UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos
físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/
retenção cutânea de formulações tópicas**

Daniele Fernandes da Silva

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Extrato e Fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Daniele Fernandes da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 20/12/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva, Daniele Fernandes

Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas. Ribeirão Preto, 2012. 119 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Vieira Fonseca

1. *Inga edulis*. 2.Extrato. 3. Fração de média polaridade. 4. Formulações tópicas. 5.Atividade antioxidante. 6.Vicenina-2. 7.Penetração/retenção cutânea

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniele Fernandes da Silva

Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientada: Daniele Fernandes da Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Vieira Fonseca

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A minha querida família que me
incentiva e me apóia em todos os projetos
e sonhos até hoje idealizados, desde
sempre.*

Agradecimentos

À minha orientadora, conselheira, amiga e incentivadora Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca por transmitir da melhor maneira possível todo o seu conhecimento e experiência e por estar sempre tão presente nos momentos que precisei;

Aos amigos do laboratório que egressaram e aos que ainda estão presentes, que fizeram parte da minha vida nesses anos e que levarei no coração: Ana Cláudia, Ana Luiza, Fabiana, Fernanda, Frederico, Lívia, Marília, Mariana, Mirela, Rebeca, Ricardo, Rodrigo, Sílvia, Sônia, Vanessa e Yris;

À Vanessa Fortes, por me ensinar tantas técnicas no início do trabalho e por colaborar tão imensamente com o meu conhecimento;

Aos amigos de outros laboratórios que ajudaram voluntariamente na execução deste trabalho, em especial ao Joel e ao Rodrigo por me ajudarem em seus laboratórios com equipamentos e valiosas sugestões;

Ao técnico José Roberto Jabor por sua alegria diária, amizade, companheirismo e disponibilidade;

Aos técnicos de outros laboratórios Aninha, Cris, Henrique, Mariana, Patrícia e Tomaz pelo valioso auxílio;

Aos professores Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, Dra. Andréia Machado Leopoldino, Dra. Renata Fonseca Vianna Lopes, Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas e Dra. Yara Maria Lucisano Valim e seus técnicos por disponibilizarem o uso de equipamentos em seus laboratórios;

À empresa Lychnoflora, pela parceria efetuada, em especial à Thais Guaratini e à Denise Brentan da Silva pela atenção e pelas sugestões,

À empresa Amazon Dreams pelo fornecimento do extrato e da fração de *Inga edulis* estudados, em especial ao Dr. Hervé Rogez;

A todos os funcionários da FCFRP-USP que estiveram sempre presentes, seja na portaria com um sorriso amigável, na cozinha com o café preparado ou em outro lugar, disponibilizando o seu trabalho;

À CAPES pela bolsa concedida;

À todas as minhas amigas por se fazerem tão presentes, mesmo estando longe e pela certeza de que estão sempre perto;

Ao Júlio pela presença contínua durante estes anos, por me ajudar nos momentos difíceis, compartilhar os momentos de alegria, aconselhar nos momentos de dúvidas e assim fazer a minha vida tão mais feliz;

Aos meus pais Ademir e Josete por me incentivar, me cuidar e me acompanhar em mais esta etapa da minha vida. Ao meu pai, em especial, por ser uma inspiração de inteligência e trabalho e à minha mãe pela torcida e orações de todos os dias;

Às minhas irmãs e cunhado por estarem sempre presentes em telefonemas e aos finais de semana, me distraindo e me alegrando;

Ao Lorenzo por ser tão especial e por trazer uma alegria imensurável na minha vida;

À Deus por me dar saúde, capacidade e intuição para chegar até aqui.

Muito Obrigada!

*“Foi o tempo que investiste em tua rosa que fez tua rosa
ser tão importante”.*

(Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

SILVA, D. F. **Extrato e fração de média polaridade de *Inga edulis*: estudos físico-químicos, funcionais, citotóxicos e de penetração/ retenção cutânea de formulações tópicas**, 2012. 119 p. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A pele é exposta a inúmeros agentes, dentre os quais destaca-se a radiação ultravioleta (RUV), que pode energizar os cromóforos celulares da pele e estes reagindo com o oxigênio molecular podem resultar na geração das espécies reativas de oxigênio (EROs). Nestas circunstâncias, mesmo possuindo um sistema de defesa antioxidante, a concentração de radicais livres pode aumentar, rompendo o equilíbrio pró oxidante/antioxidante, levando ao estresse oxidativo na pele. Neste contexto, o uso tópico de formulações adicionadas de substâncias naturais tem sido um eficiente modo para enriquecer o sistema protetor cutâneo endógeno, reduzindo os danos oxidativos causados pela RUV na pele. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial fotoquimioprotetor do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* e desenvolver formulações estáveis física e quimicamente a fim de selecionar a que prover melhor liberação, penetração e retenção dos componentes do extrato e/ou da fração na epiderme viável. A partir do perfil cromatográfico foi possível observar que o extrato possui compostos comuns à fração e alguns deles foram identificados, sendo o composto vicenina-2 o escolhido para ser monitorado nos estudos de penetração e retenção cutânea. Dentre as formulações estudadas a formulação a base de Hostacerin SAF[®] adicionada da fração foi a que proveu a maior penetração/retenção do composto vicenina-2 e de compostos antioxidantes na epiderme viável e também foi considerada estável por todos os parâmetros avaliados no estudo de estabilidade preliminar. A fração de *Inga edulis*, veiculada por esta formulação, mostrou alta atividade antioxidante frente aos métodos estudados, apresentou baixa citotoxicidade em cultura celular de fibroblastos, sendo a quantidade citotóxica estabelecida muito acima da quantidade de vicenina-2 retida na epiderme viável. A fração também apresentou fotoestabilidade frente a altas doses de radiação UVA e UVB quanto à citotoxicidade, capacidade de reduzir o radical sintético DPPH[•] e de sequestrar o ânion superóxido *in vitro*. Assim, a formulação gel-creme com Hostacerin SAF[®] adicionada de 1% da fração de média polaridade do *Inga edulis* mostrou ser muito promissora e deve ser melhor estudada, visando futura aplicação como formulação fotoquimiopreventiva.

Palavras-chave: *Inga edulis*, extrato, fração de média polaridade, formulações tópicas, atividade antioxidante, vicenina-2, penetração e retenção cutânea.

ABSTRACT

SILVA, D. F. **Extract and medium polarity fraction of *Inga edulis*: physico chemical, functional, cytotoxic studies and penetration / retention evaluation of cutaneous topical formulations**, 2012. 119 p. Dissertation (master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The skin is exposed to numerous agents, among which stands out the ultraviolet radiation (UVR) that can energize the chromophores of cell skin and these react with molecular oxygen resulting in the generation of reactive oxygen species (ROS). In these circumstances, the endogenous antioxidant defense system would be impaired leading to a pro oxidant state named oxidative stress. In this context, the topical formulations added with natural substances has been an efficient way to aid endogenous skin protective system, minimizing the oxidative damage caused by UV rays. Thus, the aim of the present work was to study the potential photochemopreventive activity of the extract and medium polarity fraction of *Inga edulis* and develop formulations physically and chemically stable in order to select the penetration and retention of the components of the extract and / or fraction oin the viable epidermis. The chromatographic profiles showed that the some compounds of the extract are also present in the fraction and some of them were identified. The compound vicenin-2 was chosen to be monitored in studies of cutaneous penetration and retention. Among the formulations studied, the formulation Hostacerin SAF[®] added to the fraction provided the highest penetration / retention of the compound vicenin-2 and antioxidant compounds in viable epidermis and also was considered stable at all parameters evaluated in the study of preliminary stability. The fraction of *Inga edulis*, conveyed by this formulation, showed strong antioxidant activity in the methods studied and showed low cytotoxicity in cell culture of fibroblasts. The cytotoxicity concentration was greater than the amount of vicenin-2 retained in viable epidermis. The fraction also showed photostability when it was exposed to high doses of UVA and UVB. The irradiated fraction showed no change in cytotoxicity and antioxidant activity. Thus, the formulation Hostacerin SAF[®] added with 1% of medium polarity fraction of *Inga edulis* proved very promising and should be further studied for a future application in photochemoprevention.

Keywords: *Inga edulis*, extract, fraction of medium polarity, topical formulations, antioxidant activity, vicenin-2, cutaneous penetration and retention.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Árvore <i>Inga edulis</i> Martius.....	6
Figura 2.	Espectro de emissão da lâmpada UVA (400-320 nm).....	20
Figura 3.	Célula de difusão tipo “Franz”	31
Figura 4.	Perfil cromatográfico do extrato de <i>Inga edulis</i> (250 µg/mL) obtido por CLAE em coluna C18.....	34
Figura 5.	Perfil cromatográfico da fração de média polaridade de <i>Inga edulis</i> obtido por CLAE em coluna C18.....	35
Figura 6.	Perfis cromatográficos do extrato metanólico bruto das folhas de <i>Inga edulis</i> a 270 e 370 nm	36
Figura 7.	Perfis cromatográficos da fração aquosa do extrato das folhas de <i>Inga edulis</i> após <i>clean up</i> com hexano em 280, 370 e 515 nm.....	36
Figura 8.	Perfis cromatográficos da fração de <i>Inga edulis</i> separada por Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector arranjo diodo (UPLC-DAD), nos comprimento de ondas de 280 nm e 370 nm.....	37
Figura 9.	Cromatograma da fração de <i>Inga edulis</i> por LC-DAD-MS, utilizando a mesma coluna e condição cromatográfica aplicada em CLAE.....	38
Figura 10.	Porcentagem de redução do DPPH [•] em função das concentrações do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i>	41
Figura 11.	Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase.....	43
Figura 12.	Porcentagem de inibição quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luninol/XOD em função das concentrações do extrato e da fração.....	43
Figura 13.	Porcentagem de Inibição da peroxidação lipídica em função das concentrações do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i>	46
Figura 14.	Viabilidade de células L929 tratadas com o extrato e a fração de <i>Inga edulis</i>	49
Figura 15.	Medida em porcentagem da capacidade doadora de H [•] ao radical DPPH [•] pelo extrato e pela fração de média polaridade irradiados e	

	não irradiados.....	51
Figura 16.	Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato e pela fração de média polaridade irradiados e não irradiados.....	52
Figura 17.	Viabilidade de células L929 tratadas com o extrato e com a fração não irradiados e irradiados com radiações UVA e UVB.	53
Figura 18.	Medida em porcentagem da capacidade doadora de $H^{\bullet}$ ao radical DPPH $^{\bullet}$ e da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato e fração não veiculados e adicionados às formulações.....	58
Figura 19.	Porcentagem de perda de água das formulações após estabilidade preliminar.....	61
Figura 20.	Reogramas obtidos para as formulações recém preparadas e submetidas aos ciclos, adicionadas ou não do extrato e da fração de média polaridade.....	63
Figura 21.	Viscosidade aparente das formulações no tempo zero e após os 12 ciclos.....	65
Figura 22.	Valores de tixotropia das formulações recém preparadas e depois de submeter aos ciclos.....	66
Figura 23.	Atividade doadora de $H^{\bullet}$ ao radical DPPH $^{\bullet}$ e atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD das formulações submetidas ao teste de estabilidade e controles.....	68
Figura 24.	Atividade antioxidante determinada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase na escolha do solvente extrator para a recuperação do método de penetração/retenção cutânea.....	71
Figura 25.	Atividade antioxidante determinada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase no estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração no método de <i>tape stripping</i>	77
Figura 26.	Estrutura química da Vicenina-2.....	81
Figura 27.	Porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo	

sistema xantina/luminol/XOD das fitas obtidas por *tape stripping* estimado para os estudos de permeação e retenção cutânea após 12 horas de experimento..... 84

Figura 28. Porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD da pele de orelha de porco estimado para os estudos de permeação e retenção cutânea após 12 horas de experimento..... 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Gradiente por estepe utilizado na eluição dos compostos do extrato e da fração de média polaridade de <i>Inga edulis</i> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	15
Tabela 2.	Composição das formulações selecionadas.....	22
Tabela 3.	Composição de outras formulações testadas e não selecionadas.....	23
Tabela 4.	Linearidade do método analítico por CLAE determinada para o composto vicenina-2 padrão e presente no extrato e na fração de <i>Inga edulis</i>	39
Tabela 5.	Comparação entre os valores de IC ₅₀ obtidos pelo extrato e pela fração nos diferentes ensaios de determinação da atividade antioxidante.....	47
Tabela 6.	Teor de polifenóis e flavonóides totais encontrado no extrato e na fração.....	47
Tabela 7.	Medida do pH das formulações antes e depois do teste de estabilidade.....	60
Tabela 8.	Valores de recuperação para os diferentes solventes analisados....	73
Tabela 9.	Recuperação dos componentes antioxidantes da fração de <i>Inga edulis</i> no método de penetração/retenção cutânea	75
Tabela 10.	Recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de <i>Inga edulis</i> no método de penetração/retenção cutânea	75
Tabela 11.	Porcentagem de recuperação da vicenina-2 extraída após aplicação de quantidades de extrato e da fração à pele.....	76
Tabela 12.	Retenção <i>in vitro</i> da vicenina-2 incorporada nas formulações tópicas, 12 horas após a aplicação em pele de orelha de porco.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASC	Área sob a curva
C+	Controle positivo
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DAD	Diode Array Detector
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH [•]	Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EAG	Equivalente de ácido gálico
EQ	Equivalente de quercetina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe	Ferro
GSH	Glutathione reduzida
GSH-Rd	Glutathione-reductase
GSH-Px	Glutathione peroxidases
H [•]	Hidrogênio radicalar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₃ PO ₄	Ácido fosfórico
IC ₅₀	Concentração que inibe 50%

J/cm ²	Joules por centímetro quadrado
KCl	Cloreto de potássio
MDA	Malondialdeído
MS	Mass Spectroscopic
Na ₂ CO ₃	Carbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
O ₂ ⁻	Oxigênio
OH ⁻	Radical hidroxila
PMN	Polimorfonucleares
PVC	Policloreto de vinila
RNA	Ácido ribonucleico
RO [•]	Alcoxila
ROO [•]	Peroxila
ROOH	Hidroperóxidos
RUV	Radiação ultravioleta
SBF	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutases
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
Tris-HCl	Tris-ácido clorídrico
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography
UR	Umidade Relativa
UV	Ultravioleta
UV/VIS	Ultravioleta/Visível

UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
XOD	Xantina oxidase

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Extratos vegetais.....	5
1.2. Penetração cutânea.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIAS E MÉTODOS.....	12
3.1. Obtenção do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i>	13
3.1.1. Identificação e coleta das matrizes.....	13
3.1.2. Obtenção e fracionamento do extrato e da fração.....	13
3.2. Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE.....	14
3.3. Identificação de alguns compostos da fração de <i>Inga edulis</i>	15
3.4. Medida da atividade antioxidante por diferentes métodos.....	16
3.4.1. Medida da atividade doadora de H [•] ao radical DPPH [•]	16
3.4.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD.....	16
3.4.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	17
3.5. Caracterização química do extrato e da fração de média polaridade.....	18
3.5.1. Determinação do teor de polifenóis.....	18
3.5.2. Determinação do teor de flavonóis.....	18
3.6. Avaliação da citotoxicidade do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i>	18
3.6.1. Linhagem e cultivo celular.....	18
3.6.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do Vermelho Neutro....	19
3.7. Avaliação da fotoestabilidade do extrato e da fração de média polaridade do <i>Inga edulis</i>	19
3.7.1. Avaliação da atividade antioxidante	20

3.7.2	Avaliação da citotoxicidade.....	21
3.8	Preparação de formulações tópicas.....	21
3.8.1	<i>Avaliação da atividade antioxidante das formulações.....</i>	24
3.8.2	Estudo de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas.....	24
3.8.2.1	Características organolépticas	24
3.8.2.2	Determinação do valor de pH.....	24
3.8.2.3	Teste de Centrifugação.....	25
3.8.2.4	Perda de água.....	25
3.8.2.5	Estudo do comportamento reológico das formulações.....	25
3.8.2.6	Estabilidade da atividade antioxidante das formulações.....	26
3.9	Estudo de retenção <i>in vitro</i> dos ativos do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> em pele de orelha de porco.....	26
3.9.1	Obtenção da pele.....	26
3.9.2	Escolha do solvente extrator.....	26
3.9.2.1	Análise por Quimioluminescência.....	27
3.9.2.2	Análise por CLAE.....	27
3.9.3	Estudo de recuperação dos compostos com atividade antioxidante pelo método de quimioluminescência e do composto selecionado pelo método CLAE, retidos na pele de orelha de porco.....	28
3.9.3.1.	Análise da Recuperação por Quimioluminescência.....	28
3.9.3.2	Análise da recuperação por CLAE.....	29
3.9.4	Estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> no método de <i>tape stripping</i>	29
3.9.5	Estudo de retenção <i>in vitro</i> de compostos do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> adicionados às formulações tópicas utilizando pele de orelha de porco.....	30
3.9.5.1	Estudo de retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas pelo método CLAE.	31
3.9.5.2	Estudo de retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas pelo método de quimioluminescência.....	32
3.10	Análise estatística dos resultados.....	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1.	Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE.....	34
4.2.	Medida da atividade antioxidante por diferentes métodos.....	39

4.2.1	Medida da atividade doadora de H [•] ao radical DPPH [•]	40
4.2.2	Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD.....	42
4.2.3	Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica.....	44
4.3	Caracterização química do extrato e da fração de média polaridade.....	47
4.3.1	Determinação do teor de polifenóis.....	47
4.3.2	Determinação do teor de flavonoides.....	48
4.4.	Avaliação da citotoxicidade do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i>	48
4.5.	Avaliação da fotoestabilidade.....	50
4.5.1.	Avaliação da atividade antioxidante.....	50
4.5.2.	Avaliação da citotoxicidade.....	53
4.6.	Desenvolvimento de formulações tópicas.....	55
4.6.1.	Avaliação da atividade antioxidante das formulações.....	57
4.6.2.	Estudo de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas.....	59
4.6.2.1.	Características organolépticas.....	59
4.6.2.2.	Determinação do valor de pH.....	59
4.6.2.3.	Teste de centrifugação.....	60
4.6.2.4.	Perda de água.....	61
4.6.2.5.	Estudo do comportamento reológico das formulações.....	61
4.6.2.6	Estabilidade da atividade antioxidante das formulações.....	66
4.7	Estudo de retenção <i>in vitro</i> dos ativos do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> em pele de orelha de porco.....	69
4.7.1.	Escolha do solvente extrator.....	70
4.7.1.1.	Análise por Quimioluminescência.....	70
4.7.1.2.	Análise por CLAE.....	73
4.7.2.	Estudo de recuperação do método de retenção cutânea.....	73
4.7.2.1.	Análise da recuperação por quimioluminescência.....	74
4.7.2.2.	Análise da Recuperação por CLAE.....	76
4.7.3	Estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> no método de <i>tape stripping</i>	77
4.7.4	Estudo de retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas adicionadas do extrato e da fração de <i>Inga edulis</i> utilizando pele de orelha de porco.....	78

4.7.4.1.	Estudo de retenção <i>in vitro</i> do composto vicenina-2 em pele de orelha de porco adicionada do extrato e fração de <i>Inga edulis</i> pelo método CLAE.....	79
4.9.4.1.	Estudo de retenção <i>in vitro</i> das formulações tópicas pelo método de quimioluminescência.....	83
5.	CONCLUSÕES.....	87
6.	REFERÊNCIAS.....	90
7.	ANEXO.....	101

1. Introdução

A pele é exposta a inúmeros agentes químicos, físicos e microbiológicos, muitos dos quais induzem à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dentre esses agentes, destaca-se a radiação ultravioleta (RUV), cuja energia é absorvida pelos cromóforos celulares da pele como melanina, DNA, RNA, proteínas, lipídios, água e aminoácidos aromáticos e convertida em energia química. Esses cromóforos energizados podem reagir com o oxigênio molecular resultando na geração das EROs (GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007; XU; FISHER, 2005; GONZÁLEZ, LORENTE e CALZADA, 2008). Além disso, a RUV é a maior fonte promotora de reações adversas cutâneas e o principal fator ambiental causador de câncer de pele (PEUS et al., 2001). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2011), o câncer de pele não melanoma é o câncer mais comum no mundo e sua incidência continua a aumentar.

A terra é constantemente irradiada com radiação solar, sendo 56% radiação infravermelho (780 a 5000nm), 39% luz visível (400 a 780nm) e 5% radiação ultravioleta (200 a 400nm). A radiação ultravioleta emitida pelo sol divide-se em: UVC (200 a 280nm), UVB (280 a 320nm) e UVA (320 a 400nm). A radiação UVC é a mais energética e assim, a mais prejudicial biologicamente, entretanto, é absorvida pela camada de ozônio da atmosfera terrestre e, desta forma, seu papel nas patologias humanas causadas pela exposição à radiação solar é mínimo (AFAQ; ADHAMI; MUKHTAR, 2005). As radiações UVB e UVA diferem quanto aos seus sítios de ação na geração de lesões. Os raios UVB são mais energéticos que os raios UVA e podem induzir lesões diretamente no DNA, já os raios UVA são menos energéticos que os UVB, mas têm maior poder de penetração, sendo que o seu principal modo de ação se dá pela geração de EROs (VIOUX-CHAGNOLEAU et al., 2006).

Em sistemas aeróbios é essencial o equilíbrio entre a formação de EROs e o sistema de defesa antioxidante. Para proteger-se a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como neutralizadora do agente oxidante antes que ele cause lesão. Esta linha é constituída por glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione-peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutathione-redutase (GSH-Rd) e pela glutathione peroxidase, dentre outros. Exceto a vitamina E, um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Sob tensão normal de oxigênio esses mecanismos de defesa antioxidantes são suficientes para remover os radicais livres produzidos. No entanto, sob algumas circunstâncias, a concentração de radicais livres pode aumentar incontrolavelmente, rompendo o equilíbrio pró-oxidante/antioxidante no organismo, em favor do primeiro, levando ao estresse oxidativo na epiderme viável e na derme, que são tecidos bastante susceptíveis aos danos provocados pela RUV (SIERENS et al., 2001). A presença em altas concentrações e/ou a remoção inadequada dessas EROs pode levar à disfunções metabólicas e danos às macromoléculas biológicas (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 1999).

