919	1,0032	0,9987	1,0019	0,9879	1,0733	0,9959	0,9617	1,0226
Cajá 10	0,9922	1,0030	0,9986	1,0022	0,9884	1,0730	0,9952	0,9614	1,0227
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0002	0,0003	0,0003	0,0004	0,0002	0,0007	0,0002	0,0001
Cajá 20 ^a	1,0120	1,0345	1,0254	1,0330	0,9892	1,1646	1,0455	1,0205	1,0484
Cajá 20 ^b	1,0125	1,0348	1,0258	1,0329	0,9899	1,1674	1,0458	1,0209	1,0481
Cajá 20 ^c	1,0119	1,0341	1,0246	1,0332	0,9889	1,1638	1,0449	1,0212	1,0477
Cajá 20	1,0121	1,0345	1,0253	1,0330	0,9893	1,1653	1,0454	1,0209	1,0481
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0003	0,0003	0,0005	0,0001	0,0004	0,0015	0,0004	0,0003	0,0003

Anexo 17. Valores de densidade dos fitocosméticos em congelador (estabilidade acelerada)

Densidade									
-5 ± 2° C									
Dias →	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Amostras ↓									
Cajá 5 ^a	0,9531	0,9677	0,9915	0,9835	0,9744	0,9768	1,0111	1,0219	0,9698
Cajá 5 ^b	0,9538	0,9671	0,9919	0,9864	0,9737	0,9752	1,0124	1,0222	0,9692
Cajá 5 ^c	0,9529	0,9674	0,9912	0,9852	0,9739	0,9766	1,0119	1,0222	0,9695
Cajá 5	0,9533	0,9674	0,9915	0,9850	0,9740	0,9762	1,0118	1,0221	0,9695
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0002	0,0003	0,0012	0,0003	0,0007	0,0005	0,0001	0,0002
Cajá 10 ^a	1,0015	1,0018	0,9936	0,9902	0,9519	1,0063	0,9629	1,0402	0,9978
Cajá 10 ^b	1,0009	1,0012	0,9928	0,9909	0,9529	1,0052	0,9633	1,0409	0,9965
Cajá 10 ^c	1,0012	1,0015	0,9932	0,9911	0,9524	1,0061	0,9627	1,0398	0,9971
Cajá 10	1,0012	1,0015	0,9932	0,9907	0,9524	1,0059	0,9630	1,0403	0,9971
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0002	0,0003	0,0004	0,0004	0,0005	0,0002	0,0005	0,0005
Cajá 20 ^a	0,9347	1,0090	1,0392	1,0297	1,0371	1,0423	1,0557	1,0364	1,0368
Cajá 20 ^b	0,9341	1,0092	1,0389	1,0291	1,0377	1,0418	1,0556	1,0369	1,0357
Cajá 20 ^c	0,9343	1,0099	1,0384	1,0303	1,0368	1,0419	1,0551	1,0361	1,0363
Cajá 20	0,9344	1,0094	1,0388	1,0297	1,0372	1,0420	1,0555	1,0365	1,0363
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0004	0,0003	0,0005	0,0004	0,0002	0,0003	0,0003	0,0004

Anexo 18. Valores de densidade dos fitocosméticos nos ciclos de congelamento e descongelamento (estabilidade acelerada)

Densidade									
Ciclos									
Dias →	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Amostras ↓									
Cajá 5 ^a	0,9512	0,9867	0,9845	1,0085	0,9846	1,0005	1,0002	0,9705	1,0149
Cajá 5 ^b	0,9507	0,9859	0,9837	1,0093	0,9821	0,9992	0,9989	0,9698	1,0132
Cajá 5 ^c	0,9509	0,9862	0,9849	1,0087	0,9835	0,9998	0,9997	0,9701	1,0143
Cajá 5	0,9509	0,9863	0,9844	1,0088	0,9834	0,9998	0,9996	0,9701	1,0141
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0003	0,0005	0,0003	0,0010	0,0005	0,0005	0,0003	0,0007
Cajá 10 ^a	1,0317	1,0105	0,9847	1,0034	0,9525	1,0089	0,9713	1,0279	1,0504
Cajá 10 ^b	1,0319	1,0111	0,9825	1,0046	0,9533	1,0062	0,9702	1,0264	1,0511
Cajá 10 ^c	1,0312	1,0108	0,9831	1,0041	0,9529	1,0078	0,9711	1,0281	1,0507
Cajá 10	1,0316	1,0108	0,9834	1,0040	0,9529	1,0076	0,9709	1,0275	1,0507
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0003	0,0002	0,0009	0,0005	0,0003	0,0011	0,0005	0,0008	0,0003
Cajá 20 ^a	0,9474	1,0226	1,0363	1,0564	1,0592	1,0576	1,0955	1,1175	1,0890
Cajá 20 ^b	0,9477	1,0222	1,0359	1,0589	1,0578	1,0562	1,0944	1,1178	1,0876
Cajá 20 ^c	0,9468	1,0229	1,0361	1,0576	1,0583	1,0571	1,0949	1,1177	1,0883
Cajá 20	0,9473	1,0226	1,0361	1,0576	1,0584	1,0570	1,0949	1,1177	1,0883
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0003	0,0002	0,0010	0,0006	0,0006	0,0004	0,0001	0,0006