Nesse contexto, o desenvolvimento de medidas fotoprotetoras tem sido estimulado como uma mudança nos hábitos comportamentais da sociedade humana. Além disso, a auto imagem se tornou um fator importante no mundo moderno, reforçando o interesse em amenizar os sinais do tempo, particularmente o fotoenvelhecimento. Com o objetivo de reduzir os efeitos carcinogênicos e foto danos da radiação solar, recomenda-se o uso de bloqueadores solares contendo filtros ultravioleta (GONZÁLEZ, LORENTE e CALZADA, 2008). No entanto, o aumento do uso de bloqueadores solares tem coincidido com o aumento do câncer de pele. Existem evidências de que o potencial nocivo é consequência da indução da reatividade química dos constituintes dos protetores pela radiação UV. Tem-se atribuído efeitos adversos aos compostos orgânicos usados nas formulações fotoprotetoras, inclusive a formação de componentes promotores do câncer (RAMPAUL; PARKIN; CRAMER, 2007). Estudos conduzidos por Hanson, Gratton e Bardeen (2006) mostraram que quando os filtros solares químicos penetram nas camadas nucleadas da pele, o nível de EROs aumenta além daquele produzido naturalmente pelos cromóforos epiteliais sob radiação ultravioleta. Além disso, trabalhos na literatura já demonstraram que os filtros solares sofrem processos de degradação induzidos pela radiação UV, o que leva a uma redução na capacidade de proteção da pele e também a geração de espécies potencialmente tóxicas (SCALIA; MEZZENA, 2010). Dados da literatura mostram que diversos filtros solares, dentre eles a 3-benzofenona, octilmetoxicinamato e salicilato de octila, penetram através do estrato córneo e são capazes de gerar EROS na epiderme quando submetidos à radiação (HANSON; GRATTON; BARDEEN, 2006).

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. (GUARATINI;

MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007). Os compostos antioxidantes são considerados substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a cadeia de reação oxidativa e sua propagação pelas EROs (AL-MAMARY; AL MEERI; AL-HABORI , 2002; MOREIRA et al., 2002; CHANWITHEESUK et al., 2005; WU et al., 2005; LIMA et al., 2006).

Nos últimos anos, o uso desses agentes antioxidantes botânicos tem recebido considerável atenção como agentes fotoquimiopreventivos. Muitos destes agentes também têm encontrado um lugar nos produtos de cuidado para pele não só com o objetivo de reduzir os danos causados pelas EROs geradas pela RUV como também para complementar a fotoproteção e aumentar a estabilidade de filtros solares químicos (SCALIA; MEZZENA, 2010). Fotoquimioprevenção é o termo que define o uso de agentes capazes de amenizar os efeitos adversos da RUV na pele (F'GUYER; AFAQ; MUKHTAR, 2003). A fotoquimioprevenção tem sido apreciada como um modo viável de reduzir a ocorrência de câncer de pele, assim, a busca por novos compostos com potencial para prevenir o estresse oxidativo tem gerado grande interesse.

As plantas produzem uma variedade de substâncias antioxidantes, das quais os compostos fenólicos são a principal classe, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*. Estes compostos desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007). Eles representam uma classe de metabólitos secundários que podem ser classificados como ácidos fenólicos, flavonóides, estilbenos e lignanas de acordo com sua estrutura química (MANACH et al, 2004; KOH e MITCHELL, 2008)

Assim, o uso de substâncias antioxidantes, por via oral ou tópica, pode auxiliar os sistemas endógenos de proteção contra o estresse oxidativo da epiderme, contribuindo para prevenção de problemas a curto e longo prazo como o envelhecimento cutâneo e câncer de pele. Casagrande e colaboradores (2006) observaram que a administração tópica de antioxidantes é um eficiente modo para enriquecer o sistema protetor antioxidante cutâneo endógeno, e assim uma estratégia de sucesso para reduzir os danos oxidativos à pele causados pela RUV. É importante ressaltar que compostos antioxidantes utilizados topicamente devem exercer sua atividade na epiderme viável ou derme, que são tecidos bastante susceptíveis ao estresse oxidativo (KOHEN, 1999; MORGANTI et al., 2001). Antioxidantes clássicos como vitamina C, vitamina E e betacaroteno, que possuem efeitos contra a radiação UVA e

UVB bem elucidados, tem sido utilizados em formulações fotoprotetoras. Nesse sentido, outros compostos antioxidantes vêm sendo investigados como os polifenóis do chá verde, resveratrol, genisteína, silimarina, quercetina, apigenina, ácidos cafeico e ferrúlico, extratos de pomegranate, *Pinus pinaster* e *Polypodium leucotomus* (GONZÁLEZ, LORENTE e CALZADA, 2008).

1.1. Extratos vegetais

O Brasil possui a maior biodiversidade florística do planeta representando quase 20% da flora mundial, abrigando mais de 56.000 espécies de plantas (GIULIETTI et al., 2005; SANDES, BLASE, 2004). Diante de tamanha biodiversidade, o Brasil deveria ocupar um lugar privilegiado dentro do contexto mundial de fitoterápicos. Entretanto, o Brasil se encontra hoje como comprador de tecnologias importadas ou pagador de *royalties* para laboratórios farmacêuticos estrangeiros. O Ministério do Meio Ambiente estima que populações indígenas brasileiras dominem a aplicação medicinal de 1300 plantas brasileiras. A opção de conduzir pesquisas a partir da indicação de plantas utilizadas por comunidades pode encurtar o percurso do desenvolvimento de uma nova droga, já que os pesquisadores dispõem, antes mesmo de iniciarem os estudos científicos, uma indicação de qual atividade biológica esta droga poderia apresentar (SILVEIRA, 2003; FUNARI, FERRO, 2005).

Os mercados de produtos derivados de plantas (fitoterápicos, suplementos alimentares, cosméticos, repelentes de insetos, corantes, etc.) vêm conquistando uma grande expansão mundial, sendo que 25% dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais. Diante disso, vê-se que os países detentores de grande biodiversidade têm a oportunidade de entrar em mercados bilionários, como o farmacêutico e o de suplementos alimentares, que movimentam cerca de 320 e 31 bilhões de dólares/ano, respectivamente (FUNARI, FERRO, 2005).

Nesse contexto, o governo federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos com o objetivo de garantir à população o uso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos (Decreto número 5.813 de junho de 2006), o que se tornou um estímulo para o estudo das propriedades farmacológicas e toxicológicas de extratos vegetais.

A árvore *Inga edulis* Martius (figura 1) pertencente à família Leguminosae, da sub-família Mimosoideae, é nativa da América Tropical e é amplamente distribuída e cultivada na Amazônia e na América Central. A espécie possui muitos nomes vulgares, mostrando a sua importância para a população interiorana: ingá, ingá-cipó, ingá-de-metro, ingá-doce, ingá-de-macaco, ingá-macarrão, rabo-de-mico (Brasil); guamo, guama (Colômbia, Venezuela, Costa Rica); pacaie sogá, pacaie silvestre (Peru) (FALCÃO, CLEMENT, 2000). É utilizada na medicina popular como antidiarreico e a infusão das folhas é utilizada como anti-inflamatório (SOUZA et al., 2007; SILVA, ROGEZ, LARONDELLE, 2007). De acordo com Falcão e Clement (2000), da poupa do fruto é preparado um xarope usado na medicina caseira contra bronquites e a decocção da casca é empregada na cura de feridas e diarreias.

Figura 1 – Árvore *Inga edulis* Martius

Silva, Rogez e Larondelle (2007) relataram que a propriedade anti-inflamatória pode ser relacionada ao fato das folhas serem ricas em compostos fenólicos, principalmente em flavan-3-óis ((+)-catequina e (-)-epicatequina) e flavonóis (miricetina 3-*O*- α -ramnopiranosídeo e quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo), identificados por Souza e colaboradores (2007) em extrato metanol-água. Posteriormente, Dias, Souza e Rogez (2010) identificaram compostos da fração aquosa do extrato das folhas de *Inga edulis* que foi extraído por uma partição líquido-líquido com hexano: ácido gálico, procianidina B1, catequina, procianidina B2, epicatequina,

miricetina 3-O-a-L-ramnopiranosídeo, quercetina 3-O-a-L-ramnopiranosídeo, miricetina e quercetina.

O extrato das folhas de *Inga edulis* apresenta elevada capacidade antioxidante. Souza e colaboradores (2008) estudaram e compararam o potencial antioxidante de extratos oriundos das folhas, cascas e frutos de quatro plantas amazônicas: *Byrsonima crassifolia*, *Davilla Kunthii*, *Davilla rugosa* e *Inga edulis* por várias metodologias. Este estudo concluiu que as folhas são a melhor fonte de polifenóis com capacidade antioxidante e dentre os extratos das folhas estudados, o de *Inga edulis* foi o que apresentou maior potencial antioxidante.

Nesse contexto, derivados das folhas de *Inga edulis* são promissores para a avaliação da atividade fotoquimiopreventiva. Anteriormente ao estudo de Silva e colaboradores (2007a), o uso das folhas de *Inga edulis* era limitado ao extrato bruto, porém utilizando técnicas de adsorção em resinas macroporosas obtêm-se extratos enriquecidos.

1.2. Penetração cutânea

Para obter a atividade antioxidante e fotoquimioprotetora, o componente ativo presente na formulação deve penetrar na pele que intacta, apresenta-se como uma eficiente barreira contra a penetração e permeação de substâncias exógenas. O que representa uma proteção ao ser humano se torna um fator limitante na ação das substâncias de atividade terapêutica e cosmética aplicadas topicamente (BABY et al., 2008; HADGRAFT, 2004). Sendo assim, a pele representa um desafio, devido à sua função barreira, e também uma oportunidade, devido à longa extensão e possibilidade de modular a função barreira. A penetração cutânea de princípios ativos através da pele apresenta como primeiro fator limitante o estrato córneo devido ao fato de ser a interface do organismo com o meio ambiente e à sua estrutura que o torna altamente resistente às agressões externas como exposição a solventes orgânicos, soluções ácidas e básicas e enzimas proteolíticas. Além disso, ele protege o organismo contra a entrada de microrganismos e de toxinas naturais ou sintetizadas pelo homem e atua como uma barreira semipermeável à água, eletrólitos e não eletrólitos (ASBILL; MICHNIAK, 2000; FARTASCH, 1996; FOLDVARI, 2000). A penetração de substâncias ativas na pele depende de dois passos consecutivos: a liberação dessa substância pelo veículo e, sua subsequente penetração cutânea. A penetração de substâncias através da pele, em condições normais, ocorre principalmente através dos espaços intercelulares

(HADGRAFT, 2004). As substâncias ativas incorporadas em veículos inadequados podem penetrar pouco ou quase nada na pele. Baseado neste fato pode-se considerar que estudos sobre as particularidades dos veículos são de grande interesse na área dos produtos farmacêuticos e dermatológicos (BENTLEY, 1994 e CHORILLI, et al., 2007).

A eficácia de produtos farmacêuticos ou dermatológicos apresentando em sua composição princípios ativos funcionais é dependente da penetração limitada destes na pele. Os métodos existentes que promovem aumento deste processo se fundamentam no aumento do coeficiente de difusão e/ou solubilidade da droga na pele e aumento do grau de saturação do ativo na formulação (MOSER et al., 2001). Assim, a penetração de um ativo na pele pode ser otimizado pelo emprego de promotores de absorção; pelo estudo profundo das características químicas e físico-químicas das substâncias ativas e a possibilidade do emprego de seus derivados quando estas forem desfavoráveis; pela utilização de sistemas veiculados de liberação, como microemulsão, ciclodextrinas, nanossomas, lipossomas ou formulações supersaturadas e ação de agentes promotores físicos de penetração, como iontoforese, sonoforese e eletroporação (BABY et al., 2008; BENTLEY et al., 1997; NAIK, KALIA, GUY, 2000).

Dal Belo e colaboradores (2009) avaliaram a penetração da quercetina em formulações com extrato de *Ginkgo biloba* e da epigallocatequina-3-galato (EGCG) em formulações com extrato de chá verde e concluíram que ambos os flavonóides tiveram boa penetração e retenção na epiderme viável após 24 horas. Saija e colaboradores (1998) estudaram a liberação, penetração e permeação cutânea dos flavonóides quercetina, naringenina e hesperetina por metodologias *in vitro* em células de difusão e concluíram que estes flavonóides podem ser empregados topicamente como agentes fotoprotetores desde que estejam veiculados em formulações adequadas. Arct e colaboradores (2002) avaliaram a permeação da rutina, catequina e quercetina na presença de adjuvantes hidrofílicos (umectantes) e sua influência no perfil de permeação dos flavonóides através de uma membrana artificial. Segundo os resultados experimentais obtidos, estas substâncias atuaram como inibidores da permeação dos flavonóides em estudo, porém, em níveis diferentes de inibição. Saija e colaboradores (1995) estudaram a interação dos flavonóides quercetina, naringenina, hesperetina e rutina com biomembranas.

Além de penetrar na epiderme viável, agentes fotoquimiopreventivos devem ser fotoestáveis, uma vez que a degradação de compostos induzida pela luz pode resultar em uma diminuição da eficiência e também em efeito adverso após a administração pela

geração de metabólitos indesejáveis (VICENTINI et al., 2007a). Estes metabólitos podem causar reações alérgicas, uma vez que eles podem interagir com excipientes da formulação ou componentes da pele como o sebo, podendo levar à formação de novas moléculas com propriedades toxicológicas desconhecidas (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2006).

Assim, em colaboração com a empresa Amazon Dreams S.A. (localizada em Belém do Pará e incubada na UFPA), que gentilmente cedeu o extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis*, este trabalho avaliou o potencial fotoquimiopreventivo do extrato e da fração de ingá com o objetivo de proporcionar formulações adicionadas destes ativos, que sejam estáveis física e quimicamente e que promovam uma maior retenção de compostos antioxidantes na pele. É importante ressaltar que tanto o extrato como a fração de *Inga edulis* nunca haviam sido incorporados em formulações tópicas, nem tão pouco em estudos direcionados para avaliar o potencial fotoquimioprotetor, o que ressalta a importância científica do trabalho realizado.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi estudar o potencial fotoquimioprotetor do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* e preparar formulações a fim de selecionar a que prover melhor liberação, penetração e retenção dos compostos antioxidantes do extrato e/ou da fração na epiderme viável.

2.2. Objetivos específicos

- Obter os perfis cromatográficos do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Identificar os principais compostos comuns ao extrato e à fração;
- Investigar o potencial sequestrador de radicais livres do extrato e da fração empregando diferentes métodos *in vitro*;
- Realizar a caracterização dos extratos pela determinação de polifenóis e flavonóis totais;
- Avaliar a toxicidade do extrato e da fração em cultivos celulares;
- Avaliar a fotoestabilidade do extrato e da fração frente às radiações UVA e UVB em relação à capacidade antioxidante e citotoxicidade celular;
- Preparar formulações tópicas estáveis com diferentes proporções de material graxo adicionadas do extrato e da fração;
- Avaliar a retenção/permeação do(s) componente(s) do extrato e da fração na pele de orelha de porco, utilizando a Célula de Franz utilizando os métodos de quimioluminescência e CLAE, para medir a atividade antioxidante e os componentes que penetraram na epiderme viável, respectivamente;
- Avaliar qual o mais adequado para penetração e retenção cutânea - o extrato ou a fração - pela comparação dos resultados obtidos para o mesmo tipo de formulação;
- Avaliar a influência da quantidade de componentes graxos das formulações na penetração, retenção e permeação dos componentes comuns ao extrato e à fração de média polaridade;
- Identificar o possível composto que penetrou e ficou retido na epiderme viável.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção do extrato e da fração de *Inga edulis*

3.1.1. Identificação e coleta das matrizes

O extrato etanólico de *Inga edulis* e sua fração enriquecida em compostos de média polaridade foram gentilmente cedidos pela empresa Amazon Dreams S.A., localizada em Belém –PA, incubada na UFPA.

Folhas de plantas adultas de *Inga edulis* foram colhidas em Igarapé- Açú (Pará, Brasil) e identificada de acordo com sua exsicata por um profissional qualificado do Museu Emílio Golgi, fiel depositor para estes vegetais.

3.1.2 Obtenção e fracionamento do extrato e da fração

Este processo como um todo, foi patenteado em regime de co-titularidade pela UFPA e Amazon Dreams sob o nome “Processo de extração e purificação de compostos fenólicos de *Inga edulis* e *Byrsonima crassifolia* através de adsorção e eluição sobre resinas” (PI-0001 de 03/01/2008) e não pode, por motivos de propriedade intelectual, ser detalhado além daquilo que nos foi repassado.

Após serem transportadas até a empresa, as folhas foram selecionadas (eliminando aquelas que apresentavam qualquer forma de praga), lavadas duas vezes com água corrente para remoção de poeira e material estranho e secas em estufa industrial com circulação de ar forçado a 60 °C por 8 horas. Foram depois moídas em moinho industrial para alcançar partículas com granulometria de 0,3 a 1,0 mm. A matéria-prima foi então guardada no abrigo da luz e a temperatura de 4°C por uma noite (SILVA, ROGEZ e LARONDELLE, 2007).

No dia seguinte, as folhas em pó foram submetidas a um processo de extração hidroalcóolica utilizando bioetanol a 70°GL na proporção 1:3 (m/m). Em seguida, ocorreu uma etapa de filtração, onde foi separada a borra e minimizados alguns compostos indesejáveis como açúcar, gordura, terpenos e pigmentos. O filtrado foi encaminhado para um concentrador a vácuo (o qual funciona exatamente na mesmas condições que um rotavapor), originando o extrato bruto, após recuperação da totalidade do álcool.

Este extrato bruto foi então submetido a um processo de purificação parcial empregando resinas macroporosas sintéticas do tipo SDVB (Estireno Di Vinil Benzeno) (SILVA, et al., 2007a) e adsorvendo o extrato aquoso em condições específicas de vazão e temperatura, e desorvendo o extrato com bioetanol e concentrando novamente o dessorbato sob vácuo em concentrador industrial.

Por fim, foi feito um enriquecimento parcial do extrato re-adsorvendo parte do extrato purificado sobre outra resina macroporosa (do tipo acrílica) até atingir sua saturação, e utilizando um gradiente de polaridade decrescente na sua dessorção (com quantidades crescentes de bioetanol), utilizando soluções hidroalcoólicas de 0, 32, 64 e 96° GL. A fração de interesse para este estudo compreende os dessorbatos obtidos após eluições nas concentrações de 32 a 64°GL, na qual estariam presentes os compostos fenólicos de polaridade intermediária. O solvente da fração foi evaporado no concentrador industrial.

O extrato aquoso purificado e a fração intermediária foram finalmente congelados a -40°C por uma noite e liofilizados por 48 horas em liofilizador semi-industrial até secar quase completa e acondicionamento em recipientes opacos de 10, 20 e 30 g. A liofilização foi feita para minimizar a degradação dos compostos fenólicos até seu uso nas dependências da FCFRP.

3.2. Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE

Componentes do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* foram cromatograficamente separados em coluna C18 Inertsil® ODS-4 (3µm), 4,6 x 150 mm acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária. A fase móvel constituiu-se de água (A) e acetonitrila (B), ambas adicionadas de ácido fórmico 0,1%. A eluição dos componentes de ambos, extrato e fração, foi em gradiente por estepe, de acordo com as condições mostradas na tabela 1. A vazão utilizada foi de 0,8 mL/min.

Utilizou-se o cromatógrafo a líquido Shimadzu, modelo LC-10AT, acoplado a detector UV/VIS, modelo SPD-10A, integrador, modelo C-R6A, onde as amostras foram injetadas em um injetor Rheodyne com um loop de 20 µL e a detecção foi realizada no comprimento de onda de 280 nm.

Tabela 1 – Gradiente por estepe utilizado na eluição dos compostos do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Tempo (minutos)	Fase móvel B (%)	Tempo (minutos)	Fase móvel B (%)
0	2	23	12
5	5	26	12
6	5	27	13
11	9	30	13
12	9	40	15
15	10	43	15
17	10	83	28
19	11	85	2
21	11	90	2

A linearidade do método analítico foi avaliada utilizando-se os coeficientes de correlação linear das curvas de calibração obtidas pela correlação entre as alturas do pico de vicenina e as concentrações das soluções de extrato, da fração de média polaridade ou do padrão de vicenina-2. Para isto, amostras de 10 mg do extrato e da fração foram solubilizados em 10 mL de metanol 80% em balão volumétrico e então estas soluções mães foram diluídas de forma a obter soluções nas seguintes concentrações: 250; 125; 62,5; 56 e 31,25 µg/mL. A massa de 2mg de vicenina-2, pesada em balança analítica, com precisão de cinco casas após a vírgula, foi solubilizada em metanol 80%, em balão volumétrico de 2 mL. A solução mãe, 1mg/mL, foi diluída para obter as soluções nas seguintes concentrações: 3,125; 2,344; 1,562; 0,781 e 0,391 µg/mL.

3.3. Identificação de alguns compostos da fração de *Inga edulis*

Alguns compostos da fração de *Inga edulis* foram identificados por UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS pela empresa Lychnoflora. A metodologia utilizada está em anexo.

3.4. Medida da atividade antioxidante por diferentes métodos

A atividade antioxidante do extrato e da fração foi avaliada por diferentes métodos que simulam a formação de EROs e pelo método do radical estável DPPH. A atividade antioxidante foi expressa pela porcentagem de inibição versus a concentração de extrato ou da fração no meio reacional, sendo que a porcentagem de inibição foi determinada pela fórmula (GEORGETTI et al., 2003):

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{\text{Amostra} \times 100}{\text{Controle Positivo}}$$

Amostra = Absorbância da amostra, nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) da amostra, nos métodos quimioluminescentes.

Controle Positivo (C+) = Absorbância do C+ nos métodos espectrofotométricos, ou a área sob a curva (ASC) do C+ nos métodos quimioluminescentes.

3.4.1. Medida da atividade doadora de H[•] ao radical DPPH[•]

A atividade antioxidante do extrato e da fração foi determinada pela diminuição da absorbância da solução de 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH[•]) utilizando o método descrito por Blois (1958).

Em tubos de ensaio, foram adicionados 500µL de tampão acetato de sódio (0,1M) pH 5,5, 500µL de álcool etílico (95%), 25µL de amostra e 250µL de solução alcoólica de DPPH[•] (200µM). O controle positivo não continha a amostra e o branco foi constituído de 500µL de tampão acetato 0,1M pH 5,5 e 750µL de etanol. Depois de 10 minutos a leitura foi realizada a 517nm em espectrofotômetro Hitachi U2001. A variação da absorbância, proporcionada pelas amostras do extrato e da fração, foi comparada à absorbância do controle positivo (apenas DPPH[•]), que corresponde à absorbância máxima (100%).

3.4.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD

Este ensaio foi realizado para avaliar a atividade sequestradora do ânion superóxido segundo Girotti e colaboradores (2000).

Em tubos próprios para luminômetro, foram pipetados 400µL de solução preparada acrescentando EDTA (1mM) ao tampão glicina (0,1M) pH 9,4. Então, foram adicionados 150µL de xantina (6mM), 10µL de amostra teste e 10µL da solução de luminol (0,6mM). A reação foi iniciada com a adição de 100µL de solução recém preparada de xantina oxidase (20mUN/mL) mantida resfriada no gelo. A medida da quimioluminescência foi realizada em lumiômetro Autolumat LB953 durante 5 minutos a 25°C. Durante o período de análise, o luminômetro realiza a contagem de fótons emitidos pelas amostras e fornece um gráfico da quantidade de fótons (y) pelo tempo em minutos (x). A porcentagem de inibição da quimioluminescência foi calculada pela medida da área sob a curva (ASC), como descrito no item 3.4.

3.4.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

A medida da inibição da peroxidação lipídica foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica. O MDA é um dialdeído de três carbonos, com grupos carbonilas nos carbonos C-1 e C-3, que reage com duas moléculas do ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando um cromóforo rosa que é detectado espectrofotometricamente em 535 nm (OHKAWA et al., 1979).

Em 1mL de meio reacional contendo KCl (130mM) e Tris-HCl (10mM) pH 7,4, foram adicionados 10µL de citrato de sódio (200mM), 10µL de amostra teste, suspensão de mitocôndria (1mg de proteína) e 10µL sulfato ferrosos amoniacal (50mM). A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos (RODRIGUES et al., 2002). Para determinação do MDA formado, 1mL de ácido tiobarbitúrico (1%) (TBA) preparado em NaOH (50mM), 100µL de NaOH (10M) e 500µL de H₃PO₄ (20%) foram adicionados, seguido por incubação de 20 minutos a 85°C (OHKAWA et al., 1979). O complexo MDA-TBA foi extraído com n-butanol, centrifugado a 3000rpm por 10 minutos e a leitura da absorbância foi realizada a 535nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001 (BUEGE; AUST, 1978). Concomitantemente, foram feitos o branco (ausência de mitocôndrias), o controle positivo (ausência de amostra), o controle do solvente (etanol 50% com ausência do extrato e da fração) e o controle negativo (ausência de ferro). As mitocôndrias utilizadas foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Toxicologia da

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP – USP).

3.5. Caracterização química do extrato e da fração de média polaridade

3.5.1. Determinação do teor de polifenóis

O teor de polifenóis totais foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão de referência para a construção da curva de calibração.

Foram adicionados a 500µL da amostra ou solução de ácido gálico, 500µL do reagente Folin-Ciocalteu e 500µL da solução de Na₂CO₃ (10%). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 760nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de amostra foi substituída pela mesma quantidade de água deionizada. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato e fração (KUMAZAWA et al., 2004).

3.5.2. Determinação do teor de flavonóis

O teor de flavonóides totais foi avaliado de acordo com Kumazawa e colaboradores (2004), sendo a quercetina empregada como padrão de referência para a construção da curva de calibração.

Foram adicionados a 500µL de soluções de extrato, da fração de média polaridade ou do padrão quercetina, 500µL de solução hidroetanólica 50% (v/v) de cloreto de alumínio a 2% (p/v). Após a incubação por 1 hora à temperatura ambiente, a leitura foi realizada a 420nm em espectrofotômetro Hitaschi U2001. Para zerar o aparelho, a alíquota de cloreto de alumínio (2%) foi substituída pela mesma quantidade de etanol 50% (v/v). O conteúdo de flavonóides totais foi expresso como mg de equivalente de quercetina (EQ) por g de extrato ou fração (KUMAZAWA et al., 2004).

3.6. Avaliação da citotoxicidade do extrato e da fração de *Inga edulis*

3.6.1. Linhagem e cultivo celular

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem L929 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. Essas foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), penicilina (100U/mL), estreptomicina (0,1mg/mL) e anfotericina B (0,25µg/mL); e incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

3.6.2. Determinação da viabilidade celular pelo ensaio do Vermelho Neutro

O ensaio de viabilidade pelo método do vermelho neutro é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis não injuriadas (BORENFREUND et al., 1988).

As células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e, 24 horas depois, foi realizado o tratamento com várias diluições do extrato e da fração em meio não suplementado com SBF (meio incompleto). Vinte e quatro horas após o tratamento com os extratos, foi adicionado 200µL de vermelho neutro (50µg/mL) em cada poço e a placa foi incubada na estufa por 3 horas. Após este período, o vermelho neutro foi removido e as células foram lavadas com uma solução de formaldeído 1% (v/v) e CaCl₂ 1% (p/v); e, em seguida, foram adicionado 200µL de etanol com ácido acético 1% (v/v). A leitura da absorbância foi realizada após 30 minutos à temperatura ambiente em leitor de microplacas (µQuant) em 540nm (BORENFREUND et al., 1988). A escolha deste método para avaliar a citotoxicidade do extrato e da fração de *Inga edulis* foi devido à menor interferência de ambos na leitura da absorbância em 540 nm.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle sem tratamento.

3.7. Avaliação da fotoestabilidade do extrato e da fração de média polaridade do *Inga edulis*

Um grama do extrato e da fração de média polaridade de *Inga edulis* foi solubilizado em 10 g de solução propilenoglicol : água (50 : 50) e colocados em placas de área 9,62 cm² para posterior exposição às radiações UV. Como controle do solvente, foram preparadas soluções de propilenoglicol : água (50 : 50) e foram também expostas

às radiações. As soluções foram submetidas por 4 horas às RUVs predominantemente UVA ($65,48 \text{ J/cm}^2$ UVA e 38 mJ/cm^2 UVB) e predominantemente UVB ($8,95 \text{ J/cm}^2$) separadamente. A fonte de luz utilizada para radiação UVB foi uma lâmpada fluorescente modelo PHILIPS TL40W/12 RS (Medical Holand), que emite radiação na faixa de λ de 270 a 400 nm com pico máximo de emissão em torno de 313 nm. A fonte de luz utilizada para radiação UVA foram quatro lâmpadas TLK 40W/10R (Philips, Holland, 60 cm), cujo espectro de emissão está ilustrado na figura 2. As soluções foram pesadas antes e após a irradiação. Quando houve diminuição de peso decorrente da evaporação da fração aquosa, as soluções foram completadas com água até atingir o peso inicial. Soluções controle, preparadas nas mesmas condições, não foram expostas à radiação.

Figura 2: Espectro de emissão da lâmpada UVA (400-320 nm) (FONSECA, 2009).

A possível degradação dos compostos presentes no extrato e na fração foi avaliada pela medida da atividade antioxidante e pela possível alteração da citotoxicidade em células de linhagem L929.

3.7.2. Avaliação da atividade antioxidante

Foram avaliadas as atividades antioxidantes das soluções irradiadas e sem irradiar pela medida da atividade doadora de $\text{H}^\bullet$ ao radical $\text{DPPH}^\bullet$ e pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. As soluções

foram diluídas de forma a conseguir concentrações do extrato e da fração correspondentes à quantidade necessária para se obter porcentagem de inibição do sistema de aproximadamente 50%.

3.7.3. Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade do extrato e da fração irradiados e não irradiados foram comparados, utilizando o ensaio de vermelho neutro (item 3.6.2) com objetivo de identificar possíveis interferências das radiações UVA e UVB na viabilidade celular.

Para isso, as células da linhagem L929 foram semeadas em placas de 96 poços conforme já descrito e 24 horas depois, foi realizado o tratamento com várias diluições do extrato e da fração irradiados e não irradiados na mesma placa a fim de minimizar possíveis interferências entre os ensaios.

3.8. Preparação de formulações tópicas

Diversas formulações foram preparadas a fim de selecionar as estáveis frente ao teste de centrifugação após 24 horas da incorporação do extrato e fração. Destas, foram selecionadas três, com diferentes proporções de material graxo, cuja composição pode ser visualizada na tabela 2. As formulações instáveis e, portanto não selecionadas foram listadas na tabela 3 e foram preparadas pelo método de inversão de fases. As formulações Hostacerin SAF[®] (F1) e gel (F2) foram preparadas a frio por agitação a 300 rpm, em agitador mecânico (Fisatom, modelo 713 D). O extrato e a fração de média polaridade foram previamente solubilizados em solução de propilenoglicol e água (50:50), e incorporados na concentração de 1% na fase aquosa destas formulações. Já a formulação a base de Lanette N[®] e Aristoflex AVC[®] (F3), foi preparada pelo método de inversão de fases, sendo as fases aquosa e oleosa aquecidas separadamente até 75°C e, em seguida, misturadas em agitador mecânico a 400 rpm. Após resfriamento, foi acrescentado o conservante e após 24 horas foi incorporado o extrato e a fração na concentração de 1% previamente solubilizados em solução de propilenoglicol:água (50:50). Foram preparadas formulações placebo sem adição do extrato ou fração para cada formulação. As formulações foram acondicionadas em potes de PVC opacos brancos, com capacidade para 50 g, para posterior teste de estabilidade.

Tabela 2: Composição das formulações selecionadas

Componentes	F1E	F 2E	F3E	F 1F	F2F	F3F
Hostacerin SAF ^{®*}	6%	-	-	6%	-	-
Aristoflex AVC ^{®**}	-	3%	1,5%	-	3%	1,5%
Lanette N ^{®***}	-	-	10%	-	-	10%
Triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico	-	-	3%	-	-	3%
Óleo de macadâmia	-	-	2%	-	-	2%
Phenova	-	-	0,5%	-	-	0,5%
Nipaguard CG [®]	0,05%	0,05%	-	0,05%	0,05%	-
Propilenoglicol	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Água	87,95%	90,95%	77%	87,95%	90,95%	77%
Extrato de <i>Inga edulis</i>	1%	1%	1%	-	-	-
Fração de média polaridade	-	-	-	1%	1%	1%

* Acriloildimetil-taurato de amônio, Copolímero VP, ésteres de sorbitol, fosfato de trilaurete-4, óleo mineral e palmitato de isopropila

**Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona Neutralizado

***Base auto-emulsionante aniônica composta por uma combinação de álcoois graxos e lauril miristil sulfato de sódio.

Tabela 3: Composição de outras formulações testadas e não selecionadas

Componentes	F4	F5	F6	F 7	F8	F9	F10
Polawax [®]	10%	15%	20%	-	-	-	-
Cosmowax [®]	-	-	-	8%	-	-	-
Natrosol [®]	-	-	-	0,5%	-	-	-
Lanette N [®]	-	-			10%	15%	20%
Cetio V [®]	-	-	-	2%	-	-	-
Lanolina	-	-	-	2%	-	-	-
Nipaguard CG [®]	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%	0,05%
Propilenoglicol	5%	5%	5%	5%	5%	5%	5%
Extrato ou fração de <i>Inga edulis</i>	1%	1%	1%	1%	1%	1%	1%
Água	83,95%	78,95%	73,95%	81,45%	83,95%	78,95%	73,95%

3.8.1. Avaliação da atividade antioxidante das formulações

A atividade antioxidante das formulações adicionadas ou não do extrato e da fração foi avaliada pela medida da atividade doadora de elétrons do hidrogênio ao radical DPPH• e pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Para isso as formulações adicionadas e não adicionadas de extrato e fração foram diluídas em solução hidroalcoólica 50% para o método de DPPH• e em tampão glicina (0,1 M) pH 9,4 para o método de quimioluminescência de forma a conseguir concentrações necessárias de extrato e fração para inibir em 50% a quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol e para reduzir em 50% o radical DPPH•. As porcentagens de inibição das formulações foram comparadas com a porcentagem de inibição do extrato e da fração não veiculados.

3.8.2. Estudo de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas

O estudo de estabilidade preliminar foi realizado em condições extremas de temperatura. Adotou-se ciclos de 24 horas a $40 \pm 2^\circ\text{C}$, e 24 horas a $4 \pm 2^\circ\text{C}$ por 12 dias. As análises dos parâmetros características organolépticas e características físico-químicas (valor de pH, centrifugação e perda de água) foram realizadas em formulações recém preparadas, no tempo zero e durante todos os dias do estudo (ISAAC et al., 2008; BRASIL. ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos). Também foram avaliadas as propriedades reológicas e a estabilidade funcional pela medida da redução do radical DPPH• e pela medida da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol no tempo zero e no último dia do estudo.

3.8.2.1. Características organolépticas

As amostras foram analisadas visualmente quanto ao aspecto, cor, odor, homogeneidade e separação de fases (ISAAC et al., 2008; BRASIL. ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004).

3.8.2.2. Determinação do valor de pH

A avaliação de pH foi realizada pela determinação direta do pH em soluções aquosas das amostras a 10% (p/v), utilizando peagâmetro Digimed DM20 (DIMAMBRO; FONSECA, 2005).

3.8.2.3. Teste de Centrifugação

O teste de centrifugação foi realizado utilizando 2 g de cada amostra, submetendo-as à centrifugação a 1660 x g por 30 minutos em centrífuga (Eppendorf 581OR). O critério de aceitabilidade foi a não ocorrência da separação de fases (MAIA CAMPOS; BRADA, 1992).

3.8.2.4. Perda de água

As formulações desenvolvidas foram monitoradas quanto à perda de água, a qual foi avaliada pesando os potes contendo as formulações nos diferentes períodos de análise e calculando a porcentagem de perda de peso, associada à perda da fração aquosa.

3.8.2.5. Estudo do comportamento reológico das formulações

O comportamento reológico das formulações recém preparadas e daquelas que passaram pelo ciclo de 12 dias foi determinado. Cada ensaio foi realizado a 25°C usando um reômetro tipo cone/prato (R/S plus controlled stress rheometer middle boco, USA) com spindle P-25. Uma quantidade de amostra necessária para cobrir toda a superfície do sistema foi colocada sobre a placa. Os parâmetros foram estabelecidos através do “software” RHEOCALC 2000. O tempo de análise foi de 60 segundos para curva ascendente e 60 segundos para curva descendente (as leituras para obtenção dos dados foram feitas de 2 em 2 segundos num total de 60 leituras). O gradiente de cisalhamento foi de 0 a 200 rpm .

Os gráficos obtidos relacionam os valores de gradiente de cisalhamento (1/s) no eixo das abcissas, com os valores de tensão de cisalhamento (Pa) no eixo das ordenadas. Os reogramas obtidos foram matematicamente analisados pela equação de Ostwald: $\tau = k\dot{\gamma}^n$, onde τ é a tensão de cisalhamento, $\dot{\gamma}$ é a taxa de cisalhamento, k é o índice de consistência e n é índice de fluxo.

Quando $n = 1$ o fluxo é considerado Newtoniano, $n > 1$ é classificado como plástico e $n < 1$ indica que é pseudoplástico. O programa Brookfield, RHEOCALC version V 1.01 foi usado para obter os valores de viscosidade aparente, índice de fluxo e tixotropia. O comportamento reológico para cada formulação foi determinado em triplicata.

3.8.2.6. Estabilidade da atividade antioxidante das formulações

A avaliação foi realizada pela medida da atividade doadora de $H^\bullet$ ao radical DPPH $^\bullet$ e pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Após serem submetidas ao estudo de estabilidade, as formulações foram diluídas conforme o item 3.7.1 e comparadas com aquelas que não foram submetidas às diferentes condições do estudo de estabilidade.

3.9. Estudo de retenção *in vitro* dos ativos do extrato e da fração de *Inga edulis* em pele de orelha de porco.

3.9.1. Obtenção da pele

Utilizou-se pele de orelha de porco como modelo nos estudos *in vitro* de penetração/retenção cutânea. Para tal, a pele da parte externa das orelhas provenientes de animais recentemente mortos foi retirada da cartilagem com auxílio de pinça e bisturi e estocadas a -80°C por um período de 3 meses. No momento da utilização, a pele foi descongelada e removeu-se o tecido gorduroso com auxílio de tesoura sendo que somente a epiderme e a derme foram isoladas.

3.9.2. Escolha do solvente extrator

Secções de $1,77\text{ cm}^2$ de pele de orelha de porco limpas tiveram o estrato córneo retirado pelo método de *tape stripping*, utilizando 15 fitas adesivas tipo “durex”. Essas amostras de pele foram enriquecidas com quantidade conhecida da fração de *Inga edulis* e em seguida picotadas com o auxílio de tesoura e transferidas para tubo falcon.

Testaram-se diferentes solventes extratores a fim de escolher o mais adequado para a extração dos compostos da fração de *Inga edulis*, com menor interferência

possível na determinação da atividade antioxidante provocada pelos componentes inerentes da pele.

Adicionou-se 2,5 mL de solvente extrator no tubo contendo as peles picotadas e deixou-se em banho de ultra-som por 30 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo falcon e adicionou-se novamente 2,5 mL de solvente extrator ao tubo contendo a pele picotada, repetindo-se o procedimento de extração. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para o tubo falcon e analisou-se a recuperação dos compostos por CLAE e a recuperação dos compostos com atividade antioxidante pela medida da porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Para cada solvente extrator utilizado, foi feito um branco adicionando-se somente o solvente na pele e procedendo-se a extração.

3.9.2.1. Análise por Quimioluminescência

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para as amostras foi comparada com a porcentagem de inibição gerada pelo branco e com a porcentagem de inibição gerada pelo branco adicionado da fração na mesma concentração final das amostras. Como controle utilizou-se a fração de *Inga edulis* também na mesma concentração final que as amostras. Assim, foi possível verificar o solvente mais apropriado para realizar o estudo de recuperação do método de penetração/retenção cutânea.

3.9.2.2. Análise por CLAE

As amostras, seus respectivos brancos e a fração de *Inga edulis* na mesma concentração final que as amostras (controle) foram analisadas por CLAE. Para isso, as amostras, os brancos e o controle foram secos sob ar comprimido e ressuspensos em volume adequado para atingir concentração final de 250 µg/mL. As condições cromatográficas utilizadas foram aquelas já descritas anteriormente. Para determinação da porcentagem de recuperação utilizou-se a equação:

$$\% \text{ de Recuperação} = \frac{h(\text{amostra}) \times 100}{h(\text{controle})}$$

onde: h (amostra) é a altura do pico selecionado das amostras recuperadas e h (controle) é a altura do pico selecionado do controle.

3.9.3. Estudo de recuperação dos compostos com atividade antioxidante pelo método de quimioluminescência e do composto selecionado pelo método CLAE, retidos na pele de orelha de porco.

Em secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco limpas e sem o estrato córneo, adicionou-se 100 µL das soluções de 2000, 500 e 200 µg/mL de extrato ou fração de *Inga edulis*. Assim, as massas de 200, 50 e 20 µg de extrato ou fração de *Inga edulis*, correspondendo a 10%, 2,5% e 1% das quantidades do extrato ou fração presentes em 200 mg de formulação, respectivamente, foram adicionados às secções de pele. Para cada nível de concentração foram utilizadas três secções de pele. Um branco foi feito adicionando-se o solvente extrator escolhido também em três secções de pele. Procedeu-se a extração conforme item 3.9.2, utilizando-se o solvente extrator metanol:água (80:20) escolhido anteriormente.

3.9.3.1. Análise da Recuperação por Quimioluminescência

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para cada nível de concentração do extrato e da fração (2,5 e 1%) foi comparada com a porcentagem de inibição gerada pelo branco adicionado de extrato e da fração de *Inga edulis* nas concentrações acima citadas. As peles adicionadas da maior concentração utilizada no estudo (10%), bem como seus respectivos brancos adicionados do extrato e da fração foram diluídos de forma a obter a concentração capaz de inibir 50% do sistema (IC₅₀). A recuperação do método para cada nível foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\% \text{ IQ Amostra} \times 100}{\% \text{ IQ (Branco+Extrato)}}$$

Onde, IQ = inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase.

3.9.3.2. Análise da recuperação por CLAE

As amostras de pele adicionada de 200, 50 e 20 µg de massa de extrato ou da fração, os respectivos brancos (peles adicionadas de 100 µL dos solventes), e os controles (tubos contendo 100 µL das soluções de 2000, 500 e 200 µg/mL de extrato ou fração de *Inga edulis*) foram extraídas com solvente metanol:água (80:20) de acordo com o procedimento descrito no item 3.9.2. Alíquotas de 4 mL das soluções das amostras, dos brancos e dos controles extraídos foram secos sob ar comprimido. Após a secagem, os resíduos obtidos foram solubilizados em 640, 320 e 285,7 µL de solvente, para ter-se o extrato e a fração nas concentrações finais de 250, 125 e 56 µg/mL. Alíquotas das soluções obtidas foram analisadas por CLAE. As condições cromatográficas utilizadas foram aquelas já descritas no item 3.2. Para determinação da porcentagem de recuperação, as alturas dos picos de vicenina-2 foram medidas e aplicadas na equação da reta da curva de calibração do padrão vicenina-2, para o cálculo da concentração deste flavonóide nas soluções extraídas.

3.9.4. Estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração de *Inga edulis* no método de *tape stripping*

Secções de 1,77 cm² de pele de orelha de porco foram enriquecidas com quantidade conhecida de extrato e fração de *Inga edulis*. Em seguida, a camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo, foi retirada utilizando 15 fitas adesivas tipo “durex”. As fitas foram picotadas, colocadas em um tubo falcon contendo 4 mL de metanol:água (80:20) e submetidas a banho de ultra-som por 30 minutos. Após a sonicação, as amostras foram agitadas em agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 3000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo falcon e sua atividade antioxidante foi analisada pela inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. Fez-se um branco adicionando-se somente metanol:água (80:20) na pele de orelha de porco, procedendo-se o método de *tape stripping* e a extração.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para as amostras foi comparada com a porcentagem de inibição gerada por uma solução de extrato e fração de *Inga edulis* preparados na mesma concentração que a amostra. A recuperação do método foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\% \text{ IQ Amostra} \times 100}{\% \text{ IQ Extrato}}$$

Onde,

IQ Amostra = inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase pela amostra.

IQ Controle = inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/xantina oxidase pelo controle.

3.9.5. Estudo de retenção *in vitro* de compostos do extrato e da fração de *Inga edulis* adicionados às formulações tópicas utilizando pele de orelha de porco

As formulações preparadas foram avaliadas quanto à capacidade de proporcionar a penetração e retenção dos componentes do extrato e da fração com atividade antioxidante e do composto selecionado na pele de orelha de porco.

Os estudos de penetração foram conduzidos utilizando-se células de Franz com compartimento de solução receptora com capacidade para 12 mL e área de difusão de 1,77 cm². O meio receptor consistiu de um tampão fosfato 150 mM (pH 7,2) e mantido a 37°C sob constante agitação de 300 rpm em barra magnética.

A pele de orelha de porco foi colocada na parte superior da célula receptora, com o estrato córneo voltado para o compartimento doador e a derme voltada para o compartimento receptor da célula de difusão (Figura 3). Todo o cuidado foi tomado para se evitar a formação de bolhas de ar entre a pele e a solução receptora. Foi colocada sobre a pele 200 mg de formulação, sendo esta adicionada ou não do extrato ou da fração de *Inga edulis*.

Figura 3: Célula de difusão tipo “Franz”.