Anexo 19. Valores de densidade dos fitocosméticos em estufa (estabilidade acelerada)

Densidade									
45 ± 2° C									
Dias →	1°	7°	15°	21°	30°	45°	60°	75°	90°
Amostras ↓									
Cajá 5 ^a	0,9681	0,9619	0,9848	0,9718	0,9646	0,9829	0,9514	0,9632	1,0177
Cajá 5 ^b	0,9676	0,9623	0,9831	0,9709	0,9632	0,9825	0,9508	0,9639	1,0182
Cajá 5 ^c	0,9679	0,9615	0,9842	0,9713	0,9639	0,9833	0,9511	0,9642	1,0179
Cajá 5	0,9679	0,9619	0,9840	0,9713	0,9639	0,9829	0,9511	0,9638	1,0179
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0002	0,0003	0,0007	0,0004	0,0006	0,0003	0,0002	0,0004	0,0002
Cajá 10 ^a	1,0033	1,0024	0,9971	1,0521	0,9924	1,0101	0,9893	0,9685	0,9537
Cajá 10 ^b	1,0039	1,0028	0,9970	1,0526	0,9919	1,0109	0,9887	0,9691	0,9539
Cajá 10 ^c	1,0028	1,0029	0,9973	1,0530	0,9916	1,0105	0,9889	0,9689	0,9549
Cajá 10	1,0033	1,0027	0,9971	1,0526	0,9920	1,0105	0,9890	0,9688	0,9542
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0004	0,0002	0,0001	0,0004	0,0003	0,0003	0,0002	0,0002	0,0005
Cajá 20 ^a	0,9984	1,0371	1,0098	1,0304	1,0225	1,0223	1,0488	1,0474	1,0665
Cajá 20 ^b	0,9991	1,0365	1,0087	1,0298	1,0218	1,0227	1,0476	1,0478	1,0672
Cajá 20 ^c	0,9989	1,0369	1,0089	1,0301	1,0227	1,0221	1,0482	1,0474	1,0674
Cajá 20	0,9988	1,0368	1,0091	1,0301	1,0223	1,0224	1,0482	1,0475	1,0670
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
(M± DP)	0,0003	0,0002	0,0005	0,0002	0,0004	0,0002	0,0005	0,0002	0,0004

Anexo 20. Valores de viscosidade dos fitocosméticos em temperatura ambiente (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
Temperatura Ambiente					
Dias Amostras	1°	15°	30°	60°	90°
Cajá 5 ^a	1,42	1,41	1,42	1,33	1,33
Cajá 5 ^b	1,53	1,42	1,36	1,35	1,35
Cajá 5 ^c	1,67	1,47	1,46	1,38	1,28
Cajá 5	1,54 ±	1,43 ±	1,41 ±	1,35 ±	1,32 ±
(M± DP)	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03
Cajá 10 ^a	1,47	1,40	1,42	1,21	1,21
Cajá 10 ^b	1,40	1,46	1,45	1,27	1,17
Cajá 10 ^c	1,46	1,44	1,39	1,23	1,23
Cajá 10	1,44 ±	1,43 ±	1,42 ±	1,23 ±	1,20 ±
(M± DP)	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
Cajá 20 ^a	1,37	1,33	1,41	1,21	1,11
Cajá 20 ^b	1,30	1,38	1,33	1,24	1,14
Cajá 20 ^c	1,37	1,30	1,34	1,22	1,22
Cajá 20	1,35 ±	1,34 ±	1,36 ±	1,22 ±	1,16 ±
(M± DP)	0,04	0,04	0,04	0,01	0,06