Ao final de 12 horas, as peles de orelha de porco foram retiradas e limpas com papel higiênico. A camada mais externa da epiderme, correspondente ao estrato córneo foi retirada pressionando-se uniformemente 15 fitas adesivas tipo “durex” (*tape stripping*). A primeira fita foi descartada e as demais foram colocadas em tubo falcon contendo 4 mL de solvente extrator (metanol:água 80:20) e foram submetidas ao processo de extração conforme já descrito no item 3.9.4. A pele remanescente (epiderme viável + derme) foi submetida ao processo de extração conforme item 3.9.2.

3.9.5.1. Estudo de retenção *in vitro* das formulações tópicas pelo método CLAE

Volume conhecido das amostras de pele foi aliquoteado (3,5 ou 4 mL) e submetido à processo de secagem sob ar comprimido. As amostras foram ressuspensas em 500 µL de solvente extrator (metanol 80%) e filtradas em membranas com poros de 0,45 µm e então analisadas por CLAE utilizando-se o procedimento analítico descrito anteriormente (item 3.2). Foram analisadas as amostras de pele de orelha de porco adicionadas da formulação placebo com o intuito de verificar a interferência de

compostos da pele e da formulação na análise. Em seguida, as amostras adicionadas da formulação incorporada do extrato e da fração de *Inga edulis* foram analisadas e o composto de interesse vicenina -2 foi quantificado empregando a equação da reta obtida utilizando o padrão deste composto.

3.9.5.2. Estudo de retenção *in vitro* das formulações tópicas pelo método de quimioluminescência

Foi avaliado por este método, a pele e a fita que foram extraídas. Para isso, um volume de aproximadamente 200 µL foi retirado do processado da pele e da fita para ser analisado pelo método de quimioluminescência de acordo com o método mencionado anteriormente. As amostras de pele de orelha de porco adicionadas da formulação placebo foram comparadas com as amostras adicionadas da formulação incorporada do extrato e da fração de *Inga edulis*.

3.10. Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada através do programa de estatística GraphPad Prism[®] (versão 5.0). Os resultados foram expressos pela média $\pm$ erro padrão, comparando os diferentes grupos de acordo com o método de análise de variância ANOVA e teste *t student*. Foram consideradas diferenças significantes os valores de $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação do perfil cromatográfico por CLAE

O método CLAE tem sido amplamente utilizado para separar e quantificar compostos, inclusive flavonóides presentes em plantas e alimentos. As colunas utilizadas são na maioria das vezes de fase reversa, os sistemas de eluição são binários, com uma fase aquosa polar acidificada e uma fase orgânica constituída normalmente de metanol ou acetonitrila (MERKEN; BEECHER, 2000).

O extrato de *Inga edulis*, bem como suas frações apresentam em sua composição elevada quantidade de polifenóis, dentre eles destacam-se os flavonóides (SOUZA et al., 2007). Na avaliação dos perfis cromatográficos por CLAE do extrato e da fração foi observada a presença de vários picos cromatográficos, revelando uma ampla diversidade de compostos no extrato e na fração (Figuras 4 e 5). Após inúmeras tentativas para obter uma melhor separação dos compostos presentes na fração e no extrato foi empregado um gradiente de eluição contendo no máximo 28% de solvente orgânico, mostrado na tabela 1. Souza e colaboradores (2007) utilizaram gradiente de eluição até 100% de acetonitrila acidificada com ácido fórmico e os compostos presentes no extrato bruto metanol-água das folhas de *Inga edulis* eluíram até 22% do solvente orgânico.

Figura 4 – Perfil cromatográfico do extrato de *Inga edulis* (250 µg/mL) obtido por CLAE em coluna C18.

Figura 5– Perfil cromatográfico da fração de média polaridade de *Inga edulis* (250µg/mL) obtido por CLAE em coluna C18.

Como é possível observar, os picos A e B foram os picos majoritários detectados nestas condições cromatográficas no extrato e na fração de *Inga edulis*. Alguns compostos fenólicos foram identificados do extrato metanólico das folhas de *Inga edulis* (Figura 6): ácido gálico (1), catequina (2), epicatequina (3), mirecetina3-*O*- α -ramnopiranosídeo (4), quercetina3-*O*- β -glicopiranosídeo (5) e quercetina3-*O*- α -ramnopiranosídeo (6) (Souza et al., 2007). Posteriormente, Dias, Souza e Rogez (2010) identificaram compostos da fração aquosa do extrato das folhas de *Inga edulis* que foram extraídos por uma partição líquido-líquido com hexano (Figura 7): ácido gálico (1); procianidina B1 (2); catequina (3); procianidina B2 (4); epicatequina (5); miricetina 3-*O*- α -ramnopiranosídeo (8); quercetina 3-*O*- α -ramnopiranosídeo (9); miricetina (10) e quercetina (11).

Figura 6. Perfis cromatográficos do extrato metanólico bruto das folhas de *Inga edulis* a 270 e 370 nm (SOUZA, et al., 2007).

Figura 7. Perfis cromatográficos da fração aquosa do extrato das folhas de *Inga edulis* após *clean up* com hexano em 280, 370 e 515 nm (DIAS, SOUZA E ROGEEZ, 2010).

Foram injetados padrões de ácido gálico, catequina, epicatequina, miricetina e quercetina na tentativa de que algum desses padrões eluíssem no mesmo tempo de retenção dos picos mais intensos observados para os perfis cromatográficos do extrato e da fração (figuras 4 e 5). Entretanto, esses padrões eluíram em tempos diferentes. Sendo assim, em parceria com a empresa Lychnoflora, foram identificados alguns compostos presentes na fração de média polaridade de *Inga edulis* (figura 8) com a utilização de UPLC-DAD-MS: epicatequina (1), vicenina-2 (2), miricetina *O*-hexose-desoxihexosídeo (3) e mirecetina *O*-desoxihexosídeo (4) (dados em anexo).

Figura 8. Perfis cromatográficos da fração de *Inga edulis* separada por Cromatografia líquida de ultra eficiência com detector arranjo diodo (UPLC-DAD), nos comprimentos de ondas de 280 nm (A) e 370 nm (B). Identificação dos picos por UPLC-MS: pico 1- epicatequina; 2- vicenina-2; 3- miricetina *O*-hexose-desoxihexosídeo; 4- mirecetina *O*-desoxihexosídeo.

Os picos que mostraram maior intensidade em 280 e 370 nm (2 e 4) foram os referentes aos compostos vicenina-2 e mirecetina *O*-desoxihexosídeo. Entretanto, a metodologia utilizada para eluição destes compostos no UPLC foi muito diferente da utilizada por CLAE e então, para melhor comparação com o cromatograma obtido por CLAE, foi utilizada no LC-DAD-MS a mesma coluna e condições cromatográficas empregadas em CLAE (Figura 9).

Figura 9. Cromatograma da fração de *Inga edulis* por LC-DAD-MS, utilizando a mesma coluna e condição cromatográfica aplicada em CLAE.

Por comparação com o tempo de retenção, é possível sugerir que os picos A e B do cromatograma obtido por eluição por CLAE seja o composto vicenina-2 e mirecetina-O-desoxi-hexosídeo, respectivamente. O composto vicenina-2 é conhecido por sua atividade antioxidante e anti-inflamatória (GOBBO-NETO et al., 2005). Desta forma, o composto vicenina-2 foi utilizado para a avaliação da linearidade do método cromatográfico por CLAE. Sendo assim, foi determinada a equação da reta para este composto tanto na fração como no extrato de *Inga edulis* (Tabela 4). Visando o futuro monitoramento deste pico nos testes de penetração e retenção cutânea, também foi determinada a equação da reta a partir da massa deste composto em soluções de diversas concentrações do padrão de vicenina-2 (Tabela 4).

Tabela 4. Linearidade do método analítico por CLAE determinada para o composto vicenina-2 padrão e presente no extrato e na fração de *Inga edulis*

Amostra	Equação da reta R^2
Vicenina-2	$Y = 34850x + 34,297$ $R^2 = 0,9966$
Extrato	$y = 174,59x - 1,8682$ $R^2 = 0,9995$
Fração	$y = 406,24x - 0,302$ $R^2 = 0,9705$

Utilizando a equação da reta do padrão de vicenina-2, foi possível determinar a quantidade desse composto em diferentes concentrações lineares do extrato e da fração de *Inga edulis*. O extrato apresentou quantidade de 0,5% de vicenina-2 e a fração apresentou 1% deste composto em relação às suas massas totais. Sendo assim, a fração contém o dobro de vicenina-2 em relação ao extrato de *Inga edulis*. Adicionalmente, as porcentagens de áreas obtidas nos cromatogramas do extrato e da fração em diversas concentrações mostraram que o composto vicenina-2 representa 7,5% e 16,4% da área total dos compostos detectáveis pelo método analítico, respectivamente. Estes resultados vão de encontro ao processo de obtenção da fração, em que foi feito um enriquecimento parcial do extrato, conforme item 3.1.2.

4.2. Medida da atividade antioxidante por diferentes métodos

Pesquisas clínicas e estudos epidemiológicos têm estabelecido uma relação inversa entre o consumo de frutos e vegetais e a ocorrência de fenômenos como inflamação, envelhecimento, fotoenvelhecimento, doenças cardiovasculares e câncer. Antioxidantes dietéticos incluindo compostos polifenólicos, vitaminas C e E e carotenoides são considerados nutrientes eficientes na prevenção do estresse oxidativo relacionado a estes fenômenos e doenças (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

A definição de antioxidante biologicamente mais relevante é “substâncias naturais ou sintéticas que possuem capacidade de prevenir ou de atrasar os efeitos

deletérios causados pela ação do oxigênio a compostos, sistemas biológicos ou tecidos.” Os antioxidantes presentes em produtos naturais podem sequestrar espécies reativas de oxigênio ou de nitrogênio, interrompendo as reações em cadeia iniciadas e propagadas por radicais livres ou podem inibir a formação de antioxidantes reativos (prevenção). Antioxidantes frequentemente incluem inibidores das reações radicalares em cadeia, queladores de metais, inibidores de enzimas oxidativas e cofatores de enzimas antioxidantes (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

Assim, é importante avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e de suas frações por diferentes ensaios, a fim de conhecer melhor a capacidade antioxidante dos mesmos (PIETTA, 2000). Segundo Huang e colaboradores (2005) os ensaios de capacidade antioxidante envolvem reações de transferência de átomos de hidrogênio e reações de transferência de elétrons, como ocorre nos ensaios utilizando o radical livre DPPH[•].

4.2.1. Medida da redução do radical DPPH[•]

A solução alcoólica do radical DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) apresenta absorvância máxima no comprimento de onda de 517 nm. Na presença de compostos como os ânions fenóxidos, por exemplo, que são capazes de transferir rapidamente elétrons a este radical, as soluções perdem cor (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

O ensaio de DPPH[•] é uma técnica simples, mas algumas desvantagens limitam a sua aplicação. Além das diferenças de mecanismos das reações de transferência de átomos de hidrogênio que normalmente ocorrem entre antioxidantes e radicais peroxil, o DPPH[•] é um radical de nitrogênio de vida longa, que não tem qualquer semelhança com radicais peroxilas, altamente reativos e instáveis, envolvidos na peroxidação lipídica (HUANG, OU, PRIOR, 2005).

O extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis* apresentaram forte capacidade de reduzir o radical DPPH[•] de forma dose dependente, apresentando IC₅₀ (concentração inibitória 50%) de $5,21 \pm 0,26$ e $4,88 \pm 0,03$ µg/mL respectivamente.

Figura 10. Porcentagem de redução do DPPH[•] em função das concentrações do extrato (A) e da fração de *Inga edulis* (B).

A concentração de compostos antioxidantes necessária para causar diminuição de 50% na concentração inicial de DPPH[•] (IC₅₀) é um parâmetro extensamente utilizado na medida da atividade antioxidante (PAREJO et al., 2000). Quanto menor o IC₅₀ maior o poder antioxidante. Comparando-se os valores de IC₅₀ de ambos, é possível verificar que são valores muito próximos, entretanto, são diferentes estatisticamente (t-student), sendo a fração a que possui a maior capacidade de redução do radical DPPH[•]. Esses dados corroboram com os encontrados na análise cromatográfica e com o processo de enriquecimento utilizado para obtenção da fração de *Inga edulis*.

A quercetina é um flavonóide que se destaca pelo seu alto poder antioxidante, principalmente devido à sua capacidade de eliminar radicais livres como hidroxil, peroxil e ânions superóxido, com a formação de radicais menos reativos; e quelar metais de transição como ferro e cobre, que quando livres aumentam o potencial de formação das EROs pela reação de Fenton (CHOI; CHEE; LEE, 2003). O valor de IC_{50} do extrato e da fração estudada foi cerca de seis vezes maior que o valor de IC_{50} do flavonóide quercetina (0,8 $\mu\text{g/mL}$) (VICENTINI et al., 2007b). Entretanto, a quercetina é uma substância pura utilizada como padrão para esta técnica. Ao comparar os valores IC_{50} obtidos nesse estudo com aqueles de outros extratos, como, o extrato de própolis verde que apresentou valor de IC_{50} de 70 $\mu\text{g/mL}$ (FONSECA, 2007) e o extrato de *Eugenia protenta*, 11,11 $\mu\text{g/mL}$ (FORTE, 2012) fica evidente o alto poder antioxidante do extrato e da fração do Ingá.

Embora o método de DPPH[•] seja amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais, não é o melhor método para a determinação de compostos antioxidantes como já mencionado, pois o DPPH[•] não está presente nos sistemas biológicos e a maioria dos radicais envolvidos na deteriorização oxidativa são EROs (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Já os radicais peroxila e alcoxila, envolvidos na peroxidação lipídica, e o ânion superóxido, radical que tem sua presença exacerbada relacionada a alguns tipos de câncer, são importantes EROs geradas no processo de estresse oxidativo (PIETTA, 2000). Assim, os extratos também foram avaliados quanto à capacidade de inibir a peroxidação lipídica e de sequestrar EROs geradas nos sistemas xantina/XOD/luminol.

4.2.2. Determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD

Fisiologicamente, a principal função da enzima xantina oxidase (XOD) é oxidar a hipoxantina à xantina e a xantina à ácido úrico. Durante a reoxidação da XOD, o oxigênio molecular pode agir como um aceptor de elétrons, produzindo os ânions superóxido. O ânion superóxido apresenta baixa reatividade, entretanto, ele reage facilmente com peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila, bem mais danoso às células do organismo (ROBAK, GRYGLEWSKI, 1988).

A reação xantina/xantina oxidase (XOD) produz o radical superóxido (Figura 11) que por sua vez oxida o luminol. Este tende a voltar ao estado basal emitindo luz, que é detectada pelo equipamento. O sequestro de radicais superóxido no meio reacional leva a diminuição da quimioluminescência (GIROTTI et al., 2000) e, portanto, a quantidade de luz emitida é proporcional à quantidade de ânions superóxido produzida pela enzima xantina oxidase que não foram sequestrados pelos componentes do extrato e da fração. Por outro lado, a inibição da quimioluminescência por compostos naturais também pode ocorrer por inibição da enzima xantina oxidase ou por sequestro dos radicais superóxido formados (PIETTA, 2000).

Figura 11. Representação esquemática da reação xantina/xantina oxidase.

Sendo assim, foi possível avaliar a habilidade do extrato e da fração em sequestrar os radicais superóxidos formados no sistema xantina/luminol/XOD. O extrato e a fração de *Inga edulis* reduziram a emissão da luminescência produzida pela oxidação do luminol pelo radical superóxido gerado no sistema xantina/luminol/XOD de forma dose dependente. Os valores de IC₅₀ foram 0,229± 0,018 e 0,186 ± 0,011 µg/mL para o extrato e para a fração, respectivamente (Figura 12).

Figura 12. Porcentagem de inibição quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luninol/XOD em função das concentrações do extrato (A) e da fração (B).

Fonseca e colaboradores (2010), realizando este mesmo ensaio, encontraram valor de IC_{50} para quercetina de 11,3 $\mu\text{g/mL}$ e 4,4 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de calêndula. FONSECA (2007) estudou a atividade antioxidante do extrato de própolis verde e o valor encontrado foi de 4,1 $\mu\text{g/mL}$. Pela comparação com estes dados, é possível observar o alto potencial antioxidante do extrato e da fração estudados.

4.2.3. Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica

O processo de peroxidação lipídica é iniciada pela reação de um radical livre com ácido graxo insaturado de membranas biológicas e propagada por radicais peroxilas. No sistema biológico a peroxidação lipídica pode ocorrer por duas vias: (1) enzimático envolvendo as ciclooxygenases e lipoxigenases e (2) não enzimático, onde envolve a participação de radicais livres do oxigênio e do nitrogênio, metais de transição e outros radicais. A peroxidação lipídica não enzimática pode ser induzida pelas EROS geradas pela radiação solar na pele e estas oxidam os ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolípidos das membranas celulares, desintegrando-as e permitindo a sua entrada nas estruturas celulares. As lipoxigenases presentes no citossol e na fração microsomal catalisam a inserção do oxigênio nos ácidos graxos insaturados produzindo hidroperóxidos lipídico, propagando desta forma a peroxidação lipídica (LIMA e ABDALLA, 2001).

O ensaio *in vitro* de inibição da peroxidação lipídica envolve uma reação colorimétrica entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o malondialdeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, liberados durante a incubação aeróbia de membranas de homogenatos de tecidos, como é o caso das mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Em um sistema completamente livre de peróxidos lipídicos, a presença de Fe^{+2} inicia a reação de Fenton/Harber Weiss [$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$] gerando o radical hidroxila. Os radicais hidroxila produzidos podem iniciar um processo de peroxidação lipídica removendo átomos de hidrogênio dos fosfolipídeos presentes nas mitocôndrias e formando radicais peroxila e, assim, induzem uma sequência de reações de propagação onde outros radicais, como os hidroperóxidos (ROOH), são formados (RODRIGUES et al., 2002).

Adicionalmente, na preparação do homogenato de fígado de ratos para obtenção da mitocôndria, ocorre a formação de peróxidos lipídicos pela ação de enzimas liberadas na maceração do tecido. Na presença de sais de Fe^{+2} , esses peróxidos são decompostos e originam radicais peroxila e alcóxila ($\text{ROO}^\bullet$ e $\text{RO}^\bullet$), sendo que ambos podem sequestrar átomos de hidrogênio e propagar a peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Portanto, neste experimento, foi necessário avaliar a integridade das membranas mitocondriais através de um controle negativo não adicionado de ferro.

O extrato e a fração testados apresentaram propriedades inibitórias da peroxidação lipídica dose-dependente verificada pela inibição da formação de espécies reativas que reagem com o TBA (Figura 13). Os valores de IC_{50} encontrados para o extrato e a fração de *Inga edulis* foram, respectivamente, 6,76 e 2,54 $\mu\text{g/mL}$. Casagrande (2005) obteve o valor de IC_{50} de 0,34 $\mu\text{g/mL}$ para a quercetina. Os valores encontrados neste estudo foram cerca de 20 e 7 vezes maiores que o da quercetina. É possível observar que a fração apresentou valor de IC_{50} aproximadamente 2,5 vezes menor que o valor de IC_{50} do extrato, o que evidencia a maior facilidade dos componentes da fração em interagir com a membrana plasmática mitocondrial. Isso pode ser explicado pelo fato de que a fração passou por processos de purificação que garantiram seu maior enriquecimento com compostos polifenólicos e assim, não possui ou possui em menor quantidade outros compostos que possam estar agindo competitivamente com substâncias lipofílicas por sítios de ligação da membrana mitocondrial, como pode ter ocorrido com o extrato. Em adição, o menor valor de IC_{50} obtido para a fração vem corroborar, mais uma vez, que o

processo de purificação levou ao aumento das quantidades de compostos antioxidantes presentes na fração de *Inga edulis* em comparação ao extrato.

Figura 13. Porcentagem de Inibição da peroxidação lipídica em função das concentrações do extrato (A) e da fração (B) de *Inga edulis*.

Comparando-se os valores referentes às atividades antioxidante do extrato e da fração pelos diferentes métodos empregados (tabela 5), é possível observar que o método de avaliação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/XOD/luminol foi o que apresentou menor valor de IC₅₀ tanto para o extrato como para fração. Em adição a estes experimentos, o extrato e a fração foram testados quanto a suas capacidades de inibir a enzima xantina oxidase (dados não mostrados), cujos os resultados obtidos evidenciaram que componentes do extrato e da fração inibiram muito discretamente a enzima. Assim, os valores de IC₅₀ obtidos podem ser devido à inibição da enzima xantina oxidase, ao sequestro do radical superóxido formado e a atividade antioxidante dos componentes do extrato e da fração sobre o luminol oxidado. Além disso, a fração mostrou-se capaz de inibir mais eficientemente a peroxidação lipídica do que de reduzir o radical sintético DPPH[•]. De acordo com Huang e colaboradores (2005) muitos antioxidantes que reagem rapidamente com radicais peroxilas podem reagir mais lentamente com o radical sintético DPPH[•]. Já o extrato apresentou esta sequência invertida, sendo mais eficaz em reduzir o radical DPPH[•] do que em inibir a peroxidação lipídica, o que pode ser explicado pela competitividade dos outros compostos presentes no extrato em interagir com a membrana plasmática.

Os resultados demonstram a grande atividade antioxidante do extrato e da fração estudados. Adicionalmente, a alta atividade antioxidante deste extrato foi demonstrada também por Dias, Souza e Rogez (2010) que estudaram o potencial antioxidante de extratos e frações de *Inga edulis* pelos métodos ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) e TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity).

Tabela 5. Comparação entre os valores de IC₅₀ obtidos pelo extrato e pela fração nos diferentes ensaios de determinação da atividade antioxidante.

<i>Inga edulis</i> (µg/mL)	Redução do DPPH [•]	Sistema xantina/luminol /XOD	Inibição da peroxidação lipídica
Extrato	5,210 ± 0,260	0,229 ± 0,018	6,764 ± 0,635
Fração de média polaridade	4,877 ± 0,033	0,186 ± 0,011	2,544 ± 0,391

Os resultados representam a média de 3 determinações ± DP

4.3. Caracterização química do extrato e da fração de média polaridade

4.3.1. Determinação do teor de polifenóis

Os polifenóis constituem uma categoria complexa, com diversos componentes e têm sido alvo de muitas pesquisas devido à sua elevada capacidade de sequestrar radicais livres (SILVA et al., 2007b).

A determinação de polifenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu baseado na redução da mistura dos ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico (reagente de Folin-Ciocalteu) a óxidos de tungstênio e molibdênio em meio alcalino (pH ≥ 10) por compostos fenólicos. Sob pH básico ocorre dissociação do próton fenólico levando a formação do ânion fenolato, que é oxidado pelo reagente de Folin-Ciocalteu, levando a formação de um complexo tungstênio-molibdênio azul (SINGLETON et al., 1999).

O conteúdo de polifenóis totais encontrado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico / g de extrato, em relação ao peso seco (mgEaG/g), como representado na Tabela 6.

O extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis* apresentaram valores próximos de polifenóis totais, sendo a fração a que possui a maior quantidade destes compostos.

Tabela 6. Teor de polifenóis e flavonóides totais encontrado no extrato e na fração.

<i>Inga edulis</i>	Polifenóis totais (mg EaG/g, em relação ao peso seco)	Flavonóides totais (mgEQ/g, em relação ao peso seco)
Extrato	401,2	36,64
Fração	412	46,34

4.3.2. Determinação do teor de flavonóides

Dentre os polifenóis, os flavonóides são o grupo mais estudado (SILVA et al., 2007b). A atividade antioxidante destes compostos desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002).

O método de determinação de flavonóides totais tem como princípio a formação de um complexo estável entre o cloreto de alumínio e o carbono C-4 do grupo ceto e os grupos hidroxila dos carbonos C-3 e C-4 de flavonas e flavonóis. Desta forma, é possível determinar a quantidade de flavonóides, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos (CHANG et al., 2002).

O conteúdo de flavonóides totais encontrados foi expresso em mg de equivalente de quercetina / g de extrato, em relação ao peso seco (mgEq/g), como representado na Tabela 6.

Em concordância com os valores de polifenóis totais encontrados, a fração também possui a maior quantidade de flavonóides totais. Estes dados reafirmam o processo de obtenção da fração estudada, em que foi realizado um enriquecimento dos compostos fenólicos de média polaridade. A diferença dos valores de polifenóis e principalmente de flavonóides totais existente entre o extrato e a fração explica a maior capacidade da fração em sequestrar os ânions superóxidos, reduzir o radical sintético DPPH• e inibir a peroxidação lipídica. De acordo com Pietta (2000), os flavonóides são os principais responsáveis pela redução e sequestro dos radicais livres formados.

4.4. Avaliação da citotoxicidade do extrato e da fração de *Inga edulis*

O parâmetro mais utilizado para avaliar a citotoxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com o auxílio de corantes (ROGERO et al., 2003). A citotoxicidade dos extrato e da fração de *Inga edulis* foi investigada na linhagem de células L929 de fibroblastos de camundongo utilizando o método do vermelho neutro. O ensaio de viabilidade pelo método do vermelho neutro é baseado na capacidade de captura e acúmulo do corante nos lisossomos das células viáveis não injuriadas (BORENFREUND et al., 1988). A escolha deste método foi devido à menor interferência dos extratos na leitura.

O corante vermelho neutro é solúvel em água e passa através da membrana celular concentrando-se nos lisossomos, onde se fixa por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares resultando no decréscimo da captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre as células vivas e danificadas ou mortas, pela medida da intensidade da cor da cultura celular (ROGERO et al., 2003).

Figura 14. Viabilidade de células L929 tratadas com o extrato e a fração de *Inga edulis*. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ DP.

O extrato e a fração mostraram citotoxicidade parecida nas concentrações menores que 80 µg/mL, pois ambos apresentaram 100% de viabilidade celular. Entretanto, na concentração de 156 µg/mL, o extrato reduziu 20% da viabilidade das células L929 enquanto que a fração não inibiu a viabilidade, nas condições empregadas no ensaio (Figura 14). Nas concentrações de 312 e 625 µg/mL, o extrato reduziu 64 e 48% da viabilidade, enquanto que a fração inibiu 17 e 55%, respectivamente.

É possível perceber que o extrato possui maior citotoxicidade que a fração na concentração de 312 µg/mL. Entretanto, nesta concentração a fração também possui uma leve citotoxicidade. Sendo assim, é possível inferir que os compostos comuns ao extrato e à fração apresentaram-se citotóxicos nesta concentração, porém compostos presentes apenas no extrato também mostraram-se capazes de reduzir a viabilidade celular.

4.5.Avaliação da fotoestabilidade

A fotoestabilidade química do extrato e da fração de média polaridade é essencial para a atividade antioxidante, uma vez que a degradação de compostos induzida pela luz pode resultar em uma diminuição da eficiência antioxidante e também em efeito adverso após a administração tópica devido a geração de metabólitos indesejáveis (VICENTINI et al., 2007a). Além disso, de acordo com Kullavanijaya e Lim (2005), os antioxidantes em aplicações tópicas tendem a ser mais instáveis frente à radiação solar. Sendo assim, a investigação da fotoestabilidade do extrato e da fração de média polaridade é essencial para posterior utilização destes como ativos fotoquimiopreventivos.

Com o objetivo de realmente assegurar a fotoestabilidade do extrato por diferentes parâmetros, foram avaliados a atividade antioxidante por diferentes métodos (capacidade de redução do radical DPPH[•] e inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD), o perfil cromatográfico por CLAE e a citotoxicidade.

Foram utilizadas altas doses de radiação UVA e UVB com o intuito de garantir a fotoestabilidade seguramente. Com o objetivo de comparar a dose de radiação utilizada nos estudos com a luz solar, foi realizada a medição da luz do sol no período das 11 horas da manhã até as 13 horas da tarde de dois dias do mês de outubro de 2012 na cidade de Ribeirão Preto, utilizando o mesmo radiômetro utilizado nos estudos. Nestes dias, os termômetros marcaram cerca de 38° C. As medidas para radiação UVA foram 11,20 J/cm² e 3,43 J/ cm² para radiação UVB para 2 horas de exposição. Sendo assim, a radiação UVA (65,48 J/cm²) utilizada para os estudos corresponde a aproximadamente 12 horas de exposição solar e a radiação UVB utilizada (8,95 J/ cm²) corresponde a cerca de 5 horas de exposição solar nas condições referentes ao momento da medição.

4.5.1. Avaliação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante medida pela redução do radical DPPH[•] e pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD não apresentou diferença significativa por *t*-student quando comparados as soluções que foram irradiadas por 4 horas UVA e UVB separadamente e a solução controle não irradiada tanto para o extrato como para fração de média polaridade (Figuras 15 e 16). Também foram realizados os dois testes para a solução de

propilenoglicol 50% irradiada e sem irradiar, que não apresentaram atividade antioxidante.

Figura 15. Medida em porcentagem da redução do radical DPPH• pelo extrato (A) e pela fração de média polaridade (B) irradiados e não irradiados. Os resultados representam a média de seis determinações $\pm$ DP.

Figura 16. Inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD pelo extrato (A) e pela fração de média polaridade (B) irradiados e não irradiados. Os resultados representam a média de seis determinações $\pm$ DP.

Em adição, as soluções irradiadas e não irradiadas do extrato e da fração foram analisadas qualitativamente por CLAE (dados não mostrados). Os perfis cromatográficos mostraram que tanto no extrato como na fração expostos à radiação UVA e UVB separadamente por 4 horas não houve aparecimento de novos picos, sugerindo que não ocorreu degradação das substâncias presentes em novas substâncias. Os resultados encontrados por esta técnica reforçam a fotoestabilidade do extrato e da fração em solução de propilenoglicol 50% sob a dose de radiação utilizada no estudo.

4.5.2 Avaliação da citotoxicidade

A seleção de um extrato com alta atividade antioxidante tem como objetivo a sua incorporação em formulações tópicas visando a utilização destas na prevenção dos efeitos prejudiciais da radiação solar sobre a pele por meio da produção de EROs. A exposição dos extratos vegetais à radiação ultravioleta pode proporcionar a degradação de seus componentes, produzindo subprodutos potencialmente citotóxicos. Assim, os extratos foram expostos à radiação UVA e UVB e, em seguida, foram avaliados quanto a sua citotoxicidade.

Os resultados sugerem que a citotoxicidade do extrato e da fração de *Inga edulis* não sofreu alterações decorrentes da sua exposição às radiações UVA e UVB (Figura 17), indicando que se a radiação conduziu a degradação de componentes do extrato e da fração, os produtos de degradação não foram citotóxicos. Este dado ressalta a fotoestabilidade do extrato e da fração estudados e ainda, reforça a possibilidade de utilização destes como agentes fotoquimioprotetores, uma vez que os dados mostraram que em doses exacerbadas de radiação UVA e UVB não ocorreu aumento da citotoxicidade e tão pouco a diminuição da capacidade antioxidante de ambos.

Figura 17. Viabilidade de células L929 tratadas com o extrato (A e B) e a fração (C e D) não irradiados e irradiados com radiações UVA e UVB. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

Dessa forma, tanto o extrato como a fração mostraram-se promissores para uso tópico como agentes fotoquimioprotetores e foram então, incorporados em formulações tópicas.

4.6. Desenvolvimento de formulações tópicas

Foram desenvolvidas diversas formulações a fim de selecionar aquelas que foram estáveis frente ao teste de centrifugação após 24 horas utilizado para triagem.

As formulações descritas na tabela 3 (materiais e métodos) apresentaram separação de fases no teste de centrifugação 24 horas após a adição do extrato e da fração de *Inga edulis* e foram então descartadas do estudo. Estas formulações têm em comum o fato de serem do tipo creme com ausência de doadores de viscosidade como o Aristoflex AVC®.

As formulações escolhidas para o estudo de estabilidade preliminar (12 dias) foram as formulações gel-creme a base de Hostacerin SAF® placebo (P01), adicionada do extrato (F1E) e adicionada da fração (F1F), gel a base de Aristoflex AVC® placebo (P02), adicionada do extrato (F2E) e adicionada da fração (F2F) e gel creme a base de Lanette N® e Aristoflex AVC® placebo (P03), adicionada do extrato (F3E) e adicionada

da fração (F3F). Estas formulações não apresentaram separação de fases no teste de centrifugação após 24 horas e suas composições foram apresentadas na tabela 2.

As formulações desenvolvidas apresentaram conteúdo graxo distintos, em virtude dos componentes e da concentração destes utilizados. A formulação gel-creme (Hostacerin SAF[®]) é formulada a partir de um blend de doador de viscosidade (Aristoflex AVC[®]), emolientes tais como óleo mineral e palmitato de isopropila e emulsionantes como Emulsogen[®] SRO, de origem vegetal baseado em óleo de canola e Hostaphat KL[®] 340D. Este último, composto por triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, caracteriza-se por efeito emoliente e emulgador universal. Por ser um éster fosfórico, tem grande afinidade com os fosfolipídeos da pele e dessa forma, também contribui para a hidratação cutânea (PHARMASPECIAL, 2012). Esta formulação permitiu preparação a frio e por esta razão os ativos (fração e extrato) foram incorporados na fase aquosa, o que proporcionou segurança na homogeneidade de conteúdo dos compostos adicionados.

A formulação gel creme, composta por Lanette N[®], uma dispersão coloidal composta por 90 partes de álcool graxo e 10 partes de tensoativo, teve como doador de viscosidade o Co-Polímero do Ácido Sulfônico Acriloildimetiltaurato e Vinilpirrolidona Neutralizado, conhecido comercialmente como Aristoflex AVC[®], possuindo caráter aniônico. Este polímero foi utilizado como doador de viscosidade na fase aquosa com o intuito de aumentar a estabilidade da formulação, uma vez que formulações contendo apenas a cera auto emulsionante Lanette N[®] foram testadas em diversas concentrações e todas apresentaram separação de fases no teste de centrifugação de 24 horas após a adição do extrato e da fração. A fase oleosa desta formulação, além do Lanette N[®], foi composta por óleo de macadâmia e triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico. O óleo de macadâmia consiste de triglicerídios vegetais extraídos das nozes de macadâmia e atua como emoliente. É fonte natural de ácido palmitoleico (Acido 9-hexadecenoico), um ácido graxo insaturado e também é composto pelo ácido oleico. O ácido oleico interage e modifica os domínios lipídicos do estrato córneo, como esperado para uma cadeia longa de ácido graxo com configuração *cis* e pode auxiliar na penetração tanto de substâncias de caráter lipofílico como de caráter hidrofílico. Ácidos graxos insaturados com configuração *cis* tem maior capacidade de desestruturar a camada lipídica intercelular do que aqueles de configuração *trans* (WILLIAMS, BARRY, 2004). Os triglicérides do ácido cáprico e caprílico são triglicérides de cadeia média constituídos

principalmente por ésteres de ácidos caprílicos (C8) e cápricos (C10) derivados do óleo de coco e também atuam como emoliente.

Já a formulação gel, composta basicamente pelo polímero Aristoflex AVC[®], não apresenta a presença de substâncias graxas em sua composição e é um gel cristalino com características de excelente consistência e toque agradável.

As três formulações desenvolvidas tiveram a mesma concentração (5%) de propilenoglicol, utilizado para solubilizar a fração e o extrato. Utilizado também como promotor da penetração cutânea, o propilenoglicol tem sua ação promotora relacionada com a sua capacidade de solvatação da alfa queratina presente no estrato córneo; sua tendência em competir ou ocupar locais na proteína onde existem pontes de hidrogênio, o que pode resultar em redução da afinidade ou ligação do difusante com o tecido, assim, favorecendo a penetração e sua ação sinérgica com demais compostos químicos que possuem propriedades promotoras, como, por exemplo o ácido oleico presente nas formulações a base de Lanette N[®] (F3E e F3F) (BARRY, 1991; WALKER e SMITH, 1996; LARRUCEA et al., 2001; WILLIAMS e BARRY, 2004).

Embora o Hostacerin SAF[®] seja composto por material graxo de concentração desconhecida, uma vez que é um *blend* comercial, sua composição contém componentes fundamentais para preparação de emulsões com baixo conteúdo graxo (PHARMASPECIAL, 2012). A formulação F1 é composta por 6% deste *blend*, enquanto que a formulação F3 é composta por 3% de triglicérides do ácido cáprico e caprílico, 2% de óleo de macadâmia e 10% de cera auto emulsionante aniônica Lanette N[®]. Sendo assim, podemos concluir que a formulação F3 é a que contém maior concentração de substâncias graxas, seguida pela formulação F1 e por último a formulação F2 (gel). Desta forma, foram desenvolvidas três formulações com conteúdos graxos distintos, conforme almejado.

4.6.1. Avaliação da atividade antioxidante das formulações

A interferência dos constituintes da formulação na atividade antioxidante do extrato e da fração de média polaridade foram avaliados pela medida da redução do radical DPPH[•] e pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD. As porcentagens de inibição conseguidas pelo extrato e pela fração veiculados e não veiculados foram comparadas. Foram utilizadas quantidades equivalentes de extrato e fração presente nas formulações e também foram realizados testes para as formulações placebos.

A comparação mostrou que não houve diferença significativa (*t student*) para as atividades antioxidantes entre o extrato e a fração veiculados ou não pelos dois métodos aplicados (Figura 18).

Figura 18 – Medida em porcentagem da redução do radical DPPH• (A) e da inibição da quimioluminescência gerada no sistema xantina/luminol/XOD (B) pelo extrato e fração não veiculados e adicionados às formulações. Os resultados representam a média de três determinações.

Os resultados sugerem que os componentes das formulações não interferem na atividade antioxidante tanto do extrato como da fração. E ainda, as formulações placebo não demonstraram atividade antioxidante, como esperado. Além disso, estes dados

demonstram que o extrato e a fração foram veiculados de forma homogênea nas três formulações desenvolvidas.

Marquele e colaboradores (2005) também não encontraram diferença na atividade antioxidante avaliada pelo método de quimioluminescência, em formulações contendo extrato de própolis marrom, também rico em polifenóis, e o extrato não veiculado.

4.6.2. Estudo de estabilidade preliminar das formulações desenvolvidas

Segundo o guia de estabilidade de produtos cosméticos, publicado pela ANVISA em 2004, o produto cosmético deve manter-se íntegro durante todo o teste, mantendo seu aspecto inicial em todas as condições, exceto em temperaturas elevadas, freezer ou ciclos, em que pequenas alterações são aceitáveis.

4.6.2.1. Características organolépticas

As formulações submetidas ao teste não apresentaram variações quanto aos aspectos organolépticos avaliados (aspecto, cor e odor), exceto a formulação F2E (gel), que apresentou leve intensificação da turvação nos últimos dias do ensaio. É importante ressaltar que desde o tempo zero esta formulação já apresentou turvação, o que ressalta a presença de compostos apolares do extrato, uma vez que a mesma formulação gel adicionada da fração na mesma concentração apresentou aspecto límpido. A intensificação da turvação pode ser atribuída à concentração do extrato na formulação devido à perda de água ocorrida durante os ciclos.

4.6.2.2. Determinação do valor de pH

As formulações apresentaram, mesmo após o teste de estabilidade, valores de pH entre 5,0 e 6,0 (tabela 7). De acordo com Isaac e colaboradores (2008), valores de pH mantidos entre 5,5 e 6,5 são compatíveis com o pH cutâneo e devem ser usados como critério de estabilidade. De acordo com Leonardi e colaboradores (2002) a pele apresenta pH levemente ácido, variando de 4,6 a 5,8. Sendo assim, as formulações desenvolvidas apresentam valores de pH compatíveis com a pele.

Tabela 7. Medida do pH das formulações antes e depois do teste de estabilidade

Formulação	Valor de pH inicial (tempo 0)	Valor de pH final (tempo 12)
F1E	5.827 ± 0.015	5.807 ± 0.012
F2E	5.267 ± 0.033	5.207 ± 0.009
F3E	5.920 ± 0.030	5.205 ± 0.005
F1F	5.647 ± 0.009	5.973 ± 0.015
F2F	5.013 ± 0.009	4.960 ± 0.006
F3F	5.730 ± 0.020	5.350 ± 0.090

Os resultados representam a média de três determinações ± DP

As formulações que apresentaram maior diferença no valor de pH quando comparadas antes (tempo 0) e depois do teste de estabilidade (tempo 12) foram as formulações F3E (Lanette N[®]) adicionada do extrato, a formulação F3F(Lanette N[®]) e F1F (Hostacerin SAF[®]) adicionada da fração, que variaram 12,1; 6,6 e 5,8% respectivamente. Entretanto, como é possível observar, apenas a formulação F3E apresentou valor de pH maior que 10% e os valores de pH mantiveram-se entre 4,96 e 5,97, compatíveis com o pH cutâneo. Valores baixos de pH podem estar relacionados ao aparecimento de irritação dérmica cumulativa, e ser devido a degradação de qualquer componente do fitocosmético (LEONARDI, GASPAR e MAIA CAMPOS, 2002; ISAAC et al., 2008).

As formulações foram comparadas também em relação à adição do extrato e fração com as respectivas formulações placebos no tempo zero. Os resultados mostraram que a adição tanto do extrato como da fração não alteraram significativamente (*t* student) o pH das formulações, exceto para a F1F e F3F, que apresentaram valores de pH 6,1% maior e 5,4% menor em relação ao placebo.

As formulações placebos quando submetidas aos ciclos também não apresentaram alteração significativa do valor de pH (*t* student), sendo assim, a variação apresentada deve-se ao extrato e a fração que foram adicionados.

4.6.2.3. Teste de centrifugação

A centrifugação promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (BRASIL, 2008). A centrifugação foi realizada 24 horas após a manipulação, uma vez que de acordo com a ANVISA a ocorrência de instabilidade neste teste indica a necessidade de reformulação. Além disso, as amostras foram

centrifugadas em todos os dias do estudo de estabilidade preliminar e não foi observada instabilidade neste período para as formulações estudadas, exceto a formulação F3E (Lanette N[®]) adicionada do extrato, que apresentou leve separação de fases no 10º dia do estudo.

4.6.2.4. Perda de água

Em relação à perda de água, foi possível observar que a maior porcentagem de perda em todas as formulações ocorreu durante o período em que a formulação ficou a $4 \pm 2^\circ\text{C}$. A pequena perda de água no ciclo a $40 \pm 2^\circ\text{C}$ provavelmente ocorreu devido ao controle de umidade relativa (UR) a qual foi mantida a 75%. A porcentagem total de perda de água foi maior para as formulações do tipo gel, seguida pelas formulações a base de Hostacerin SAF[®] e por último as formulações a base de Lanette N[®] (figura 19).

Figura 19. Porcentagem de perda de água das formulações após estabilidade preliminar.

A perda de água foi maior para as formulações do tipo gel (F2) pela ausência de material graxo e menor para as formulações gel creme a base de Lanette N[®] (F3) pela maior porcentagem da fase oleosa e a presença dos emolientes óleo de macadâmia e triglicérides dos ácidos cáprico e caprílico. Sendo assim, a perda de água foi inversamente proporcional à quantidade de material graxo presente nas formulações estudadas.

4.6.2.5. Estudo do comportamento reológico das formulações

A reologia representa o estudo das propriedades de escoamento e deformação da matéria sob a ação de forças, com o objetivo de descrever essas relações, através das leis constitutivas ou do comportamento de fluxo. A determinação do comportamento reológico de formulações auxilia na avaliação da natureza físico química do veículo, de tal forma que torna possível detectar sinais de instabilidade física, possibilitando o controle de qualidade dos constituintes das formulações teste e dos produtos finais (ISAAC et al., 2008).

Formulações estáveis não devem apresentar alterações em seu reograma sob condições semelhantes de temperatura e tensão de cisalhamento. Os principais sinais de instabilidade aparecem na forma de cristas e inflexões, valores mais baixos de tensão de cisalhamento máxima e alteração na área de histeresse (MARTIN, BUSTAMANTE e CHUN, 1993). Estas mudanças ocorrem como um processo de desestabilização e refletem a destruição da resistência da malha ao cisalhamento e formação de uma malha menos resistente. O comportamento do reograma é consistente com as mudanças físicas na formulação (PENA, LEE, STEARNS, 1993).

As formulações foram analisadas quanto ao comportamento reológico, viscosidade, índice de fluxo e tixotropia 24 horas após o preparo e após serem submetidas a ciclos por 12 dias.

Todas as formulações analisadas apresentaram comportamento reológico não newtoniano do tipo pseudoplástico, ou seja, o material começou a fluir na origem, assim que uma tensão de cisalhamento foi aplicada, com índice de fluxo menor que 1. Para formulações cosméticas o fluxo pseudoplástico é o mais comum (LEONARDI, 2008). Esses materiais têm sua viscosidade aparente diminuída gradualmente, à medida que aumenta a tensão de cisalhamento e, portanto sua viscosidade não pode ser expressa por um único valor (SCHOTT, 1995). De acordo com Aulton (2005) a representação mais satisfatória é feita por meio de toda a curva de fluxo. Os reogramas abaixo (Figura 20) mostram a comparação entre as formulações recém preparadas e as que foram submetidas aos ciclos.

Figura 20. Reogramas obtidos para as formulações recém preparadas (o) e submetidas aos ciclos (●), adicionadas ou não do extrato e da fração de média polaridade. Os dados representam a média de três determinações.