Anexo 21. Valores de viscosidade dos fitocosméticos com incidência de luz indireta (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
Luz indireta					
Dias Amostras	1°	15°	30°	60°	90°
Cajá 5 ^a	1,26	1,17	1,10	1,32	1,02
Cajá 5 ^b	1,20	1,12	1,03	1,21	1,09
Cajá 5 ^c	1,29	1,11	1,04	1,29	1,09
Cajá 5	1,25 ±	1,13 ±	1,06 ±	1,27 ±	1,07 ±
(M± DP)	0,05	0,03	0,03	0,06	0,04
Cajá 10 ^a	1,46	1,10	1,05	1,25	1,05
Cajá 10 ^b	1,48	0,97	1,17	1,20	1,02
Cajá 10 ^c	1,41	0,96	1,08	1,19	1,09
Cajá 10	1,45 ±	1,01 ±	1,10 ±	1,21 ±	1,05 ±
(M± DP)	0,04	0,08	0,06	0,03	0,04
Cajá 20 ^a	1,32	1,09	1,12	1,02	1,02
Cajá 20 ^b	1,39	1,06	1,16	1,09	1,01
Cajá 20 ^c	1,34	1,04	1,07	1,15	1,05
Cajá 20	1,35 ±	1,06 ±	1,12 ±	1,09 ±	1,03 ±
(M± DP)	0,04	0,02	0,05	0,07	0,02

Anexo 22. Valores de viscosidade dos fitocsméticos em geladeira (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
5 ± 2° C					
Dias Amostras	1°	15°	30°	60°	90°
Cajá 5 ^a	1,61	1,53	1,40	1,23	1,18
Cajá 5 ^b	1,40	1,40	1,44	1,34	1,14
Cajá 5 ^c	1,53	1,42	1,36	1,22	1,12
Cajá 5	1,51 ±	1,45 ±	1,40 ±	1,26 ±	1,15 ±
(M± DP)	0,10	0,07	0,04	0,07	0,03
Cajá 10 ^a	1,69	1,37	1,31	1,17	1,07
Cajá 10 ^b	1,42	1,41	1,39	1,14	1,14
Cajá 10 ^c	1,51	1,45	1,35	1,15	1,05
Cajá 10	1,54 ±	1,41 ±	1,35 ±	1,15 ±	1,09 ±
(M± DP)	0,14	0,04	0,04	0,02	0,04
Cajá 20 ^a	1,49	1,33	1,27	1,15	1,05
Cajá 20 ^b	1,55	1,33	1,29	1,14	1,04
Cajá 20 ^c	1,34	1,33	1,22	1,16	1,06
Cajá 20	1,46 ±	1,33 ±	1,26 ±	1,15 ±	1,05 ±
(M± DP)	0,11	0	0,04	0,01	0,01

Anexo 23. Valores de viscosidade dos fitocosméticos em congelador (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
-5 ± 2° C					
Dias Amostras	1°	15°	30°	60°	90°
Cajá 5 ^a	1,67	1,44	1,29	1,45	1,35
Cajá 5 ^b	1,65	1,54	1,32	1,47	1,37
Cajá 5 ^c	1,70	1,44	1,30	1,53	1,33
Cajá 5	1,67 ±	1,47 ±	1,30 ±	1,48 ±	1,35 ±
(M± DP)	0,03	0,05	0,02	0,04	0,02
Cajá 10 ^a	1,58	1,35	1,50	1,26	1,16
Cajá 10 ^b	1,56	1,39	1,59	1,34	1,14
Cajá 10 ^c	1,51	1,36	1,67	1,27	1,17
Cajá 10	1,55 ±	1,37 ±	1,59 ±	1,29 ±	1,16 ±
(M± DP)	0,03	0,02	0,08	0,04	0,02
Cajá 20 ^a	1,13	1,22	1,33	1,51	1,25
Cajá 20 ^b	1,22	1,21	1,41	1,48	1,25
Cajá 20 ^c	1,18	1,23	1,36	1,53	1,25
Cajá 20	1,17 ±	1,22 ±	1,37 ±	1,51 ±	1,25 ±
(M± DP)	0,04	0,01	0,04	0,02	0

Anexo 24. Valores de viscosidade dos fitocosméticos nos ciclos de congelamento de descongelamento (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
Ciclos					
Dias	1°	15°	30°	60°	90°
Amostras					
Cajá 5 ^a	1,69	1,05	1,11	1,32	1,22
Cajá 5 ^b	1,80	1,14	0,96	1,40	1,15
Cajá 5 ^c	1,61	1,16	1,43	1,12	1,18
Cajá 5	1,70 ±	1,12 ±	1,16 ±	1,28 ±	1,18 ±
(M± DP)	0,10	0,06	0,24	0,15	0,03
Cajá 10 ^a	1,69	1,05	1,15	1,11	1,09
Cajá 10 ^b	1,71	1,04	1,18	1,21	1,20
Cajá 10 ^c	1,70	1,08	1,24	1,11	1,10
Cajá 10	1,70 ±	1,06 ±	1,19 ±	1,14 ±	1,13 ±
(M± DP)	0,01	0,02	0,05	0,06	0,06
Cajá 20 ^a	1,80	1,25	1,25	1,16	1,06
Cajá 20 ^b	1,78	1,21	1,29	0,99	0,99
Cajá 20 ^c	1,81	1,22	1,08	0,97	0,99
Cajá 20	1,80 ±	1,23 ±	1,21 ±	1,04 ±	1,01 ±
(M± DP)	0,02	0,02	0,11	0,10	0,04