Através das comparações (t student), foi possível observar que em relação às formulações recém preparadas, todas as que passaram pelos ciclos não apresentaram diferença estatística significativa, o que demonstra a estabilidade física das formulações após o teste de estabilidade preliminar aplicado.

A viscosidade aparente pode ser obtida pela tangente em cada ponto da curva, obtida a partir de valores crescentes da tensão de cisalhamento (LEONARDI, MAIA CAMPOS, 2001). Viscosidade é uma expressão de resistência do fluido ao fluxo: quanto maior a viscosidade, maior a resistência (ALMEIDA, BAHIA, 2003; CORRÊA et al., 2005). Segundo Wilkinson e colaboradores (1990) a viscosidade é um parâmetro importante porque seu valor pode ser alterado em função da presença ou não de diferentes materiais, portanto pode ser considerado como um dos parâmetros de referência para avaliar a estabilidade de sistemas semi-sólidos. A medida da viscosidade aparente das formulações no tempo zero foi estatisticamente diferente para todas as formulações após submetidas aos ciclos. Entretanto, como é possível observar (Figura 21) a diferença entre elas foi muito pequena, exceto para a formulação F3E. A alteração nesta formulação pode ser explicada por ter sofrido uma grande desestruturação, uma vez que ocorreu a separação de fases na centrifugação a partir do 10º dia do ciclo. O pequeno aumento do valor de viscosidade aparente nas demais formulações pode ser atribuído à porcentagem de perda de água.

Figura 21. Viscosidade aparente das formulações no tempo zero e após os 12 ciclos. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ DP.

Todas as formulações analisadas apresentaram tixotropia. O valor de tixotropia representa a área formada entre a curva ascendente obtida pelo aumento gradativo da tensão de cisalhamento e pela curva descendente obtida pela diminuição gradativa da tensão de cisalhamento (VALENTA; SCHULTZ, 2004). O produto tixotrópico tende a ter maior vida de prateleira, pois durante o armazenamento, este apresenta viscosidade constante, o que dificulta a separação dos constituintes da formulação (MARTIN, 1993). Além dessa vantagem, formulações tópicas com caráter tixotrópico são bastante almejadas, pois elas se deformam durante a aplicação, tornando-se mais fluídas e facilitando o espalhamento e recuperam a viscosidade inicial no momento que se encerra a aplicação, o que evita que o produto escorra. Entretanto, é interessante a obtenção de um valor de tixotropia não muito elevado para que o produto não escorra sobre a pele após aplicação e também de um valor não muito baixo, pois isso pode acarretar em baixa espalhabilidade do produto não permitindo uma distribuição uniforme sobre a pele (GASPAR, MAIA CAMPOS, 2003).

Foram comparados os valores de tixotropia das formulações recém preparadas com as que foram submetidas aos ciclos. Nesta comparação os valores de tixotropia das formulações placebo não apresentaram diferença significativa. A figura 22 mostra a comparação dos valores de tixotropia das formulações adicionadas de extrato e fração.

Figura 22. Valores de tixotropia das formulações recém preparadas e depois de submeter aos ciclos. Os resultados representam a média de 3 determinações $\pm$ DP.

As formulações F2E e F2F, ambas do tipo gel, submetidas aos ciclos de 12 dias apresentaram um aumento significativo (t student) do valor de tixotropia em relação às respectivas formulações recém preparadas, o que demonstra um sinal de instabilidade física destas formulações. A formulação gel proposta possui baixa tixotropia no tempo zero, pois a força de ligação entre as gotículas da fase dispersa resiste à ação imposta pelo cisalhamento e assim não ocorre uma desorganização estrutural interna do sistema (COLO et al., 2004). O aumento do valor de tixotropia após o estudo de estabilidade preliminar mostra que ocorreu uma desorganização estrutural interna deste sistema provavelmente ocasionada pela temperatura dos ciclos a que as formulações foram submetidas. As demais formulações não apresentaram diferença estatística entre elas.

4.6.2.6. Estabilidade da atividade antioxidante das formulações

Após a possível interferência dos constituintes das formulações na determinação da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD e medida da redução do radical DPPH $\bullet$ já ter sido avaliada, verificou-se a estabilidade da atividade antioxidante das formulações após o teste de estabilidade preliminar pelos dois métodos citados.

A medida da redução do radical DPPH $\bullet$ mostrou-se inalterada após os 12 ciclos aos quais as formulações foram submetidas (Figura 23). Adotou-se como grupo controle as formulações manipuladas no mesmo dia que as submetidas ao teste e que não passaram pelo teste de estabilidade preliminar. Quanto à atividade antioxidante

determinada pelo sistema xantina/luminol/XOD, as formulações F1E, F1F (Hostacerin SAF[®] adicionada do extrato e da fração, respectivamente) e F2E (formulação gel adicionada do extrato) apresentaram redução significativa desta atividade por *t*-student. Entretanto, a reação gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD é uma reação complexa, onde ocorre reação enzimática e geração de luminosidade. Comparando-se a variação entre os valores encontrados para a inibição da atividade antioxidante destas formulações recém preparadas com as que foram submetidas aos ciclos, esta variação foi menor que 10% para as três formulações. Os valores de IC₅₀ para a fração e extrato de *Inga edulis* determinados em dias diferentes apresentou coeficiente de variação de 10%. Frente a isso, uma vez que os valores de inibição da quimioluminescência das formulações recém preparadas e após os ciclos foram determinados em dias diferentes, podemos inferir que esta diminuição da inibição pode ser atribuída à variação do método.

Figura 23. Atividade doadora de $H^\bullet$ ao radical $DPPH^\bullet$ (A) e atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/XOD (B) das formulações submetidas ao teste de estabilidade e controles. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

Casagrande e colaboradores (2007) estudaram a estabilidade da atividade antioxidante de formulações tópicas contendo quercetina e relataram que a temperatura e período de estocagem influenciam na estabilidade de formulações contendo este flavonóide. Foi observado que cremes e géis creme não iônicos, contendo este flavonóide, perderam atividade funcional, após 6 meses quando estocados a 4°C e a 45°C .

Como foi possível observar, neste trabalho foram desenvolvidas formulações adicionadas de diferentes concentrações de material graxo, sendo duas formulações gel creme e uma formulação do tipo gel, às quais foram adicionados o extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis*. Após a realização do teste de estabilidade preliminar, observou-se que algumas formulações sofreram alterações físicas como perda de água,

alterações de pH, aumento dos valores de viscosidade aparente e tixotropia. Entretanto estas alterações podem ser consideradas pequenas frente às condições extremas a que estas formulações foram submetidas e de acordo com a ANVISA (2004) pequenas alterações nestes testes são aceitáveis. Entretanto, a separação de fases como ocorreu na formulação F3E (Lanette N[®] adicionada do extrato) é um sinal grave de instabilidade, indicando a necessidade de reformulação. Do ponto de vista da estabilidade funcional pelo método de DPPH[•] e de quimioluminescência foi possível inferir que os ciclos não alteraram a capacidade antioxidante das formulações adicionadas de extrato e fração.

Sendo assim, das formulações estudadas, a formulação F3E foi reprovada no teste de estabilidade acelerada realizado. Uma vez que um dos objetivos do trabalho foi estudar o extrato e a fração adicionados ao mesmo tipo de formulação para avaliar a interferência da diferente composição de ambos, a formulação F3 adicionada tanto do extrato como da fração foi então excluída dos estudos de penetração e retenção cutânea *in vitro*.

4.7. Estudo de retenção *in vitro* dos ativos do extrato e da fração de *Inga edulis* em pele de orelha de porco.

Estudos de penetração e retenção cutânea *in vitro* são considerados valiosos para avaliar o comportamento de substâncias ativas veiculadas em formulações tópicas, bem como uma importante ferramenta para comparar formulações. Além disso, modelos *in vitro* são preferíveis para este tipo de estudo em razão da proibição do uso de animais para estudos com formulações cosméticas. Neste contexto, a célula de difusão de FRANZ tem sido muito utilizada. Essa metodologia apresenta como vantagem o fato de ser simples e facilmente controlada em condições experimentais (LEONARDI, 2008).

Para realização dos experimentos de penetração cutânea, faz-se necessário o uso de membranas adequadas. O melhor deles é sem dúvida a pele humana, porém, a dificuldade de obtenção restringe o seu uso. Dentre os modelos animais, a preferência pela pele de orelha de porco deve-se à facilidade de obtenção e à similaridade com a pele humana quanto às propriedades histológicas: densidade de folículos pilosos, espessura do estrato córneo e propriedades bioquímicas (BRONAUGH; COLLIER, 1993; MOSER et al., 2001; ZATZ, 1993). Assim, sua utilização em estudos de permeação tem apresentado resultados comparáveis ao tecido humano, enquanto peles

de camundongos, ratos e cobaias apresentam maior taxa de permeação (MOSER et al., 2001).

Os estudos de penetração e retenção foram avaliados pelas técnicas de quimioluminescência e CLAE. A determinação da inibição da quimioluminescência é importante, pois permite avaliar funcionalmente as substâncias que ficaram retidas na pele e não apenas pelas substâncias detectáveis pela metodologia de CLAE empregada.

4.7.1. Escolha do solvente extrator

O solvente utilizado para a extração é muito importante e deve ser cuidadosamente escolhido, objetivando a retirada dos compostos do extrato e da fração de *Inga edulis* adicionados na pele, sem que se extraiam os componentes da pele que possuem atividade antioxidante, a fim de que a pele não interfira no método escolhido.

4.7.1.1. Análise por Quimioluminescência

A escolha do solvente extrator foi realizada adicionando-se uma concentração conhecida de fração de *Inga edulis* à pele de porco sem estrato córneo. Para isso, foi feita uma solução da fração de concentração 2 mg/mL em metanol:água (80:20) e foi adicionado 100 µL desta solução na pele. Para o branco apenas metanol:água (80:20) foi adicionado à pele de orelha de porco.

O processo de extração, tanto para pele adicionada da fração como a aquela adicionada somente do solvente (branco) foi realizado conforme já descrito no item 3.9.2., utilizando os seguintes solventes para extração: metanol:água nas proporções 20:80, 50:50, 80:20 e metanol. Como controle, soluções da fração diluídas na mesma concentração final das amostras foram preparadas (soluções da fração sem pele). As soluções de brancos obtidas após a extração da pele, sem adição da fração, em diferentes solventes foram adicionadas, posteriormente, da fração na mesma concentração final das amostras (branco com fração) ou não (branco só pele). Posteriormente, determinou-se a atividade antioxidante das amostras, dos brancos (só pele), dos brancos adicionados da fração e da fração diluída (controle) pela determinação da inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para as amostras foi confrontada com a porcentagem de inibição gerada pelo branco (só pele) e com a porcentagem de inibição gerada pelo branco adicionado da fração de *Inga edulis* (Figura 24).

Figura 24. Atividade antioxidante determinada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase na escolha do solvente extrator para a recuperação do método de penetração/retenção cutânea. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

Ao analisar os resultados obtidos, observou-se que utilizando a proporção metanol:água (20:80) como solvente extrator (grupo 1 da figura), extraiu-se grande quantidade de componentes da fração da pele, verificado pela alta porcentagem de inibição apresentada para a amostra. Porém os componentes da pele que apresentam atividade antioxidante também foram bastante extraídos, já que a porcentagem de inibição obtida para o branco (pele) foi alta. O branco+extrato (pele+fração) apresentou porcentagem de inibição ligeiramente maior que o branco (pele) e o controle (fração), o que mostra que os valores de inibição se sobrepõe de modo não somatório. Esses resultados sugerem que os componentes inerentes da pele com atividade antioxidante podem estar sendo extraídos também, e esses compostos interferem na quantificação dos componentes antioxidantes da fração. Portanto, esta proporção mostrou-se inadequada para a utilização como solvente extrator.

Já utilizando o metanol para a extração (grupo 2 da figura), foi possível extrair uma baixa quantidade de compostos da fração com atividade antioxidante da fração na pele, como pôde ser verificado pela baixa porcentagem de inibição para a amostra. Os componentes da pele que possuem atividade antioxidante não foram extraídos, uma vez que o branco (pele) apresentou porcentagem de inibição negativa. O branco+extrato (pele+extrato) apresentou praticamente a mesma porcentagem de inibição que a fração na mesma concentração (controle), o que mostra a não interferência do branco nesse resultado. Sendo assim, foi possível verificar que o metanol não deve ser o solvente de escolha, pois extraiu muito pouco os componentes antioxidantes da fração da pele.

Os resultados obtidos para o solvente metanol:água (50:50) (grupo 3 da figura) foram muito parecidos com os obtidos para o solvente metanol:água (20:80), provavelmente devido a alta porcentagem da fração aquosa da mistura, que foi capaz de extrair também os antioxidantes da pele.

Analizando-se os resultados obtidos com o solvente extrator metanol:água (80:20) (grupo 4 da figura), foi possível observar que esse foi capaz de extrair os componentes da fração que possuem atividade antioxidante e extrair baixa quantidade de compostos antioxidantes inerentes da pele. O branco+fração (pele+fração) apresentou porcentagem de inibição semelhante à amostra e próxima à do controle (fração), indicando que não houve ou houve pouca interferência da pele.

Os dados obtidos nesse estudo sugerem que a água como líquido extrator pôde extrair componentes do sistema antioxidante endógeno como o GSH e a vitamina C. Marquele e colaboradores (2007), também utilizaram o método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase para a avaliação da penetração e retenção em células de Franz, porém não tiveram problemas de interferência da pele ao realizar a extração dos componentes antioxidantes do extrato com metanol. Esses autores empregaram como líquido extrator o metanol, pois os componentes antioxidantes da própolis foram solúveis nesse solvente e os antioxidantes endógenos da pele não.

Portanto, para se conseguir uma adequada extração da fração de *Inga edulis* da pele, sem que haja grande interferência dos componentes dessa na medida da atividade antioxidante pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase, o solvente metanol:água (80:20) foi escolhido como o solvente extrator mais adequado.

4.7.1.2. Análise por CLAE

Ao analisar as amostras oriundas da extração com os diversos solventes extratores utilizados foi possível verificar que o composto melhor extraído foi o composto A, identificado como vicenina-2 pela empresa Lychnoflora. O composto majoritário Miricerina *O*-desoxihexosídeo não foi bem extraído pelos solventes testados. Frente a isso, foi padronizado avaliar a recuperação pela avaliação apenas do pico referente ao composto vicenina-2.

Foram analisados as amostras, seus respectivos brancos e a fração de *Inga edulis* na mesma concentração final que as amostras (controle). O branco (pele) não apresentou compostos no mesmo tempo de retenção do composto analisado.

O solvente metanol:água (80:20) também foi o mais adequado para extração do composto de interesse, com 80% de recuperação (tabela 8), sendo portanto, o solvente de escolha.

Tabela 8. Valores de recuperação para os diferentes solventes analisados.

Solvente Extrator	Altura Controle	Altura Amostras	% de Recuperação
Metanol:água (20:80)	2370	1581 ± 334.0	66,7
Metanol:água (50:50)	2464	1926 ± 184.5	78,2
Metanol:água (80:20)	2438	1950 ± 142.5	80
Metanol	3019	1125 ± 118.0	37,3

4.7.2. Estudo de recuperação do método de retenção cutânea

A recuperação é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada ao material teste, que é extraída e passível de ser quantificada. Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o

composto de interesse, isto pode ser feito adicionando a substância em pelo menos três diferentes concentrações (RIBANI et al., 2004).

Como descrito por Röpke e colaboradores (2002), para realizar a recuperação em um estudo de penetração/retenção cutânea, a pele deve ser enriquecida com concentrações conhecidas do composto a ser analisado e sofrer processo de extração.

Após escolhido o solvente extrator adequado, foi realizada a recuperação com três diferentes concentrações da fração e do extrato de *Inga edulis* (10, 2,5 e 1% do total de extrato e fração presente em 200 mg de formulação). As amostras geradas por este processo foram analisadas pela porcentagem de inibição da quimioluminescência e também por CLAE.

4.7.2.1. Análise da recuperação por quimioluminescência

Como foi possível verificar nos estudos realizados para a escolha do solvente extrator, a porcentagem de inibição da quimioluminescência do branco (fração + pele) não foi exatamente a soma da porcentagem de inibição obtida para fração mais a obtida para a pele. Desta forma, a porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para cada nível de concentração do extrato e da fração foi comparada à porcentagem de inibição gerada pelo branco adicionado de extrato ou da fração de *Inga edulis* nas concentrações anteriormente citadas. Além disso, as peles adicionadas da maior concentração utilizada no estudo (200 µg/mL) do extrato e da fração, bem como seus respectivos brancos foram diluídos de modo a ter-se o extrato e a fração nas concentrações que proporcionam 50% de inibição da quimioluminescência, como determinado no ensaio de atividade antioxidante, item 3.4.2. Os resultados encontram-se nas tabelas 9 e 10.

Tabela 9. Recuperação dos componentes antioxidantes da fração de *Inga edulis* no método de penetração/retenção cutânea

Extrato adicionado na pele (µg)	Concentração meio reacional (µg/mL)	Inibição da Quimioluminescência (%)		Recuperação (%)
		Amostras	Branco+Extrato	
200	0,18	43.32 ± 1.492	52.71 ± 1.811	82,19
50	0,15	46.76 ± 4.489	51.93 ± 4.589	90,04
20	0,06	41.94 ± 0.2650	50.49 ± 0.8700	83,07

Os resultados de inibição da quimioluminescência representam a média de três determinações ± DP

Tabela 10. Recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de *Inga edulis* no método de penetração/retenção cutânea

Extrato adicionado na pele (µg)	Concentração meio reacional (µg/mL)	Inibição da Quimioluminescência (%)		Recuperação (%)
		Amostras	Branco+Extrato	
200	0,18	44.41 ± 1.472	53.57 ± 0.564	82,90
50	0,15	49.77 ± 4.215	56.59 ± 1.265	87,95
20	0,06	48.79 ± 8.785	50.43 ± 4.975	96,75

Os resultados de inibição da quimioluminescência representam a média de três determinações ± DP.

De acordo com Bronaugh e colaboradores (1999) a recuperação normalmente deve ser acima de 80%. Sendo assim, o procedimento de recuperação mostrou-se adequado aos estudos de penetração e retenção cutânea tanto para a fração como para o extrato de *Inga edulis*.

Marquele-Oliveira (2007) obteve recuperação dos componentes antioxidantes do extrato de própolis de 93,03 e 100%, também utilizando o método de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD.

4.7.2.2. Análise da Recuperação por CLAE

As concentrações de vicenina-2 extraídas da pele foram calculadas adicionando os valores das alturas do pico de vicenina-2 na equação da reta obtida para o padrão deste composto. As quantidades de vicenina-2 presentes em 100 μL de soluções de extrato e da fração em diferentes concentrações (2000, 500 e 200 $\mu\text{g/mL}$) foram consideradas 100% e as porcentagens de recuperação da vicenina-2 nas amostras foram calculadas a partir deste valor (Tabela 11).

Tabela 11. Porcentagem de recuperação da vicenina-2 extraída após aplicação de quantidades de extrato e da fração à pele.

Amostras	Massa de extrato ou fração adicionada à pele (μg)	Massa de vicenina-2 adicionada à pele (μg)	Massa de vicenina-2 do controle (μg)	Massa de vicenina-2 extraída da pele (μg)	Recuperação (%)
Extrato	200	1,00	1,004	0,944	94,02
	50	0.250	0,236	0,226	95,76
	20	0.100	0,136	0,115	84,56
Fração	200	2,000	2,05	1,690	82,44
	50	0,500	0,50	0,40	80,00
	20	0,200	0,21	0,17	80,95

Fonseca (2009) apresentou uma recuperação de 81,41% para a rutina e de 83,35% para a narcisina presentes no extrato de calêndula e Vicentini (2009) obteve recuperação de 90, 87 e 84,9% para a quercetina em amostras de pele pelo método de CLAE. Os resultados apresentaram valores acima do recomendado 80% (BRONAUGH et al.,1999) e portanto, foram considerados satisfatórios.

4.7.3. Estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração de *Inga edulis* no método de tape stripping

Os resultados da inibição da quimioluminescência gerado pelas amostras, obtidas pelo processo de *tape stripping* e pela solução de extrato e fração de *Inga edulis* (controle) preparado na mesma concentração que as amostras, encontram-se na Figura 25.

A porcentagem de inibição da quimioluminescência encontrada para a amostra foi comparada com a porcentagem de inibição gerada pelo controle.

Figura 25. Atividade antioxidante determinada pelo sistema xantina/luminol/xantina oxidase no estudo da recuperação dos componentes antioxidantes do extrato e da fração no método de *tape stripping*. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ DP.

O branco não inibiu a quimioluminescência, indicando que os componentes da fita que foram extraídos não apresentaram atividade antioxidante e, portanto, não interferiram no método. Assim, a recuperação dos componentes antioxidantes do extrato

e da fração retidos no estrato córneo foi 89,5% e 83,1% respectivamente, indicando que tal procedimento poderá ser utilizado nos estudos de penetração e retenção cutânea.

4.7.4. Estudo de retenção *in vitro* das formulações tópicas adicionadas do extrato e da fração de *Inga edulis* utilizando pele de orelha de porco

A fim de obter o efeito biológico na pele, o composto ativo presente na formulação tópica deve ser capaz de penetrar e ficar retido na epiderme viável. Entretanto a penetração destes ativos é influenciada pelo veículo, que pode ser responsável pela diminuição ou aumento da penetração do ativo na pele (DAL BELO et al., 2009). Sendo assim, a penetração do composto de interesse presente tanto no extrato como na fração de *Inga edulis* foi estudada em duas formulações com teores de ácidos graxos diferentes adicionadas da fração (F1F, F2F) e em duas formulações adicionadas do extrato (F1E e F2E).

A quantidade de formulação (200 mg) adicionada a uma área de 1,77cm² da pele de orelha de porco é capaz de cobrir totalmente a área de pele disponível e formar uma camada espessa sobre a mesma. Sendo assim, embora a quantidade de vicenina-2 presente na fração seja duas vezes maior que a quantidade presente no extrato, a quantidade do ativo em estudo disponível em formulações adicionadas do estrato e da fração para penetração é considerada infinitesimal. Desta forma, é importante avaliar a penetração do composto de interesse tanto no extrato como na fração de *Inga edulis*. Uma vez que são matrizes que foram obtidas por processos de extração diferentes, e que têm em comum vários compostos antioxidantes, dentre eles o composto de interesse vicenina-2, avaliar a influência de compostos com diversas polaridades presentes no extrato e minimizados na fração é uma estratégia interessante para elucidar a importância de processos de purificação na penetração cutânea. O extrato poderia possuir substâncias agindo em sinergismo, aumentando a penetração do composto de interesse, como agindo competitivamente e dificultando a penetração do ativo (MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2007).

A vicenina-2 foi escolhida para ser estudada quanto à sua penetração e retenção na epiderme viável, visto que trata-se de um flavonóide com atividade antioxidante e antiinflamatória relatada na literatura. Gobbo-Neto e colaboradores (2005) avaliaram a atividade anti-inflamatória da vicenina-2 em edema de pata induzido em rato e a ação sobre o burst respiratório de polimorfonucleares (PMN), estimulados *in vitro* com

zymosan opsonizado por quimioluminescência amplificada por luminol. De acordo com o estudo, foi verificado que a vicenina-2 apresentou atividade antioxidante semelhante ao flavonóide rutina, utilizada como padrão para a quimioluminescência e apresentou capacidade antiinflamatória nos testes realizados. Vrinda e Uma Devi (2001) mostraram que concentrações baixas e não citotóxicas de vicenina possuem um efeito protetor aos cromossomos de linfócitos periféricos humanos irradiados com doses clinicamente relevantes em radioterapia.

Diante do exposto, estudos de penetração e retenção cutânea da vicenina-2 tornam-se muito interessantes, uma vez que o enriquecimento do sistema endógeno cutâneo com o este composto pode ser uma estratégia fotoquimioprotetora importante para minimizar os danos causados com a exposição à RUV.

4.7.4.1. Estudo de retenção *in vitro* do composto vicenina-2 em pele de orelha de porco adicionada do extrato e fração de *Inga edulis* pelo método CLAE

A equação da reta referente à curva de calibração do padrão de vicenina-2 foi utilizada para medir a quantidade retida deste composto na epiderme viável da pele de orelha de porco adicionada das diferentes formulações incorporadas do extrato e da fração, após 12 horas de experimento (tabela 12).

Tabela 12 – Retenção *in vitro* da vicenina-2 incorporada nas formulações tópicas, 12 horas após a aplicação em pele de orelha de porco

Formulação	Massa vicenina (ug/cm ²)	
	Extrato (E)	Fração (F)
F1 (gel creme Hostacerin SAF [®])	0,0844 ± 0,0084*	0,3280 ± 0,0472
F2 (gel Aristoflex AVC [®])	0,1070 ± 0,0079*	0,1003 ± 0,0077 *

*Abaixo da linearidade do método. Os resultados representam a média de 6 determinações ± DP.

Como se pode observar na tabela 12, a formulação gel-creme com Hostacerin SAF[®] (F1) adicionada da fração foi aquela que permitiu a maior penetração/retenção da vicenina-2 na epiderme viável. Para assegurar que o composto retido na epiderme viável era realmente a vicenina-2, a solução oriunda do processo de extração das peles de orelha de porco adicionadas da formulação F1F após o experimento conduzido por 12

horas foi analisada pela empresa Lychnoflora e o composto retido foi identificado por UPLC-DAD-MS e UPLC-DAD-MS/MS (dados em anexo). Já as formulações do tipo gel adicionadas do extrato e da fração foram capazes de reter quantidades muito próximas de vicenina-2 na epiderme viável. Os dados apresentados sugerem que o fator determinante para a diferença (aproximadamente 4 vezes) entre a quantidade de vicenina-2 retida na epiderme viável para a formulação gel-creme (F1) adicionada da fração quando comparado à mesma formulação adicionada de extrato não seria pelo fato da quantidade de vicenina-2 da fração ser o dobro daquela presente no extrato. Isso pode ser explicado pelo fato de que 200 mg das formulações adicionadas da fração, aplicadas a 1,77 cm² da pele, contém 20 µg de vicenina-2 e assim, a quantidade de vicenina-2 aplicada à pele foi cerca de 59 vezes superior à quantidade do flavonóide retida na epiderme viável. Em adição, a vicenina-2 é um composto polar e segundo o banco de dados SciFinder da American Chemical Society (ACS), 0,034 mol/L são solubilizados em pH 7,0 a 25° C. Usando esses dados, em 12 mL do meio receptor, tampão fosfato 150 mM, pH 7,2, seria possível a solubilização de 242 mg de vicenina-2. Considerando que em 200 mg das formulações adicionadas do extrato ou da fração há cerca de 10 e 20 µg de vicenina-2, respectivamente, o meio receptor seria suficiente para solubilizar 24200 ou 12100 vezes as quantidades de vicenina-2 presentes em 200 mg das formulações adicionadas da fração ou do extrato, respectivamente. Assim, a solubilidade deste flavonóide no meio receptor empregado para os estudos de penetração/retenção não seria também um fator limitante à penetração da vicenina-2. Neste contexto, a penetração e retenção cutânea da vicenina-2 na epiderme viável poderia ter sido influenciada pela diferença de composição entre o extrato e a fração de *Inga edulis*. O extrato de Ingá é constituído de compostos polares, de média polaridade e de baixa polaridade, enquanto que a fração foi enriquecida dos compostos de média polaridade (DIAS et al, 2010). Assim, as formulações adicionadas de extrato, pela presença de compostos de diferentes polaridades, poderiam ter maior dificuldade na liberação do composto de interesse.

A quantidade de vicenina-2 retida na epiderme viável a partir da formulação F1F foi de 0,33 µg, que corresponde a cerca de 3% do total deste flavonóide disponível na pele de orelha de porco. Dal Belo e colaboradores (2009) determinaram a penetração dos flavonóides quercetina e epigallocatequina- 3 – galato (EGCG) presentes nos extratos de Ginkgo biloba e Chá verde, respectivamente, em formulações a base de Hostacerin SAF[®] e a quantidade penetrada destes flavonoides na epiderme viável

humana em experimento *in vitro* conduzido por 24 horas foi de 0,23 e 0,54 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente. Vicentini encontrou valores de 0,13 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de quercetina na epiderme viável de pele de orelha de porco veiculada em solução de propilenoglicol após 12 horas de experimento.

A vicenina-2 é um flavonóide C-glicosilado, polar, solúvel em água, cuja estrutura química pode ser visualizada na figura abaixo (figura 26).

Figura 26. Estrutura química da Vicenina-2 (apigenina-6,8-di-C- β -D glicopiranosídeo).

De acordo com Saija e colaboradores (1995), o grupo de glicose presente na molécula de flavonóides diminui sua capacidade de penetrar em modelos de bicamada lipídica pela diminuição da lipossolubilidade e pela diminuição da interação do flavonóide entre as cadeias de lipídios. Sendo a vicenina-2 uma molécula que possui dois grupos de glicose, é possível compreender a dificuldade deste flavonoide em penetrar a bicamada lipídica presente no estrato córneo e atingir a epiderme viável. Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o flavonóide apigenina, que não possui as glicosilações, é capaz de penetrar nas camadas mais profundas da pele de camundongo (SAIJA et al., 1998).

Para aumentar a baixa permeabilidade de flavonóides na pele é necessário utilizar promotores de penetração como surfactantes e ácidos graxos que podem modificar reversivelmente a barreira cutânea (SAIJA et al., 1998). Hostacerin SAF[®] é uma base hidratante constituída pela associação entre doadores de viscosidade, emulsionantes e emolientes, desenvolvida para preparação de emulsões de caráter aniônico a frio. Esta base contém o doador de viscosidade taurato de acriloldimetil de

amônio/copolímero VP, emulsionante de origem vegetal à base de óleo de canola e triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado que aumenta a capacidade de retenção de água na pele. Por conter em sua formulação éster fosfórico, que tem grande afinidade pelos fosfolípidos da pele, isso poderia facilitar a penetração de ativos. Além disso, Hostacerin SAF[®] possui como emolientes o óleo mineral e o palmitato de isopropila. A presença de material graxo pode facilitar a liberação de compostos solúveis em água, como é o caso da vicenina-2, da formulação gel-creme adicionado da fração e do extrato. No entanto, na formulação gel-creme adicionada de extrato pode haver outros componentes mais polares que competiriam com a vicenina-2, diminuindo assim a sua liberação, e o mesmo pode não acontecer com a formulação adicionada da fração que é enriquecida de compostos de média polaridade. Além disso, na formulação com extrato pode haver mais flavonóis que se ligam à cabeça polar dos fosfolípidos da membrana, como já mencionado por Saija e colaboradores (1995), que dificultariam a penetração do flavonoide vicenina-2.

Por outro lado, na formulação gel-creme com Hostacerin SAF[®] adicionada da fração, a vicenina-2 liberada poderia penetrar mais facilmente no estrato córneo, pois a base Hostacerin SAF[®] aumenta a capacidade de retenção de água na pele, e o flavonoide vicenina-2 no pH da formulação gel-creme (5,6-5,8) apresenta solubilidade de 2,3 mg/mL, segundo o banco de dados SciFinder da American Chemical Society (ACS). O aumento da capacidade de retenção de água na pele proporcionado pelo Hostacerin SAF[®] poderia ser devido à ligação do triéster fosfórico de álcool laurílico etoxilado, constituinte dessa base, à camada do estrato córneo ocluindo a superfície da pele, impedindo a perda de água (WILLIAMS e BARRY, 2004). Nesse sentido, a formulação a base de Hostacerin SAF[®] mostrou aumentar a hidratação da pele humana em um estudo realizado por Gaspar e Maia Campos (2001). Este estudo conduzido durante sete dias com aplicação de formulações duas vezes por dia em antebraço de voluntários humanos comparou a hidratação da pele proporcionada pela formulação contendo 4% de Hostacerin SAF[®] com formulações compostas por cera auto emulsionante não iônica acrescida ou não de mistura de silicones. O conteúdo aquoso do estrato córneo foi medido através do equipamento Corneometer[®] nos voluntários humanos. Além de ser a formulação que apresentou os maiores valores de hidratação cutânea, Hostacerin SAF[®] também apresentou o melhor desempenho quanto aos quesitos toque, pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele.

As formulações do tipo gel adicionadas de extrato ou fração proporcionaram aproximadamente a retenção da mesma quantidade de vicenina-2 na epiderme viável que foram cerca de duas vezes menores que a proporcionada pela formulação gel-creme adicionada da fração. A formulação gel devido ao seu maior conteúdo de água e ao pH de 5,0 e 4,9 para as formulações adicionadas de extrato e fração, respectivamente, em que a solubilidade da vicenina-2 é de 2,3 mg/mL, poderia dificultar a liberação do flavonóide em estudo. A viscosidade também pode ter influenciado negativamente na liberação do composto, uma vez que as formulações do tipo gel foram as que apresentaram os maiores valores de viscosidade aparente. Tanto a afinidade do ativo pela base como a viscosidade são fatores importantes no perfil de liberação de um ativo a partir de um veículo (CHORILLI et al., 2007). Barry (1983) correlacionou valores de viscosidade plástica em um gel de ágar com a difusão de princípios ativos e observou que a viscosidade foi inversamente proporcional à taxa de liberação. Marriott (1996) observou que o aumento da viscosidade do veículo diminuiu a absorção de princípios ativos pela pele, verificando uma relação também inversa entre a viscosidade e a absorção do ativo.

4.9.4.1. Estudo de retenção *in vitro* das formulações tópicas pelo método de quimioluminescência

Em experimentos de penetração *in vitro*, o estrato córneo é a camada limitante da penetração (ZATZ, 1993). Desta forma, após o experimento de penetração/retenção ter sido conduzido por 12 horas, foi realizado o procedimento de retirada do estrato córneo pelo processo de *tape stripping* para avaliar os compostos com atividade antioxidante que ficaram retidos nesta camada (figura 27).

Figura 27. Porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD das fitas obtidas por *tape stripping* estimado para os estudos de permeação e retenção cutânea após 12 horas de experimento.

Todas as formulações estudadas foram capazes de aumentar a atividade antioxidante do estrato córneo, o que demonstra a sua função barreira em segurar os compostos, dificultando a penetração até a epiderme viável. Este dado demonstra também que as formulações estudadas foram capazes de liberar os compostos antioxidantes após 12 horas de experimento. Entretanto, esta liberação pode ter ocorrido em velocidades diferentes, o que pode ter influenciado na penetração e retenção cutânea.

Dentre as formulações estudadas, a que proporcionou maior aumento da atividade antioxidante na pele pela inibição do sistema xantina/luminol/XOD, sendo estatisticamente diferente do placebo (t student), foi a formulação F1F (Hostacerin SAF[®] adicionada da fração) (Figura 28). As demais formulações, embora tenham liberado ativos antioxidantes, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparadas com sua respectiva formulação placebo. Isto pode ter ocorrido pela diferença na velocidade de liberação do ativo e pela presença de promotores de penetração na formulação a base de Hostacerin SAF[®]. A formulação F1F foi capaz de aumentar a inibição da quimioluminescência gerado pelo sistema xantina/XOD/ luminol em 18 %, na epiderme viável. Este dado evidencia que a formulação propiciou a penetração de compostos capazes de sequestrar o ânion superóxido formado *in vitro*. Entretanto, a atividade antioxidante do padrão de vicenina-2 na mesma quantidade detectada na epiderme viável (0,33 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) não foi capaz de inibir a

quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol. Desta forma, a atividade antioxidante na epiderme viável não pode ser relacionada à quantidade de vicenina-2 quantificada por CLAE.

Assim, a formulação de Hostacerin SAF[®] além de proporcionar a penetração do flavonoide vicenina-2, possibilitou também a penetração de compostos com atividade antioxidante, que não foram detectados por CLAE. A não detecção desses compostos pode ser devido à escolha do comprimento de onda na análise por CLAE, ou pode ser também que a atividade antioxidante seja devido à penetração de vários compostos na epiderme viável, em baixa concentração, não detectados por CLAE, mas a somatória das suas atividades pode ter proporcionado a inibição da quimioluminescência detectada, mesmo após a pele ter sido extraída com 5 mL de metanol 80%.

Figura 28. Porcentagem de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/luminol/XOD da pele de orelha de porco estimado para os estudos de permeação e retenção cutânea após 12 horas de experimento.

Gobbo-Neto e colaboradores (2005) avaliaram atividade antioxidante da vicenina-2 sobre o burst respiratório de polimorfonucleares (PMN), estimulados *in vitro* com zymosan opsonizado, por quimioluminescência amplificada por luminol, como já mencionado anteriormente. Pelos resultados obtidos os autores concluíram que a vicenina-2 também tem atividade antioxidante, contudo, a quantidade de vicenina-2 que os autores utilizaram no ensaio foi superior àquela que penetrou na epiderme viável.

Assim, a formulação F1F foi a melhor formulação dentre todas as estudadas, pois além de prover a maior penetração/retenção do composto vicenina-2 e de compostos antioxidantes na epiderme viável, esta formulação foi considerada estável por todos os parâmetros avaliados no estudo de estabilidade preliminar. Em adição, outras formulações com Hostacerin SAF[®] foram estudadas na literatura quanto aos aspectos relacionados à aceitação pelo consumidor e apresentaram ótimo desempenho nos quesitos hidratação, toque, pegajosidade, espalhabilidade e aparência na pele.

5. Conclusões

A discussão dos resultados obtidos permitiu concluir que:

O flavonóide vicenina-2 foi identificado no extrato e na fração de *Inga edulis*, sendo que a fração possui o dobro da quantidade deste flavonoide em relação ao extrato.

O extrato e a fração de média polaridade de *Inga edulis* apresentaram potente atividade antioxidante *in vitro* e altos teores de polifenóis e flavonóides totais, sendo a fração a que mostrou a maior capacidade antioxidante frente aos métodos empregados e maiores teores tanto de polifenóis como de flavonóides.

O extrato e a fração mostraram citotoxicidade parecida nas concentrações menores que 80µg/mL em cultura celular de fibroblastos (L929), pois ambos apresentaram 100% de viabilidade celular. Entretanto, o extrato mostrou ser mais citotóxico que a fração na concentração de 312µg/mL.

Tanto o extrato como a fração apresentaram estabilidade quanto aos compostos responsáveis pela atividade antioxidante frente às radiações UVA e UVB nas doses de radiação utilizadas e estas doses também não alteraram a citotoxicidade de ambos.

A incorporação do extrato e da fração nas formulações não alterou suas atividades antioxidantes.

Após submetidas aos ciclos do estudo de estabilidade preliminar, as formulações a base de Hostacerin SAF[®] (F1) e Aristoflex AVC[®] (F2) adicionadas tanto do extrato como da fração mostraram-se estáveis. Já a formulação a base de Lanette N[®] (F3) adicionada do extrato apresentou instabilidade, mostrando que formulações adicionadas da fração tendem a ser mais estáveis que as adicionadas do extrato.

As formulações estudadas não perderam sua capacidade antioxidante medida pelos métodos de DPPH[•] e de quimioluminescência após o estresse térmico.

Dentre as formulações estudadas (F1 e F2) adicionadas do extrato e da fração, a formulação com Hostacerin SAF[®] adicionada da fração (F1F) foi a que permitiu a maior retenção da vicenina-2 e ainda permitiu um aumento da capacidade de inibição da quimioluminescência gerada pelo sistema xantina/XOD/luminol na epiderme viável. Além disso, a fração de *Inga edulis*, veiculada por esta formulação, mostrou alta atividade antioxidante frente aos métodos estudados, apresentou baixa citotoxicidade em cultura celular de fibroblastos, sendo a quantidade citotóxica estabelecida muito acima da quantidade de vicenina-2 retida na epiderme viável. A fração também apresentou fotoestabilidade frente a altas doses de radiação UVA e UVB quanto à citotoxicidade,

capacidade de reduzir o radical sintético DPPH[•] e de sequestrar o ânion superóxido *in vitro*. Assim, a formulação gel-creme com Hostacerin SAF[®] adicionada de 1% da fração de média polariidade do *Inga edulis* mostrou ser muito promissora e deve ser melhor estudada, visando futura aplicação como formulação fotoquimiopreventiva.

A penetração/retenção cutânea da viciénina-2 e de compostos antioxidantes foi influenciada tanto pelo tipo de formulação empregada como pelos compostos presentes no extrato e não presentes na fração, que influenciaram negativamente tanto na penetração do composto estudado como na penetração de compostos capazes de sequestrar o ânion superóxido formado *in vitro*. Assim, fica evidente a necessidade da realização do processo de purificação e enriquecimento do extrato para a obtenção da fração para a utilização desta em formulações tópicas com finalidade fotoquimiopreventiva.

6. Referências

- AFAQ, F.; ADHAMI, V.M.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of ultraviolet B signaling and photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p. 153-173, 2005.
- AL-MAMARY M.; AL-MEERI A.; AL-HABORI M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of Honey. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1041-1047, 2002.
- ALMEIDA, I. F.; BAHIA, M. F.. Reologia: interesse e aplicações na área cosmético farmacêutica. **Cosmetics and Toiletries**, v. 15, n. 3 , p.96-100, 2003.
- ARCT, J.; OBORSKA, A.; MOJSKI, M.; BINKOWSKA, A.; SWIDZIKOWSKA, B. Common cosmetic hydrophilic ingredients as penetration modifiers of flavonoids. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 24, n.6, p.357-366, 2002.
- ASBILL, C.S.; MICHNIAK, B.B. Percutaneous penetration enhancers: local versus transdermal activity. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, Amsterdam,v.3, n.1, p.36-41, 2000.
- AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**, 2ªedição., Artmed Editora,2005.
- BABY, A. R.; HAROUTIOUNIAN-FILHO, C. A.; SARRUF, F. D.; TAVANTE-JUNIOR, C. R.; PINTO, C. A. S.O.; ZAGUE, V.; AREAS, E. P. G.; KANEKO, T. M.; VELASCO, M. V. R. Estabilidade e estudo de penetração cutânea in vitro da rutina veiculada em uma emulsão cosmética através de um modelo de biomembrana alternativo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.2., p. 233-248, 2008
- BARRY, B.W. **Dermatological formulations: percutaneous absorption**. New York: M. Dekker, 1983.
- BARRY, B. W. Lipid-protein-partitioning theory of skin penetration enhancement. **Journal of Control and Release**, Amsterdam, v.15, n. 3, p.237-248, 1991.
- BENTLEY, M.V.L.B. **Desenvolvimento de produtos dermatológicos contendo corticosteróides: avaliação da liberação e penetração transcutânea por metodologia in vitro**. Tese de doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de São Paulo, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.
- BENTLEY, M.V.L.B.; KEDOR, E.R.M.; VIANNA, R.F.; COLLETT, J.H. The influence of lecithin and urea on vitro permeation of hidro cortisone acetate through skin from hairless mouse. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 146, n.2, p. 255-262, 1997.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radicals. **Nature**, v. 26, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BORENFREUND, E.; BABICH, H.; MARTIN-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays - the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests, **Toxicology in Vitro**, v. 2, n. 1, p. 1-6, 1988

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Gerência Geral de cosméticos. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Série qualidade 1. Brasília, 2004. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/cosmeticos/guia_series.htm>. Acesso em 02 de maio de 2011.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária –ANVISA. Gerência Geral de cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. Brasília, 2008.

BRONAUGH, R. L.; HOOD, H. L.; KRAELING, M. E. K.; YOURICK, J. J. Determination of percutaneous absorption by in vitro techniques. In: BRONAUGH, R.L., MAIBACH, H.I. **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3º ed., Marcel Dekker, New York, p.229-234, 1999.

BRONAUGH, R. L.; COLLIER, S. W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: ZATZ, J.L. *Skin permeation: Fundamentals and Application*. Wheaton: Allured Publishing Corporation, cap. 4, p. 93-11, 1993.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v. 52c, p. 302-310, 1978.

CASGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr., W. A.; BORIN, M. F.; LOPEZ, R. F. V.; FONSECA, M. J. V. In vitro evaluation of quercetin cutaneous absorption from topical formulations and its functional stability by antioxidant activity. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 328, p. 183-190, 2007.

CASAGRANDE, R. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo quercetina: controle físico químico e avaliação da eficácia *in vivo***. 2005. 229f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S. R.; VERRI Jr, W. A.; DORTA, D. J.; DOS SANTOS, A. C.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. **Journal of Photochemistry and Photobiology b: Biology**, v. 84, p. 21-27, 2006.

CHANG, C.C., YANG, M.H., WEN, H.M., CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, v. 92, p. 491-497, 2005.

CHOI, E.J.; CHEE, K.M.; LEE, B.H. Anti- and prooxidative effects of chronic quercetin administration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.482, p.281-285, 2003.

CHORILLI, M.; ZAGUE, V.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R. Influência da viscosidade do veículo na liberação *in vitro* da cafeína. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.4, p. 52-60, 2007.

COLO, STEVEN M.; HERH, PETER K. W.; ROYE, NICK; LARSSON, MATS. Rheology and the Texture of Pharmaceutical and Cosmetic Semisolids. **American Laboratory**, p.26-30, 2004.

CORRÊA, N. M.; JUNIOR, F. B. C.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. R. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofilicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 41, n.1, p. 73-78, 2005.