Anexo 25. Valores de viscosidade dos fitocosméticos em estufa (estabilidade acelerada)

Viscosidade					
45 ± 2° C					
Dias	1°	15°	30°	60°	90°
Amostras					
Cajá 5 ^a	1,68	1,65	1,47	1,67	1,47
Cajá 5 ^b	1,53	1,65	1,79	1,31	1,31
Cajá 5 ^c	1,43	1,67	1,74	1,48	1,48
Cajá 5	1,55 ±	1,65 ±	1,67 ±	1,49 ±	1,42 ±
(M± DP)	0,13	0,01	0,17	0,18	0,10
Cajá 10 ^a	1,76	1,69	1,76	1,69	1,57
Cajá 10 ^b	1,74	1,36	1,76	1,84	1,58
Cajá 10 ^c	1,89	1,67	1,64	1,64	1,56
Cajá 10	1,80 ±	1,57 ±	1,72 ±	1,72 ±	1,57 ±
(M± DP)	0,08	0,18	0,07	0,11	0,01
Cajá 20 ^a	1,97	1,64	1,66	1,42	1,64
Cajá 20 ^b	1,98	1,79	1,92	1,31	1,63
Cajá 20 ^c	1,99	1,55	1,61	1,43	1,54
Cajá 20	1,98 ±	1,66 ±	1,73 ±	1,38 ±	1,61 ±
(M± DP)	0,01	0,12	0,17	0,07	0,05

Anexo 26. Cálculo do valor do FPS do creme base

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	0,009	0,0001
295	0,0817	0,008	0,0007
300	0,2874	0,008	0,0023
305	0,3278	0,007	0,0023
310	0,1864	0,006	0,0011
315	0,0839	0,004	0,0003
320	0,0180	0,001	0,0000
Σ	1,0002	Σ 290-320	0,0069

FPS CR Base = 0,069

Anexo 27. Cálculo do valor do FPS do creme incorporado de 5% de extrato

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	0,117	0,0018
295	0,0817	0,085	0,0070
300	0,2874	0,058	0,0167
305	0,3278	0,040	0,0131
310	0,1864	0,029	0,0054
315	0,0839	0,024	0,0020
320	0,0180	0,023	0,0004
Σ	1,0002	Σ 290-320	0,0463

FPS CR 5 = 0,463

Anexo 28. Cálculo do valor do FPS do creme incorporado de 10% de extrato

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	0,169	0,0025
295	0,0817	0,127	0,0104
300	0,2874	0,095	0,0273
305	0,3278	0,072	0,0236
310	0,1864	0,056	0,0104
315	0,0839	0,049	0,0041
320	0,0180	0,047	0,0008
Σ	1,0002	Σ 290-320	0,0792

FPS CR 10 = 0,792**Anexo 29.** Cálculo do valor do FPS do creme incorporado de 20% de extrato

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	0,339	0,0050
295	0,0817	0,270	0,0221
300	0,2874	0,209	0,0601
305	0,3278	0,167	0,0547
310	0,1864	0,144	0,0268
315	0,0839	0,132	0,0111
320	0,0180	0,125	0,0023
Σ	1,0002	Σ 290-320	0,1821

FPS CR 20 = 1,821

Anexo 30. Cálculo do valor do FPS do creme incorporado de 5% de cinamato de octila

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	1,097	0,0164
295	0,0817	1,082	0,0884
300	0,2874	1,078	0,3097
305	0,3278	1,059	0,3471
310	0,1864	1,056	0,1969
315	0,0839	1,049	0,0880
320	0,0180	0,998	0,0180
Σ	1,0002	Σ 290-320	1,0646

FPS FILTRO = 10,646**Anexo 31.** Cálculo do valor do FPS do creme cajá-manga 20% incorporado de 5% de cinamato de octila

λ (nm)	EE x I	ABS	Σ 290-320
290	0,0150	1,436	0,0215
295	0,0817	1,352	0,1104
300	0,2874	1,286	0,3697
305	0,3278	1,226	0,4019
310	0,1864	1,200	0,2338
315	0,0839	1,181	0,0991
320	0,0180	1,123	0,0202
Σ	1,0002	Σ 290-320	1,2467

FPS F + CR 20 = 12,467