DAL BELO, S. E.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G; MARTY, J. P. Skin Penetration of Epigallocatechin-3-Gallate and Quercetin from Green Tea and *Ginkgo biloba* Extracts Vehiculated in Cosmetic Formulations. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 22, p. 299–304, 2009

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGÉZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v.33, n.1, p. 38-42, 2010.

DI MAMBRO, V.M.; FONSECA, M.J.V. Assay of physical stability and antioxidant activity of a topical formulation added with different plant extracts. **Journal of Pharmaceutics and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 37, p. 287-295, 2005.

FALCÃO, M. A.; CLEMENT, F. C. Fenologia e produtividade do Ingá- Cipó (*Inga edulis*) na Amazônia Central. **Acta Amazônica**, v.30, p.173-180, 2000.

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

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, Amsterdam, v. 3, n. 12, p. 417-425, 2000.

FONSECA, Y. M. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo extrato própolis verde: estudos de estabilidade, liberação, permeação e retenção cutânea**. 2007. 169f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

FONSECA, Y. M. **Avaliação da atividade fotoquimiopreventiva do extrato de Calêndula**. 2009. Dissertação (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

FONSECA, Y. M.; CATINI, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. R.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of *Calendula officinalis*

extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 596-601, 2010.

FORTE, A. L. A. S. **Avaliação do potencial fotoquimioprotetor do extrato de *Protium heptaphyllum* da Amazônia em gel de aplicação tópica**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178 -182, 2005

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G.. Rheological behavior and the spf of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v.250, n.1 p. 35-44, 2003.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Evaluation of the photostability of diferente UV filter combinations in a sunscreen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 123-128, 2006.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. avaliação do efeito sensorial, da hidratação e teor lipídico da pele com o uso de formulações cosméticas acrescidas ou não de ceramidas. **Congresso Latinoamericano da IFSCC**. Buenos Aires, 2001.

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; DI MAMBRO, V. M.; AZZOLINI, A. E. S. S.; FONSECA, M. J. V. Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescent method. **AAPS PharmSci**, Virgínia, v. 5, p. 210-214, 2003, article 20 – <http://www.pharmsci.org>.

GIULITTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. C. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Biodiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GIROTTI, S.; FINI, F.; FERRI, E.; BUDINI, R.; PIAZZI, S.; CANTAGALLI, D. Determination of superoxide dismutase in erythrocytes by a chemiluminescent assay. **Talanta**, v. 51, p. 685-692, 2000.

GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of Di-C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Médica**, v. 71, p. 3-6, 2005.

GONZÁLEZ, S.; FERNÁNDEZ-LORENTE, M.; GILABERTE-CALZADA, Y. The latest on skin photoprotection. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 614-626, 2008.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Química Nova**, v. 30 (1), p. 206-213, 2007.

HADGRAFT, J. Skin deep. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.58, p.291-299, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**, 3^a ed, New York: Pergamon Press, p.1-104,1990.

HANSON, K. M.; GRATTON, E.; BARDEEN, C. J. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 41, p. 1205-1212, 2006

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2010**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Site visitado em: 13 de novembro de 2011.

ISAAC, V. L.B.; CEFALI, L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G., SALGADO, H.R.N. CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p.81-86, 2008.

KOH, E.; MITCHELL, A. E. Trends in the Analysis of Phytochemicals – Flavonoids and carotenoids. In: **Phytochemicals – Aging and Health**. CRC Press. p. 39-76. 2008.

KOHEN, R. Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress – New approaches for their evaluation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Paris, v.53, n.4, p.181-192, 1999.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, p.329-339, 2004.

LARRUCEA, E.; ARELLANO, A.; SANTOYO, S.; YGARTUA, P. Combined effect of oleic acid and propylene glycol on the percutaneous penetration of tenoxicam and its retention in the skin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 52, n.2, p. 113-119, 2001.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia Aplicada**. 2^a edição. São Paulo: Santa Isabel, 2008.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 77. n. 5, p. 1-8, 2002.

LEONARDI, G. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Estabilidade de formulações cosméticas. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 3, n. 4, p.154-156, 2001.

LIMA, E. S.; ABDALLA, S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n.3, p. 293 - 303, 2001.

- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 531-536, 2006.
- MAIA CAMPOS, P.M.B.G.; BADRA, M.U.L. Estudo da estabilidade física de bases dermocosméticas contendo ésteres fosfóricos. **Aerosol & Cosméticos**, São Paulo, v. 79, p. 8-11, 1992.
- MANACH ET AL, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Society for Clinical Nutrition**. v. 79. p. 727-747. 2004.
- MARQUELE, F.D.; DI MAMBRO, V.M.; GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R.; VALIM, Y.M.L.; FONSECA, M.J.V. Assessment of the antioxidant activities of brazilian extracts of própolis alone and in topical pharmaceutical formulations. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.39, p.455-462, 2005.
- MARQUELE-OLIVEIRA F.; FONSECA, Y. M.; FREITAS, O.; FONSECA, M. J. V. Development of topical functionalized formulations added with propolis extract: stability, cutaneous absorption and in vivo studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 342, p. 40-48, 2007.
- MARRIOTT, C. Rheology and the flow of fluids. In: AULTON, M.E. **Pharmaceutics: the science of dosage form design**. Churchill Livingstone, 1996.
- MARTIN, A. **Physical Pharmacy**. 4. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 153-476, 1993
- MARTIN, A.; BUSTAMANTE, P.; CHUN, A. H. C. Rheology. **Physical Pharmacy**, Philadelphia, Lea & Febiger, cap. 17, p. 453-473, 1993.
- MATÉS J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. **Frontiers in Bioscience**, v. 4, p. 339-345, 1999.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high performance liquid chromatography: A review. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.48, n.3, p.577-599, 2000.
- MOREIRA, D.L.; ENGELHARDT, R.L.; REIS, A.S.; SANCHES, E.M.; LEITÃO, S.G.; LEITÃO, G.G. Substâncias fenólicas com atividade antioxidante de *Pseudopiptadenia contorta* (Leguminosae-Mimosoideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.12, p.124-125, 2002.
- MORGANTI, P.; RUOCCO, E.; WOLF, R.; RUOCCO, V. Percutaneous absorption and delivery systems. **Clinics in Dermatology**, New York, v.19, n.4, p. 489-501, 2001.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v.52, p.103-112, 2001.

NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science Technoogy Today**, Oxford, v.3, n.9, p.318-326, 2000.

OHKAWA, H.; OSHINI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. **Analytica Chimica**, v. 95, p. 351-388, 1979.

PAREJO, I.; CODINA, C.; PETRAKIS, C.; KEFALAS, P. Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH free radicals assays. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 44, p. 507-512, 2000.

PENA, L. E.; LEE, B. L.; STEARNS, J. F. Consistency development and destabilization of a model cream. **Journal of the Society of Cosmatics Chemists**, v. 44, p. 337-345, 1993.

PEUS, D.; MEVES, A.; POTT, M.; BEYERLE, A.; PITTELKOW, M.R. Vitamin E analog modulates UVB-induced signaling pathway activation and enhances cell survival. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.30, n.4, p.425-432, 2001.

PHARMASPECIAL. Informativo técnico: Hostacerin SAF[®]. Disponível em: <http://www.pharmaspecial.com.br/imagens/literaturas/Lit_HOSTACERIN_SAF.pdf>. Acesso em 11 de fevereiro de 2012.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

RAMPAUL, A.; PARKIN, I.P.; CRAMER, L.P. Damaging and protective properties of inorganic components of sunscreens applied to cultured human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 191, p. 138-148, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELLO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavengers of superoxide anion. *Biochemical Pharmacology*, v.37, n. 5, p. 837-841, 1988.

RODRIGUES, T.; SANTOS, A. C.; PIGOSO, A. A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, A. S.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis – potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 136, n. 1, p. 136-142, 2002.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vivo* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

RÖPKE, C.D.; KANEKO, T.M.; RODRIGUES, R.M.; da SILVA, V.V.; BARROS, S.; SAWADA, T.C.H.; KATO, M.J.; BARROS, S.B.M. Evaluation of percutaneous

- absorption of 4-nerolidylcatechol from four topical formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.294, p.109-116, 2002.
- SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F. Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.19, n.4, p.481-486, 1995.
- SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; PASQUALE, A.D.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effects of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v.175, n.1, p.85-94, 1998.
- SANDES, A. R. R.; DI BLASÉ, G. Biodiversidade e diversidade química e genética. **Biociência**, n. 33, p. 62-71, 2004.
- SCALIA, S.; MEZZENA, M. Photostabilization effect of quercetin on the UV filter combination, butyl methoxydibenzoylmethane-octyl methoxycinnamate. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 273-278, 2010.
- SCHOTT, H. Reologia. **Remington Pharmacia**. 19. ed. Phennsylvania: Mack Publishing Company, p. 426- 455, 1995.
- SIERENS J.; HARTLEY J. A.; CAMPBELL M. J.; LEATHEM A. J. C.; WOODSIDE J. V. Effect of phytoestrogen and antioxidant supplementation on oxidative DNA damage assessed using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 485, p. 169-176, 2001.
- SILVA, E. M.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**. v. 55. p.381-387. 2007.
- SILVA, E. M.; POMPEU, D. R.; ROGEZ, H., LARONDELLE, Y. Optimisation of the adsorption of polyphenols from *Inga edulis* leaves on macroporous resins using an experimental design methodology . **Separation and Purification Technology**, v.53, p. 274-280, 2007a.
- SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities an polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007b.
- SILVEIRA, J. H. Uso da biodiversidade para produção de medicamentos. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 2003.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81,2002.
- SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, 2007.

- SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. P.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.6, p. 1276-1280, 2007.
- SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v.106, p. 331-339, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R. ; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-172, 1999.
- VALENTA, C.; SCHULTZ, K. Influence of carrageenan on the rheology and skin permeation of microemulsion formulations. **Journal of controlled release**, v. 95, p.257-265, 2004.
- VICENTINI F. T. M. C.; GEORGETTI S. R.; JABOR J. R.; CARIS J. A.; BENTLEY M. V. L. B.; FONSECA M. J. V. Photostability of Quercetin under Exposure to UV irradiation. **Latin American Journal of Pharmacy**, p.119-124, 2007a.
- VICENTINI, F.T.M.C.; CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; BENTLEY, M.V.L.B.; FONSECA, M.J.V. Influence of vehicle on antioxidant activity of quercetin: A liquid crystalline formulation. **Latin American Journal of Pharmacy**. v.26, p.805-810, 2007b.
- VICENTINI, F. T. M. C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**.2009.173f.Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- VIOUX-CHAGNOLEAU, C.; LEJEUNE, F.; SOK, J.; PIERRARD, C.; MARIONNET, C.; BERNERD, F. Reconstructed human skin: from photodamage to sunscreen photoprotection and anti-aging molecules. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 2, p.S1-S12, 2006.
- VRINDA, B.; UMA DEVI, P. Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicienin. **Mutation Research**, v.498, p. 39-46, 2001.
- WALKER, R. B.; SMITH, E. W. The role of percutaneous penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Amsterdam, v. 18, n.3, p. 295 -301, 1996.
- WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Amsterdam, v. 56, n.5, p. 603 -618, 2004.
- WILKINSON, J. B.; MOORE, R. J. **Cosmetologia de Harry**. Madrid, Diaz de Santos, 1990.

WU JH, TUNG YT, WANG SY, SHYUR LF, KUO YH, CHANG ST. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p. 5917-5921, 2005.

XU Y.; FISHER G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**, v. 1, S1-S8, 2005.

ZATZ, J. L. Scratching the surface: Rationale and approaches tp skin permeation. In: **Skin Permeation – Fundamentals and Application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, cap. 1, p. 11-31, 1993.

7. Anexo

1. Análises Realizadas pela empresa Lychnoflora para a identificação dos constituintes do extrato e fração de *Inga edulis*

1.1. Materiais e Métodos

- Amostra: extrato e fração de *Inga edulis*
- Preparo da amostra: MeOH 50%, concentração de 200 µg/mL
- Equipamento: UPLC-TQ Waters modelo Acquity.
- Condições de operação do espectrômetro: N₂ como gás de nebulização, argônio como gás de colisão, temperatura do gás de nebulização de 350 °C, fluxo do gás de 6 L/h. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo.
- Coluna cromatográfica: C18 Shim-pack XR-ODS da Shimadzu (2,2 µm; 2,0 mm x 50 mm).
- Fase móvel: H₂O com 0,1% de ácido fórmico 1% (A) e ACN (acetonitrila) com 0,1% de ácido fórmico 1% (B).
- Temperatura utilizada na análise cromatográfica: 30 °C
- Gradiente de eluição utilizado: tabela 1

Tabela 1. Gradiente utilizado na análise da amostra de *Inga edulis* por UPLC-DAD-MS

Tempo (minutos)	Fase móvel B (%)
0	10
1	10
5,50	20
8,5	40
9,40	100
9,80	100
9,90	10
10,20	10

1.2. Resultados obtidos

Após as análises do extrato e fração oriundos de *I. edulis*, realizada pela Lychnoflora, foram obtidos os cromatogramas ilustrados na **Figura 1 e 2**.

Figura 1. Cromatograma a 280, 330, 370 e 515 nm da fração de *I. edulis*

Figura 2. Cromatogramas a 280, 330 e 370 nm do extrato de *I. edulis*

Tabela 2. Substâncias identificadas na fração de *Inga edulis*

Pico	TR (min)	Substância	UV (nm)	Modo Negativo		Modo Positivo		Ref.
				MS	MS/MS	MS	MS/MS	
1	2,97*	Epicatequina ^{ci}	-	289 [M-H] ⁻	289 (20eV)→ -	291 [M+H] ⁺	291(20eV)→ 249, 245, 207, 203,	1
		Apigenina C-di-hexosídeo	268, 335	593 [M-H] ⁻	593 (20eV)→ 503, 473, 383, 353, 191	595 [M+H] ⁺	179, 151, 147, 139, 123 595(20eV)→ 577, 559, 523, 511, 499, 481, 475, 457, 445, 439, 427, 421, 409, 403, 379, 355, 349, 337, 324	2-3
2	3,21	Vicenina-2 ^{ci}	270, 332	593 [M-H] ⁻	593 (20eV)→ 533, 503, 473, 455, 425, 383, 353	595 [M+H] ⁺	595(20eV)→ 577, 559, 541, 529, 523, 511, 499, 481, 475, 439, 427, 409, 391, 379, 355, 349, 325, 287, 303	3
3	4,08	Miricetina O-hexose-desoxihexosídeo	268, 350	625 [M-H] ⁻	479 (20eV)→ 317	627 [M+H] ⁺	627 (20eV)→ 481, 319, 295, 219, 205, 163, 147, 129 481 (20eV)→ 341, 319 319 (30eV)→ 301, 273, 255, 245, 235, 217, 193, 179, 165, 153, 137, 125, 111, 109	4-5
4	4,95	Miricetina O-desoxihexosídeo	264, 346	463 [M-H] ⁻	463 (20eV)→ 317, 179	465 [M+H] ⁺	465 (20eV)→ 343, 331, 319, 303, 223, 147 319 (20eV)→ 301, 290, 273, 245, 235, 217, 195, 179, 165, 153, 139, 137, 125, 111	6
5	6,71	NI	280, 323	500 [M-H] ⁻	500 (20eV)→ 482, 470, 405, 371, 353, 337, 294, 172, 146, 128	502 [M+H] ⁺	502 (20eV)→ 355, 337, 325, 305, 277, 269, 263, 259, 227, 213, 201, 161, 148, 137 355 (20eV)→ 337, 305, 295, 287, 277, 235, 201	-

TR: tempo de retenção; sinal não resolvido; ^{ci}confirmado por co-injeção de padrão autêntico; NI: não identificado.

1.3. Espectros de UV, MS e MS/MS

Espectros relativos ao pico 1

Espectro 1. Espectro de UV das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min)

IngaEd_pos_met3_500 mt4

Espectro 2. Espectro de Massas das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D2 251 (2.880) Cm (241:251)

Espectro 3. MS/MS do íon de m/z 291 de uma das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D1 224 (2.987) Cm (214:225)

1: Daughters of 595ES+
1.06e5

Espectro 4. MS/MS do íon de m/z 595 de uma das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min, Modo Positivo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4

1: Scan ES-
3.91e5

Espectro 5. Espectro de Massas das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min, Modo Negativo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4_D4 141 (2.995) Cm (135:141)

1: Daughters of 593ES-
6.44e4

Espectro 6. MS/MS do íon de m/z 593 de uma das substâncias relativas ao pico 1 (TR = 2,97 min, Modo Negativo)

Espectros relativos ao pico 2

Espectro 7. Espectro de UV da substância relativa ao pico 2 (TR = 3,21 min)

IngaEd_pos_met3_500 mt4

Espectro 8. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 2 (TR = 3,21 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D1 65 (3.229) Cm (61:74)

Espectro 9. MS/MS do íon de m/z 595 da substância relativa ao pico 2 (TR = 3,21 min, Modo Positivo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4

1: Scan ES-
9.04e5

Espectro 10. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 2 (TR = 3,21 min, Modo Negativo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4_D4 62 (3.268) Cm (57:70)

2: Daughters of 593ES-
1.55e5

Espectro 11. MS/MS do íon de m/z 593 da substância relativa ao pico 2 (TR = 3,21 min, Modo Negativo)

Espectros relativos ao pico 3

2: Diode Array
2.396e-1

Espectro 12. Espectro de UV da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min)

IngaEd_pos_met3_500 mt4

1: Scan ES+
2.24e6

Espectro 13. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Positivo)

INGA POS_D627 204 (3.558) Cm (184:212)

1: Daughters of 627ES+
1.04e5

Espectro 14. MS/MS do íon de m/z 627 da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D1 17 (4.060) Cm (13:19)

3: Daughters of 481ES+
4.09e5

Espectro 15. MS/MS do íon de m/z 481 da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D2 96 (4.137) Cm (87:98)

2: Daughters of 319ES+
3.28e5

Espectro 16. MS/MS do íon de m/z 319 da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Positivo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4 786 (4.075) Cm (785:795)

1: Scan ES-
4.22e5

Espectro 17. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Negativo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4_D2 76 (4.167) Cm (68:93)

2: Daughters of 479ES-
5.48e4

Espectro 18. MS/MS do íon de m/z 479 da substância relativa ao pico 3 (TR = 4,07 min, Modo Negativo)

Espectros relativos ao pico 4

Espectro 19. Espectro de UV da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min)

IngaEd_pos_met3_500mt4

1: Scan ES+
2.58e6

Espectro 20. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D1

5: Daughters of 465ES+
3.42e5

Espectro 21. MS/MS do íon de m/z 465 da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D2 30 (4.990) Cm (20:36)

5: Daughters of 319ES+
1.71e5

Espectro 22. MS/MS do íon de m/z 319 da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min, Modo Positivo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4

1: Scan ES-
6.90e5

Espectro 23. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min, Modo Negativo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4_D2 84 (4.988) Cm (80:85)

3: Daughters of 463ES-
7.65e4

Espectro 24. MS/MS do íon de m/z 463 da substância relativa ao pico 4 (TR = 4,95 min, Modo Negativo)

Espectros relativos ao pico 5

Espectro 25. Espectro de UV da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min)

IngaEd_pos_met3_500 mt4

Espectro 26. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D1 39 (6.737) Cm (31:49)

Espectro 27. MS/MS do íon de m/z 502 da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min, Modo Positivo)

IngaEd_posmet3_500mt4D2 4 (6.764) Cm (1:6)

7: Daughters of 355ES+
1.04e5

Espectro 28. MS/MS do íon de m/z 355 da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min, Modo Positivo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4

1: Scan ES-
3.97e5

Espectro 29. Espectro de Massas da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min, Modo Negativo)

IngaEd_NEGmet3_500mt4_D1 73 (6.806) Cm (71:96)

8: Daughters of 500ES-
3.56e4

Espectro 30. MS/MS do íon de m/z 500 da substância relativa ao pico 5 (TR = 6,71 min, Modo Positivo)

2. Análises Realizadas pela a identificação da(s) substância(s) no extrato das células de Franz

2.1. Materiais e Métodos

- Cromatógrafo: UPLC-DAD da Shimadzu modelo 20A.
- Espectrômetro de Massas: MicroTOF II Bruker
- Condições de operação do espectrômetro: N₂ como gás de nebulização, temperatura do gás de 220 °C, fluxo do gás de 6 L/h. As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo.
- Coluna Cromatográfica: C18 Inertsil® ODS-4 (3µm), 4,6 x 150 mm acoplada a uma pré-coluna de mesma fase estacionária.
- Fase Móvel: água (A) e acetonitrila (B), ambas adicionadas de ácido fórmico 0,1%.
- Amostra: amostra referente às formulações F1F (hostacerin adicionada da fração) após o experimento de célula de Franz e concentradas em uma só, seca sob ar comprimido e ressuspensa em volume menor que o inicial.
- Gradiente de eluição utilizado: ver Tabela 4

Tabela 3 – Gradiente utilizado na análise

Tempo	Fase móvel	Tempo	Fase móvel
(min)	B (%)	(min)	B (%)
0	2	23	12
5	5	26	12
6	5	27	13
11	9	30	13
12	9	40	15
15	10	43	15
17	10	83	28
19	11	85	2
21	11	90	2

2.2. Resultados obtidos

Após as análises do extrato das células de Franz foram obtidos os cromatogramas ilustrados nas figuras 3 a 5.

Foi possível confirmar com os dados de UV e MS dos picos cromatográficos marcados nos cromatogramas era relativo ao flavonoide vicenina-2. Esta constatação também foi confirmada com a fortificação de padrão autêntico de vicenina-2.

Figura 3- Cromatogramas a 280 nm (preto) e após a extração do íon de m/z 595 (relativo à vicenina-2, modo positivo) obtidos por LC-MS da amostra proveniente do ensaio de permeação e retenção usando a formulação F1F.

Figura 4- Cromatogramas a 280 nm (preto) e após a extração do íon de m/z 595 (relativo à vicenina-2, modo positivo) obtidos por LC-MS da amostra proveniente do ensaio de permeação e retenção usando a formulação F1F com adição do padrão de vicenina-2.

Figura 5- Cromatogramas do íon extraído de m/z 595 (relativo à vicenina-2, modo positivo) antes e após a adição do padrão de vicenina-2 obtidos por LC-MS da amostra proveniente do ensaio de permeação e retenção usando a formulação F1F.

3.1. Espectros de UV e MS

Espectros relativos ao pico cromatográfico correspondente à vicentina-2

Espectros 1. Espectros de UV e MS relativos ao pico cromatográfico identificado como vicentina-2 (modo positivo)

Espectros 2. Espectros de UV e MS relativos ao pico cromatográfico identificado como vicentina-2 após adição do padrão de vicentina-2 (modo negativo)